



HAL
open science

Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proch

Christelle Geoffroy-Chapotot

► **To cite this version:**

Christelle Geoffroy-Chapotot. Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proch. Physique [physics]. INPL - Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. Français. NNT : 1998INPL079N . tel-02003050

HAL Id: tel-02003050

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02003050>

Submitted on 7 Feb 2019

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

136 0045 476

98INPL079N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

1998

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

M. G. 1998/10/13

THESE

présentée en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés

par

Christelle GEOFFROY-CHAPOTOT

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

**ÉLABORATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR
DES APPLICATIONS D'INTÉRÊT BIOLOGIQUE,
ET IMAGERIE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE**

Soutenue publiquement le 13 Octobre 1998 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

Président : M. P. SETA

Rapporteurs : M. F.C. De SCHRYVER
M. D. LETOURNEUR

Examineurs : M. P. ROYER
Mme M.C. CARRE
M. F. BAROS
Mme M.L. VIRIOT

A ma mère,

*Que ce mémoire soit pour elle le témoignage
de son soutien et de son abnégation au cours de ces 28 années.*

A mon père,

*dont le Souvenir m'est présent aujourd'hui.
Qu'il trouve ici la plus grande marque de respect et d'honneur que je tiens à lui témoigner.*

A Franck,

Car il n'est de plus grande marque de soutien que la force et la complicité qui nous unit

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, réalisé dans le "Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie" du Département de Chimie-Physique des Réactions, à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, je tiens à adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidée au cours de sa réalisation, et en premier lieu à ceux qui m'ont fait le privilège d'en être les juges.

C'est à deux titres que je remercie Monsieur Frans De SCHRYVER, Professeur à l'Université de Leuven en Belgique. Je suis tout d'abord très touchée de l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de juger ce mémoire, et je lui suis surtout profondément reconnaissante pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire, le Département de Dynamique Moléculaire et de Spectroscopie de Leuven, en Belgique.

Que Monsieur Didier LETOURNEUR, Chargé de Recherche au CNRS dans le Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, à Villetaneuse, soit également assuré de ma profonde gratitude d'avoir accepté de juger ce manuscrit. Il m'a été particulièrement agréable et réconfortant de bénéficier de son enthousiasme scientifique. Je lui exprime toute mon estime.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Pascal ROYER, Professeur associé à l'Université de Technologie de Troyes, et à Monsieur Patrick SETA, Directeur de Recherche au CNRS dans le Laboratoire des Matériaux et Procédés Membranaires, à Montpellier d'avoir accepté de participer à ce jury.

Que Madame Marie-Laure VIRIOT, Directrice de Recherche au CNRS, soit assurée de mon profond respect. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée il y a trois ans mais également pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès, nationaux ou internationaux, qui m'ont aidée à élargir les perspectives de ce travail. Ses qualités humaines et scientifiques m'ont permis de mener cette recherche dans les meilleures conditions.

Toute ma gratitude et mon amitié vont à Madame Marie-Christiane CARRE, Chargée de Recherche à l'INSERM, qui m'a guidée durant mes travaux de recherche. Je veux lui dire ici combien j'ai apprécié ses compétences scientifiques, mais aussi et avant tout ses qualités humaines, son soutien moral de tous les instants et la gentillesse dont elle a toujours fait preuve à mon égard.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur Francis BAROS pour avoir initié ce travail. Ses suggestions et remarques m'ont apporté une aide précieuse pour la mise au point de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Renaud BACHELOT pour la qualité de son travail de thèse qui m'a beaucoup apporté dans le domaine du champ proche.

Toute mon estime va également vers Mesdemoiselles Bénédicte ZUSATZ et Anna ABELE qui ont contribué à ce travail.

Au cours de cette thèse, j'ai eu le privilège de collaborer avec d'autres équipes de recherche, et à ce titre je remercie Monsieur Jean-François STOLTZ, pour m'avoir accueillie dans le Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie de la Faculté de Médecine, à Vandœuvre-les-Nancy.

J'exprime toute ma gratitude à Madame Sylvaine MULLER, Chargée de Recherche à l'INSERM, pour son aide précieuse. Elle a, par son expérience du domaine biomédical, su apporter beaucoup à ce travail, mais également par ses précieux conseils et ses encouragements au cours de cette dernière année. J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur Dominique DUMAS, Ingénieur d'études au CNRS, pour sa disponibilité et son aide.

Que Monsieur Peter VAN HOPPEN trouve ici le témoignage de toute ma gratitude pour l'aide précieuse qu'il a pu m'apporter pendant toute la durée de mon séjour en Belgique. Qu'il soit assuré de ma plus profonde reconnaissance et de mon amitié pour le courage qu'il m'a donné, son soutien et sa gentillesse.

Mes remerciements vont également vers Madame Mireille DONNER, Directeur de Recherche à l'INSERM, pour son implication dans la culture de cellules biologiques.

Que Monsieur Serge MONNERET, Chargé de Recherche au CNRS, et dernier entrant dans notre Laboratoire, soit assuré de ma reconnaissance pour ses précieux conseils et son aide à la rédaction de la dernière partie de mon mémoire.

Je ne saurais oublier de remercier Messieurs Gérard DELAVEAU, Pierre POMMIER, Alain PATERNOTTE et André VICHERAT qui ont mis tout leur savoir-faire pour la contribution technique à de nombreuses expériences. Qu'ils soient assurés de ma sympathie.

Que Mesdames André WALLERICH, Nicole GROOS, Denise HAGNIER ainsi que Mademoiselle Valérie WARTH soient remerciées pour la diligence dont elles ont fait preuve chaque fois qu'il m'a fallu faire appel à leurs services. Je les remercie également pour leur bonne humeur et leur soutien quotidien, et les assurent de toute ma reconnaissance.

Un très grand MERCI à l'ensemble de mes camarades du Département de Chimie-Physique des Réactions et du Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, d'hier et d'aujourd'hui, pour leur amitié et leur soutien qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans une excellente ambiance. Je me tourne plus particulièrement vers les occupants de "la grande salle" qui ont su égayer ces journées de rédaction : merci à Virginie, Fred, Caroline et Fabrice.

Ce fut un véritable plaisir de travailler jour après jour aux côtés de Mademoiselle Catherine HINCZEWSKI. Nous avons commencé nos thèses le même jour et à sept jours d'intervalle nous connaissons la même épreuve. Je lui souhaite une grande réussite pour la suite, à bientôt Cat'.

Enfin, que Mesdemoiselles Claire PAVIER, Muriel JOURDAN et Patricia QUELLEC trouvent en ces quelques lignes l'expression de toute mon amitié.

Je ne peux refermer cette page sans avoir remercié les personnes qui me sont les plus chères :

MERCI à mes parents sans qui rien n'aurait été possible, à ma sœur, à ma famille Grenobloise et Nancéienne pour leur présence et leur soutien au cours des bons, comme des mauvais moments, qui ont traversé ces trois années. Enfin, un grand MERCI à mon mari, Franck, pour sa présence à mes côtés et son aide incommensurable.

AVANT-PROPOS

L'activité de recherche, que j'ai menée au cours de ma thèse avait pour objectif la recherche et l'élaboration de nouveaux traceurs fluorescents* qui puissent répondre à au moins deux critères :

- permettre des études dans des milieux biologiques et,
- développer des observations en microscopie optique en champ proche.

Ce travail a été réalisé, pour la majeure partie, au Département de Chimie-Physique des Réactions, dans le Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie (DCPR-GRAPP, UMR 7630 CNRS-INPL, Groupe ENSIC).

Cette étude a été menée dans le cadre de recherches se situant à l'interface physique-chimie-biologie, grâce aux compétences du DCPR-GRAPP, pour l'aspect chimie-physique et à l'expérience de nos partenaires du domaine biomédical pour l'aspect biologie.

* Tout au long du manuscrit, nous parlerons indifféremment de rotors, traceurs ou sondes fluorescent(e)s.

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

SOMMAIRE..... 4

I.1. INTRODUCTION 5

I.2. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS 7

I.3. LES PRINCIPALES CLASSES DE COMPOSES TICT..... 15

I.4. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS ETUDIES AU DCPR-GRAPP..... 18

I.5. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS DERIVES DES COUMARINES..... 25

I.6. CONCLUSION..... 38

CHAPITRE II : SYNTHESE DES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

SOMMAIRE..... 40

II.1. OBJECTIF DE LA SYNTHESE..... 41

II.2. MATERIELS ET METHODES PHYSICO-CHIMIQUES 43

II.3. DESCRIPTION DES METHODES DE SYNTHESE..... 45

II.4. PROTOCOLES DE SYNTHESE ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES 55

II.5. CONCLUSION..... 66

CHAPITRE III : PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

SOMMAIRE..... 67

III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE..... 69

III.2. MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE 71

III.3. ETUDE DES DERIVES BENZIMIDAZOLE ET THIOPHENE..... 79

III.4. ETUDE PHOTOPHYSIQUE EN EXCITATION STATIONNAIRE DES
ROTORS COUMARINE 82

III.5. ETUDE PHOTOPHYSIQUE DYNAMIQUE DES ROTORS COUMARINE CNCOOEt,
CNCONHGlu et CNCONHGluAc 104

III.6. COMPARAISON DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS GLUCIDIQUES
DE TYPE COUMARINE ET DES ROTORS GLUCIDIQUES DES TYPES BENZYLIDENE ET
CINNAMYLDENE..... 111

III.7. CONCLUSION..... 114

SOMMAIRE GENERAL

ANNEXES.....	117
Annexe 1	117
Annexe 2	123

CHAPITRE IV : APPLICATION DES SONDES FLUORESCENTES A DES MILIEUX BIOLOGIQUES

SOMMAIRE	129
IV.1. INTRODUCTION.....	131
IV.2. UTILISATION DES SONDES FLUORESCENTES POUR L'ETUDE DE SYSTEMES MOLECULAIRES ORGANISES DE TYPE LIPOSOMES.....	132
IV.3. INCORPORATION DES SONDES FLUORESCENTES DANS DES CELLULES ENDOTHELIALES	153
IV.4. CONCLUSION	171
ANNEXE	173

CHAPITRE V : IMAGERIE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE

SOMMAIRE	180
V.1. INTRODUCTION.....	181
V.2. LA MICROSCOPIE EN CHAMP PROCHE - HISTORIQUE ET PRINCIPE.....	183
V.3. EVOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE VERS DES APPLICATIONS D'INTERET BIOLOGIQUE.....	210
V.4. CONCLUSION	225

CONCLUSION GENERALE.....	227
---------------------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE	233
----------------------------	------------

Abréviations scientifiques

AcOEt	acétate d'éthyle
AFM	"atomic force microscope"
CCM	chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	chloroforme
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
Cx	canaux
DCCI	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DiOC ₆	"3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide"
DMABE	4-(N,N-diméthylamino)benzoate d'éthyle
DMABN	4-(N,N-diméthylamino)benzotrile
DMASCM	4-(N,N-diméthylamino)-stilbène-4'-carboxylate de méthyle
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique (équivalent à absorbance)
DPPC	DL- α -dipalmitoylphosphatidylcholine
éq.	équivalent
EtOH	éthanol
FC	état de Franck-Condon
Gly	glycérol
HCl	acide chlorydrique
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
ICT	"intramolecular charge transfer"
IR	infrarouge
LUV	"large unilamellar vesicles"
MeOH	méthanol
MgSO ₄	sulfate de magnésium
MgO	oxyde de magnésium
MLV	"multilamellar vesicles"
mol	mole(s)
mol.	molaire
NA	"numerical aperture" : ouverture numérique
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH	hydroxyde de sodium
NaIO ₄	periodate de sodium
NH ₄ OH	hydroxyde d'ammonium
OsO ₄	tétroxyde d'osmium

ABREVIATIONS et SYMBOLES

PM	photomultiplicateur
PMMA	poly(méthacrylate de méthyle)
PBS	"phosphate buffer saline"
POCl ₃	oxychlorure de phosphore
PSTM	"photon scanning tunneling microscope"
PVS	polysulfate de vinyle
RMN ¹ H	résonance magnétique nucléaire du proton
RSNOM	"reflection scanning near-field optical microscope"
SNOM	"scanning near-field optical microscope"
STM	"scanning tunneling microscope"
SUV	"small unilamellar vesicles"
THF	tétrahydrofurane
TICT	"twisted intramolecular charge transfer"
TMA-DPH	(1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène <i>p</i> -toluènesulfonate)
TPC	temps par canal
ua	unité arbitraire
UV	ultraviolet
ULM	"umbrella-like motion"
Vis	visible
v/v	volume/volume

Symboles

C	concentration (mol.L ⁻¹ ou M)
c	vitesse de la lumière (3.10 ⁸ m.s ⁻¹)
E _a	énergie d'activation (kcal/mol ou kJ/mol)
δ	déplacements chimiques en RMN
ε	coefficient d'extinction molaire (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
ε	constante diélectrique
φ _f	rendement quantique de fluorescence
h	constante de Planck (h = 6,62.10 ⁻³⁴ J.s)
η	viscosité (cP)
I, I ₀ , I _a	intensité lumineuse (incidente, absorbée)
I _f	intensité de fluorescence
I _{f max}	intensité de fluorescence au maximum d'émission
k _{nr}	constante de désactivation non radiative
k _r	constante de désactivation radiative
l	trajet optique

ABREVIATIONS et SYMBOLES

λ	longueur d'onde (nm)
$\lambda_{a \max}$	longueur d'onde d'absorption maximale (nm)
λ_{ex}	longueur d'onde d'excitation (nm)
λ_{f}	longueur d'onde d'émission de fluorescence (nm)
$\lambda_{\text{f max}}$	longueur d'onde au maximum d'émission de fluorescence (nm)
M	mol.L ⁻¹
M	masse molaire (g/mol)
$\bar{\mu}$	moment dipolaire à l'état fondamental
$\bar{\mu}^*$	moment dipolaire à l'état excité
ν	fréquence (Hz)
$\bar{\nu}$	nombre d'onde (cm ⁻¹)
R	constante des gaz parfaits (R = 8,314 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
S ₀ , S ₁	états singulets (fondamental, premier état excité)
t	temps
τ	durée de vie (s ou ns ou ps)
T	température (°C ou K)
T _M	température de transition de phase ("main transition")
T _p	température de pré-transition

INTRODUCTION

GENERALE

Au cours de ces dernières décennies, où les techniques d'analyse demandent de plus en plus d'efficacité et de polyvalence, la spectroscopie de fluorescence a pris un essor considérable dans bon nombre d'applications. Polymères, systèmes micellaires, membranes biologiques, protéines, acides nucléiques et cellules vivantes sont des exemples bien connus de systèmes pour lesquels l'estimation de paramètres locaux, comme la polarité, la fluidité, la mobilité moléculaire, le pH ou le potentiel électrique est possible grâce à l'utilisation de traceurs fluorescents. Leur succès s'est accru en raison de la sensibilité des techniques fluorimétriques, des changements spécifiques des propriétés de fluorescence de la sonde avec son environnement et de la capacité du traceur à fournir des informations sur des phénomènes rapides.

La localisation exacte du traceur fluorescent dans une cellule vivante est primordiale pour une bonne interprétation des informations qu'il transmet. Selon le problème à étudier, la sonde fluorescente doit cibler la membrane plasmique, le cytoplasme, la membrane des organites ou les organites eux-mêmes. Par exemple, pour des mesures de pH ou de concentration d'ions intracellulaires (Ca^{2+} , K^+), il est important d'avoir un traceur libre de se mouvoir à l'intérieur du cytoplasme, alors que pour des études de fluidité membranaire, il est nécessaire que le traceur se maintienne au sein de la membrane.

Le futur des sondes fluorescentes est donc très certainement lié à la synthèse de nouveaux fluorophores plus sélectifs, et actuellement, l'utilisation combinée de plusieurs sondes est en pleine expansion. En utilisant des domaines précis d'excitation et d'émission, il devient facile de suivre simultanément plusieurs paramètres physiologiques comme le potentiel membranaire et le pH, ou le pH et la concentration en calcium, ou bien les trois combinés.

Pour répondre à ces nouveaux besoins, nous nous sommes intéressés aux rotors moléculaires fluorescents connus depuis 1962 pour leurs caractéristiques photophysiques bien particulières puisque leur émission de fluorescence est sensible aux modifications de l'environnement moléculaire (polarité, viscosité, température, pression, pH...). De nombreux travaux sont consacrés à l'élaboration de divers rotors moléculaires fluorescents, ainsi qu'à l'étude et à la compréhension de leurs propriétés photophysiques. Une grande majorité des études dans ce domaine concernent les dérivés simples du benzène substitué par des groupements donneur et accepteur situés en para l'un de l'autre.

A un degré moindre, certains composés hétérocycliques ont également été retenus pour la particularité de leurs propriétés d'émission de fluorescence. En particulier les dérivés 7-(N,N-dialkylamino)coumarine ont été abondamment décrits depuis 1975, ces composés étant actuellement en pleine expansion dans leur utilisation en tant que sondes biologiques fluorescentes.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans cette stratégie de recherche de nouveaux traceurs fluorescents, dérivés de 7-(N,N-dialkylamino)coumarine ayant des caractéristiques photophysiques sensibles aux modifications de l'environnement moléculaire et pouvant présenter un intérêt potentiel pour des applications biologiques.

L'objectif principal a consisté à étudier les propriétés photophysiques relatives au milieu d'étude, de composés 7-(N,N-dialkylamino)coumarine substitués en position-3 par des fonctions acides, esters ou amides, afin de préparer des composés fluorogéniques capables de réactions spécifiques vis-à-vis de groupements fonctionnels présents dans les organites subcellulaires.

Parallèlement, ces organites étant souvent de taille inférieure au micromètre, il semblait intéressant de pouvoir suivre le comportement de ces traceurs fluorescents au sein de ces organites par une technique de microscopie en plein essor depuis ces dix dernières années : la microscopie optique en champ proche (SNOM). Cette étude comporte donc un second objectif, lié au premier par notre intérêt pour des applications relatives au domaine biologique : le développement d'un appareil SNOM commercial pour l'observation de la fluorescence de cellules biologiques, marquées avec des rotors moléculaires fluorescents. La condition nécessaire, mais non suffisante pour pouvoir unir ces deux objectifs étant de disposer de sondes fluorescentes qui puissent répondre à au moins deux critères :

- permettre des études dans des milieux biologiques en utilisant une lumière excitatrice au-delà de 450 nm, domaine d'absorption des composants cellulaires et,
- développer des observations de fluorescence par microscopie optique en champ proche. Cela nécessite l'utilisation d'échantillons dans lesquels sont incorporés des traceurs fluorescents dont la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm (longueur d'onde du laser argon disponible sur l'appareil).

Bien qu'il existe de nombreux fluorophores dont la longueur d'onde d'excitation se situe autour de 488 nm (rhodamine 123, acridine orange, fluorescéine...), notre objectif est de pouvoir marquer les échantillons à observer par des traceurs fluorescents spécifiques permettant de caractériser les propriétés de leur environnement immédiat.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous rappelons brièvement la définition et le comportement de rotors moléculaires fluorescents de base : les dérivés du 4-(N,N-diméthylamino)benzotrile. Nous décrivons ensuite les différents rotors déjà synthétisés et étudiés dans notre équipe avant d'aborder une brève étude sur les coumarines où nous montrons l'importance des différents substituants présents sur un type bien particulier de dérivés coumarine : la classe des 7-(N,N-dialkylamino)coumarines, du fait de leur fluorescence située dans la partie bleu-verte du spectre visible.

La synthèse des dérivés 7-(N,N-dialkylamino)coumarine substitués en position-3 est décrite dans le chapitre II. Plusieurs composés fluorescents ont été synthétisés puis caractérisés par différentes techniques physico-chimiques.

Le chapitre III regroupe les résultats de l'étude du comportement photophysique des nouveaux rotors moléculaires. L'objectif est de déterminer d'une part leurs propriétés d'absorption photonique et d'autre part leurs propriétés d'émission de fluorescence, tant en excitation continue, qu'en excitation pulsée. Nous avons également mis en évidence les modifications des propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence de ces traceurs en fonction de la polarité, de la viscosité, ou de la température du milieu d'étude.

Le travail présenté dans le chapitre IV a eu pour objectif dans un premier temps, d'étudier des systèmes moléculaires organisés de type liposomes, en ce sens que ces systèmes représentent des modèles de milieux biologiques. Pour une température spécifique, température de transition T_M , le phospholipide subit un changement d'état où l'on observe le passage de l'état de gel (aspect rigide ordonné) à l'état de cristal-liquide (aspect fluide désordonné). Ainsi, l'état physique de la bicouche phospholipidique représente une importante propriété des liposomes et nous montrons qu'il est possible, au moyen de ces nouveaux traceurs fluorescents, de déterminer la température de transition T_M des phospholipides.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le comportement de ces traceurs au sein d'une monocouche de cellules endothéliales afin de connaître la spécificité de nos sondes et de pouvoir utiliser la double potentialité des rotors moléculaires, à renseigner sur les variations de polarité et de viscosité, qui pourraient permettre de suivre les modifications métaboliques survenant dans des organites subcellulaires.

L'acquisition par notre laboratoire en 1995 d'un microscope optique à champ proche a facilité le second objectif de ce travail de thèse, qui fut de développer des applications de cette technique pour des observations de milieux biologiques.

Nous avons subdivisé le chapitre V en deux parties distinctes. Puisque ce travail représente la première contribution du DCPR-GRAPP dans le domaine des applications liées à la microscopie optique en champ proche, et dans la mesure où cette technique est encore assez peu répandue, nous avons en première partie de ce chapitre décrit les trois grandes familles de microscopies en champ proche, à savoir la microscopie à effet tunnel, la microscopie à force atomique et la microscopie optique en champ proche, en mettant l'accent sur cette dernière.

Dans une seconde partie, nous décrivons l'évolution de nos résultats expérimentaux dans le domaine biologique ainsi que les modifications qu'il a fallu apporter à l'appareil commercial pour pouvoir observer la fluorescence d'échantillons biologiques marqués par différents fluorophores.

Finalement, nous avons rassemblé les principales conclusions de cette étude, et exposé les perspectives qui s'ouvrent à la lumière des résultats.

CHAPITRE I

**ETAT DE L'ART SUR LES ROTORS MOLECULAIRES
FLUORESCENTS**

I.1. INTRODUCTION	5
I.2. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS	7
I.2.1. DEFINITION.....	7
I.2.2. CONCEPT DE L'ETAT TICT A PARTIR DES ROTORS DU TYPE 4-(N,N-DIALKYLAMINO)BENZENE SUBSTITUE.....	8
<i>A/ Concept de l'état TICT.....</i>	8
<i>i/ Influence de la structure du composé.....</i>	8
<i>ii/ Schémas cinétiques et voies de relaxation.....</i>	10
<i>B/ Facteurs d'influence pour la formation de l'état TICT.....</i>	12
<i>i/ Influence de la polarité du solvant.....</i>	12
<i>ii/ Influence de la nature des substituants.....</i>	13
<i>iii/ Influence de la viscosité du solvant.....</i>	13
I.3. LES PRINCIPALES CLASSES DE COMPOSES TICT	15
I.3.1. LES AMINES AROMATIQUES.....	15
I.3.2. LES ARYL-ANILINES.....	16
I.3.3. LES HETERO-AROMATIQUES.....	17
I.4. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS ETUDIES AU GRAPP	18
I.4.1. CAS DES DERIVES DE TYPE BENZENE.....	19
I.4.2. CAS DES DERIVES DE TYPE BENZYLIDENE ET CINNAMYLIDENE.....	19
<i>A/ Composés de type benzylidène.....</i>	20
<i>B/ Composés de type cinnamylidène.....</i>	21
I.4.3. CAS DES DERIVES DE TYPE STILBENE.....	21
I.5. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS DERIVES DES COUMARINES	25
I.5.1. EVOLUTION DE DIFFERENTES STRUCTURES COUMARINIQUES.....	25
<i>A/ Influence de l'alkylation du groupement amino sur les propriétés photophysiques.....</i>	26
<i>B/ Rôle et influence du substituant en position-4.....</i>	29
<i>C/ Influence du milieu sur les propriétés photophysiques.....</i>	30
<i>D/ Modèles proposés pour un déclin non radiatif.....</i>	31
<i>i/ Concept de l'état TICT.....</i>	31
<i>ii/ Modèle ULM ("Umbrella-Like Motion").....</i>	34
I.5.2. DERIVES DU TYPE 7-(N,N-DIALKYLAMINO)COUMARINE SUBSTITUES EN POSITION-3.....	35
I.6. CONCLUSION	38

I.1. INTRODUCTION

Les traceurs fluorescents sont largement étudiés dans des domaines tout aussi variés que la physique, la chimie, la biologie et les sciences médicales pour l'investigation de la structure et de la dynamique de la matière de systèmes vivants (tableau (I.1).1).

DOMAINE D'APPLICATION	INFORMATION
Polymères	Dynamique des chaînes polymères, volume libre, orientation des chaînes dans le cas d'échantillons étirés, miscibilité, séparation de phase, diffusion d'espèces à travers une matrice de polymères, suivi de polymérisation
Surfaces solides	Nature de la surface de silice colloïdale, d'argile, de gels de silice : rigidité, polarité et modifications de surface
Surfactants	Concentration micellaire critique, nombre d'agrégation, propriétés d'interface, polarité, dynamique des solutions de surfactants, transition de phase, influence d'additifs
Membranes biologiques	Fluidité, interactions lipides-protéines, sites accessibles, changements structuraux, changements induits par la lumière, effets d'additifs, localisation de protéines
Vésicules	Caractérisation de la bicouche, microviscosité, transition de phase, pH interne, perméabilité
Protéines	Sites de liaisons, sites accessibles, dynamique, distance, transitions conformationnelles
Acides nucléiques	Flexibilité, torsion dynamique, structure hélicoïdale, coupure photonique
Cellules vivantes	Visualisation de membranes, de lipides, de protéines, d'ADN, de la surface d'antigènes, étude de la dynamique des membranes, de la perméabilité, du pH intracellulaire, des concentrations cytoplasmiques en calcium, sodium, de l'activité enzymatique, des interactions cellules-cellules et cellules-virus, de la fusion des membranes, de la viabilité, de l'activité cytotoxique

Tableau (I.1).1

Informations fournies par les traceurs fluorescents
dans différents domaines [Valeur, 1993].

Les rotors moléculaires fluorescents sont des traceurs dont les propriétés d'émission de fluorescence dépendent d'une rotation interne. Pour cette raison, ils sont très utilisés pour l'étude de volume libre, de mobilité de chaînes ou de microhétérogénéité dans des matrices de polymères. Ils se sont également avérés très intéressants pour l'étude de systèmes moléculaires organisés et plus précisément de systèmes biologiques modèles, et c'est l'une des raisons pour laquelle nous en avons fait notre traceur de prédilection.

Dans ce premier chapitre, après une brève définition des rotors moléculaires fluorescents, nous rappellerons les caractéristiques des rotors moléculaires de type 4-(N,N-dialkylamino)benzène substitué qui ont fait l'objet de nombreuses études. Puis, nous ferons un récapitulatif des différents rotors qui ont été synthétisés et étudiés au DCPR-GRAPP avant d'aborder une brève étude sur les coumarines, composés qui sont largement utilisés en tant que traceurs biologiques fluorescents [Hoult, 1996]. Bien que leurs propriétés de fluorescence dépendent pour beaucoup de la position et du type des substituants présents sur le motif coumarinique, la grande majorité des coumarines absorbe la lumière largement au-dessus de 330 nm ce qui permet une excitation en dehors des limites d'absorption des protéines et des acides nucléiques.

En dernière partie de ce chapitre, nous montrons l'importance des différents substituants présents sur un type bien particulier de dérivés coumarine : la classe des 7-aminocoumarines, du fait de leur fluorescence située dans la partie bleu-verte du spectre visible.

Enfin, nous concluerons ce chapitre bibliographique en expliquant et en justifiant la sélection des différents composés coumariniques que nous avons choisis de synthétiser et d'étudier.

I.2. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

I.2.1. DEFINITION

Les rotors moléculaires sont des composés qui par absorption photonique entraînent la formation d'état(s) électronique(s) excité(s) qui peut(vent) se relaxer au moins par deux voies :

- des processus radiatifs, dont la fluorescence,
- des processus non radiatifs, dont des rotations internes, des isomérisations, etc.

Ces derniers processus dépendent, entre autres, de la viscosité du milieu, de l'espace accessible pour une(des) rotation(s) et de la participation des molécules du solvant.

Ces rotors, constituent des capteurs photophysiques sensibles à l'environnement moléculaire. En particulier, leur rendement quantique de fluorescence varie avec la rigidité de la molécule, la viscosité du solvant, la température, etc. [Loutfy, 1982]. La position de leur(s) longueur(s) d'onde d'émission de fluorescence dépend de la polarité du milieu [Rettig, 1994].

L'intérêt principal de ce type de sonde réside dans la faible durée de vie de l'état excité formé qui, après transfert radiatif (fluorescence) vers l'état fondamental, redonne le produit de départ. Parallèlement à cette émission de fluorescence, et selon les degrés de liberté, un groupement particulier de la molécule peut subir une rotation partielle et conduire à un transfert radiatif à partir d'un état TICT ("Twisted Intramolecular Charge Transfer") ou à un transfert non radiatif favorisé. En effet, dans la majorité des cas, la structure chimique des rotors fait intervenir la juxtaposition de deux groupes, l'un donneur et l'autre accepteur, séparés par une jonction plus ou moins longue mais permettant un transfert de charge intramoléculaire à l'état excité et la plupart du temps une torsion de la molécule, à l'image de la représentation de la [figure \(I.2\).1](#).

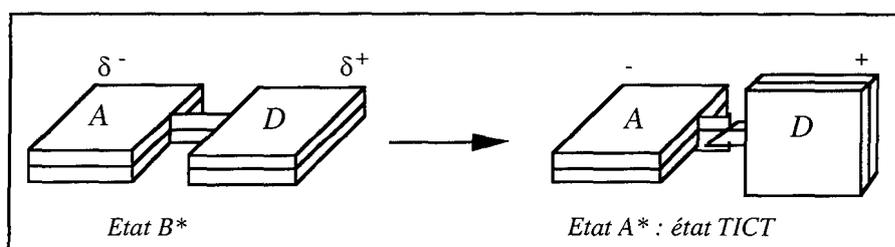


Figure (I.2).1

Représentation du transfert de charge intramoléculaire à l'état excité et du changement d'arrangement géométrique des groupes donneur et accepteur.

D'une manière générale, le comportement photophysique des rotors moléculaires est largement lié à leur structure chimique. En particulier, leur comportement en terme d'émission de fluorescence dépend des possibilités de rotation de la molécule et de la présence de conjugaison complémentaire, au noyau benzénique par exemple.

I.2.2. CONCEPT DE L'ETAT TICT A PARTIR DES ROTORS DU TYPE 4-(N,N-DIALKYLAMINO)BENZENE SUBSTITUE

La découverte par Lippert et al. en 1962 de la fluorescence double du DMABN (figure (I.2).2), un dérivé simple du benzène substitué par des groupements donneur-accepteur, et les études qui ont suivi par Grabowski et al. en 1979, sur des composés modèles dérivés (MIN, TMABN, CBQ : figure (I.2).2), ont donné naissance au concept de l'état TICT, état twisté à transfert de charges intramoléculaire.

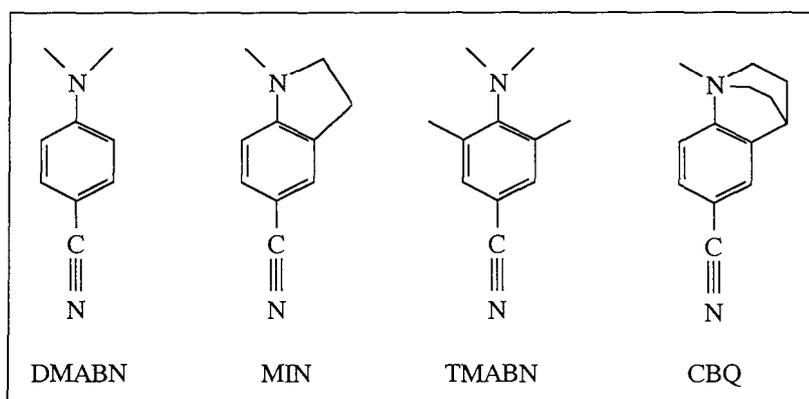


Figure (I.2).2
Représentation schématique de
différents modèles présentant un état TICT.

A/ Concept de l'état TICT

i/ Influence de la structure du composé

Ce concept permet une interprétation de la fluorescence double observée pour le 4-(N,N-diméthylamino)benzonitrile (DMABN) : ce composé présente une bande d'émission de fluorescence dite "normale" autour de 350 nm (bande B) et une bande dite "anormale" (bande A) apparaissant dans les solvants polaires autour de 450 nm, qui dépend de la liberté de conformation du groupement diméthylamino et dont l'orbitale contenant les deux électrons libres peut être parallèle ou perpendiculaire au système des orbitales π du cycle benzénique.

Pour une molécule de type donneur-accepteur pouvant posséder un état TICT, les groupements donneur (D) et accepteur (A) sont généralement coplanaires dans l'état fondamental et dans l'état excité de Franck-Condon (état FC) initialement atteint. Pour la conformation perpendiculaire TICT, les orbitales π du donneur (groupement diméthylamino) et de l'accepteur (groupement nitrile) sont orthogonales et ne se recouvrent pas, elles ne sont donc pas couplées, ce qui conduit à un moment dipolaire maximal dans cet état excité et minimal dans l'état fondamental.

Pour la conformation plane (état B*) il existe une interaction mésomère entre les groupements donneur et accepteur qui conduit ensuite à une séparation de charges dans l'état TICT.

Ces systèmes possèdent donc un double minimum de potentiel pour l'état excité : en plus du minimum d'énergie correspondant à la géométrie plane, il existe un minimum d'énergie inférieur avec une séparation totale des charges (pas d'interaction mésomère entre D et A) correspondant à la géométrie perpendiculaire de l'état TICT (figure (I.2).3).

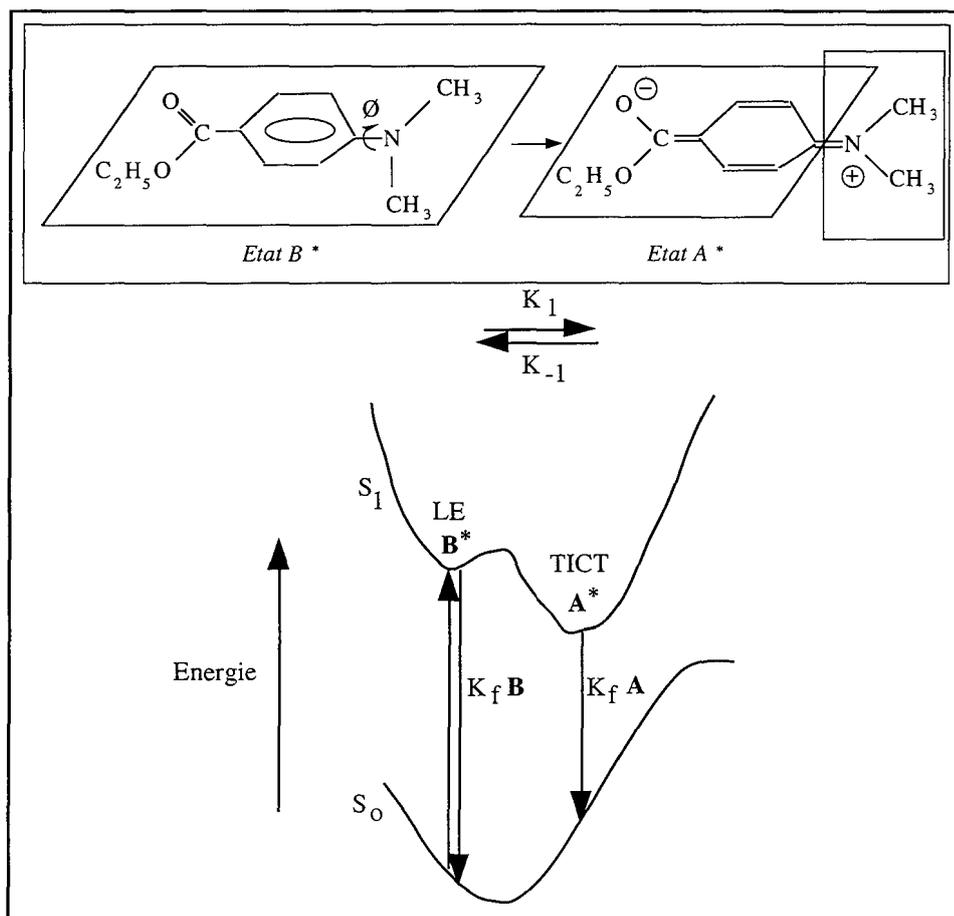


Figure (I.2).3

Fluorescence du composé modèle 4-(N,N-diméthylamino)benzoate d'éthyle (DMABE) : dynamique et représentation schématique de la surface d'énergie potentielle pour la réaction $B^* \leftrightarrow A^*$.

Par absorption photonique, l'état excité localisé plan, LE ou état B*, est d'abord peuplé, avec peu de changement du moment dipolaire permanent de la molécule. Ensuite, dans les solvants polaires, il y a un rapide transfert de charge intramoléculaire. Ce processus, favorisé par la formation d'un état avec séparation de charges, stabilisé par rotation autour de la liaison du groupe amino avec le groupe phényle, provoque le transfert d'électrons d'un état excité plan à un état polaire TICT : les deux états excités A* (TICT) et B* émetteurs de fluorescence sont en équilibre thermique [Rettig, 1986] et l'équilibre entre ces deux états s'établit pendant la durée de vie de l'état excité [Hicks, 1985].

Rotkiewicz et Rubaszewska, 1980, ont été les premiers à proposer la dynamique de relaxation du DMABN (figure (I.2).2) qui implique une torsion interne du groupe diméthylamino, couplée avec un transfert d'électrons de l'azote soit à l'orbitale p^*_y (plane) du groupe cyano, soit à l'orbitale p^*_z du groupe benzonitrile.

Ainsi, il existe à l'état excité une réaction qui conduit à partir de la conformation plane (responsable de l'émission de la bande B) à un produit possédant un minimum d'énergie pour la conformation perpendiculaire (responsable de l'émission de la bande A).

Pour des composés comme le MIN (figure (I.2).2) qui possède une structure rigide avec une conformation coplanaire pour le groupe dialkylamino et le squelette benzonitrile, seule la bande B est observée ($\varnothing = 0^\circ$; la torsion du groupe dialkylamino est empêchée) [Baumann, 1992 ; Grabowski, 1979].

Par contre, des molécules fixées de façon rigide à la position perpendiculaire ($\varnothing \approx 90^\circ$) ne présentent que la bande A (comme pour le composé CBQ, figure (I.2).2) [Rotkiewicz, 1980].

ii/ Schémas cinétiques et voies de relaxation

Les cinétiques du processus de relaxation de l'état excité sont résumées sur la figure (I.2).4 qui représente les constantes d'équilibre k_{BA} et k_{AB} ainsi que les constantes de déclin radiatif (k_{f_B} et k_{f_A}) et non radiatif (k_{nr_B} et k_{nr_A}) vers l'état fondamental.

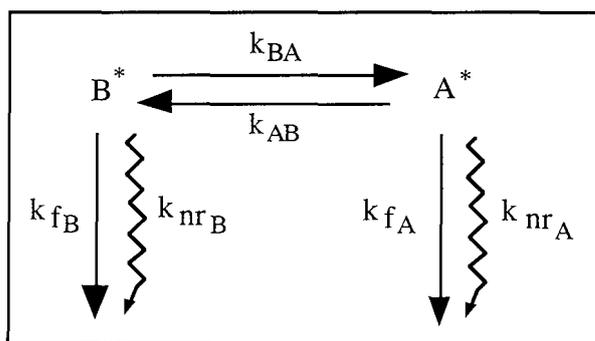


Figure (I.2).4
Schémas cinétiques.

Les énergies d'activation de la réaction réversible $B^* \leftrightarrow A^*$ représentent la barrière d'énergie intrinsèque et la barrière dynamique due aux propriétés de viscosité du solvant. De plus, la réaction $B^* \rightarrow A^*$ implique d'autres phénomènes que la rotation autour de certaines liaisons. En effet, dans le cas du DMABN, cette transition implique :

- la rotation intramoléculaire,
- le croisement des états excités et le couplage non adiabatique,
- le complément du transfert de charge,
- la relaxation des molécules de solvants polaires autour de ce dipôle "naissant".

L'existence des états TICT est possible si leur minimum d'énergie est situé sur un niveau plus bas que celui de l'état plan (B^*), cette condition étant exprimée par l'inégalité suivante [Rettig, 1986] :

$$E_{B^*} - E_{TICT} > 0$$

avec : $E_{TICT} = IP(D) - EA(A) + C + E_{solv}$

- E_{B^*} : minimum d'énergie à l'état excité de l'état B^* ,
- E_{TICT} : minimum d'énergie à l'état excité de l'état A^* (état TICT),
- IP : potentiel d'ionisation du groupement donneur,
- EA : affinité électronique du groupement accepteur,
- C : attraction coulombienne mutuelle des groupements donneur et accepteur,
- E_{solv} : énergie de stabilisation polaire par le solvant.

La position du niveau d'énergie de l'état A^* (état TICT) par rapport à celui de l'état B^* dépend des propriétés donneur-accepteur d'électrons des sous-systèmes, représentées par IP et EA. La stabilisation par le solvant et l'attraction coulombienne mutuelle permettent également la stabilisation préférentielle de l'état A^* par rapport à l'état précurseur B^* .

Il faut souligner, que pour expliquer la formation de la deuxième bande d'émission de fluorescence, généralement présente dans les composés de type "benzène" [Rothmund, 1997], plusieurs mécanismes avaient été proposés parallèlement à la notion d'état TICT [Rettig, 1994].

Toutes les propositions allaient dans le sens d'une explication des rôles importants joués par d'une part, la rotation de la liaison entre le groupe amino et le cycle benzénique et d'autre part, la solvatation.

Parmi les propositions, pour expliquer la fluorescence double du DMABN, nous citerons en dehors de l'état TICT :

- l'inversion des niveaux $S_1(^1L_a)/S_2(^1L_b)$ résultant d'un changement de solvant [Lippert, 1987],
- la formation d'un exciplexe avec le solvant [Visser, 1985],
- la formation d'un complexe avec le solvant [Kosower, 1983],
- la formation de dimère à l'état fondamental et/ou la formation d'excimère [Khalil, 1976],
- le transfert d'un proton à l'état excité [Kosower, 1976],
- la solvatation spécifique avec une ou plusieurs molécules d'eau [Cazeau-Dubroca, 1986]
- la rehybridation de l'atome d'azote (forme pyramidale ou forme planaire) [Schuddeboom, 1992 ; Zachariasse, 1994].

B/ Facteurs d'influence pour la formation de l'état TICT

La formation de l'état TICT est influencée par plusieurs facteurs, dont la polarité du solvant, l'équilibre conformationnel de l'état fondamental, le caractère électroattracteur des substituants, la viscosité du solvant, etc.

i/ Influence de la polarité du solvant

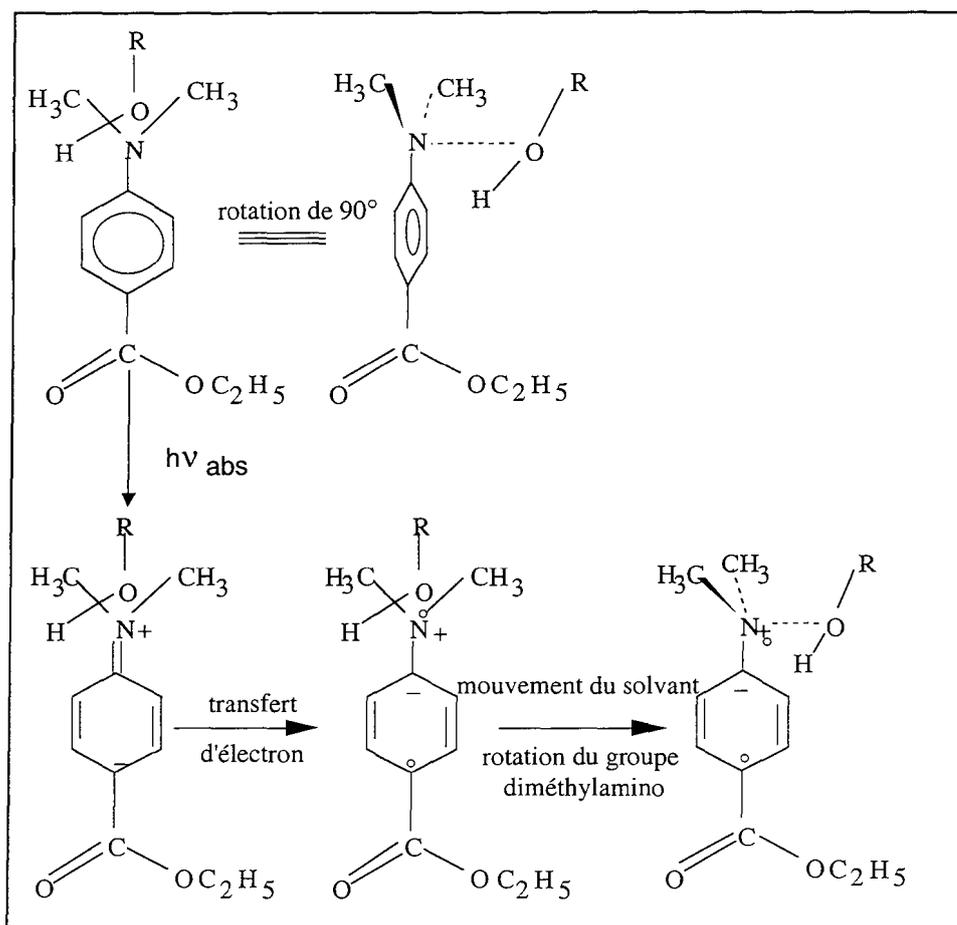


Figure (I.2).5

Intervention du solvant polaire pour la conversion du modèle moléculaire (DMABE) de l'état fondamental à l'état excité à transfert de charge [Kosower, 1985].

Dans les solvants polaires, l'état TICT peut être stabilisé par la réorientation du solvant en entraînant un recouvrement des paires d'électrons du solvant et de ceux du soluté (figure (I.2).5). La mobilité du solvant pourrait contrôler la cinétique de transfert rapide d'électrons [Kosower, 1985].

Pour expliquer ce phénomène, un modèle moléculaire simplifié, basé sur le composé DMABE, illustre les réarrangements moléculaires impliqués dans le processus de transfert d'électrons et un dipôle modèle montre les changements qui interviennent dans les interactions électrostatiques au cours du transfert d'électrons.

ii/ Influence de la nature des substituants

La figure (I.2).6 présente la différence des substituants en terme de charges partielles lors du remplacement du groupe ester du DMABE par un groupe accepteur d'électrons plus fort, comme le groupe nitrile pour fournir le DMABN [Weisenborn, 1989].

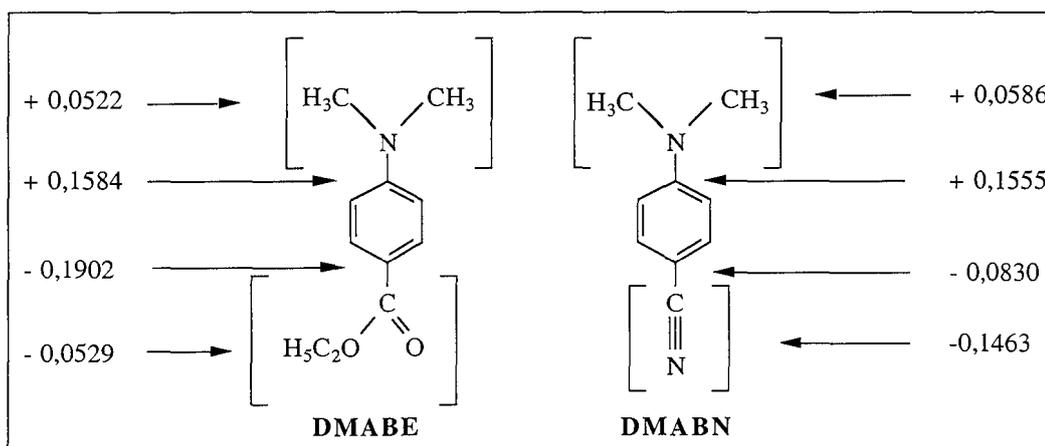


Figure (I.2).6

Densités de charge à l'état fondamental pour les rotors DMABE et DMABN.

Pour des conditions identiques, le rendement de fluorescence de l'état TICT est plus élevé pour l'ester que pour le groupe nitrile [Rettig, 1985], en raison de la formation plus efficace de l'état TICT pour l'ester. De plus, la transition $B^* \rightarrow A^*$ (TICT) est isotherme ou légèrement exothermique pour les esters dans les solvants non polaires, tandis qu'elle est endothermique pour les nitriles [Wermuth, 1983].

iii/ Influence de la viscosité du solvant

La viscosité du solvant est considérée comme un facteur important pour contrôler la vitesse de formation de l'état TICT, en particulier si le processus ne fait pas intervenir une barrière d'énergie [Wermuth, 1981].

La valeur de R (intensité de fluorescence de la bande A/intensité de fluorescence de la bande B : I_A/I_B) est utilisée pour comparer la facilité de formation de l'état A dans différents polymères.

En utilisant un rotor dérivé du 4-(N,N-diméthylamino) benzoate (DMABZ) greffé à des poly(méthacrylates de méthyle) (copDB) (figure (I.2).7), Hayashi et al., 1987, et Tazuke et al., 1990^{a,b}, ont montré que la formation de l'état TICT dépendait de la concentration du polymère et surtout de la viscosité et du volume libre.

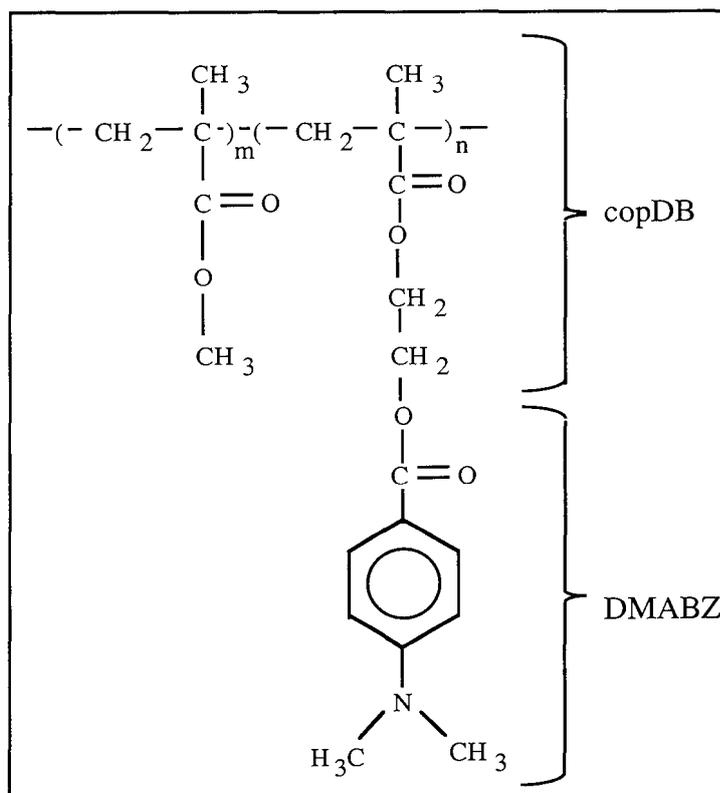


Figure (I.2).7

Schéma représentant le copolymère copDB.

La dépendance de la fluorescence du copolymère avec la pression (donc la viscosité) est corrélée aux changements de volume libre du solvant. L'augmentation de la pression qui entraîne une diminution de l'espace entre le rotor DMABZ greffé et la chaîne principale fait décroître la vitesse de formation de l'état A dans les polymères [Hayashi, 1987].

La formation de l'état TICT rend donc cette sonde fluorescente appropriée pour étudier la mobilité des segments dans une solution. Lorsqu'une petite quantité de rotor est accrochée à un polymère, la formation de l'état TICT est définie par la relation $R = A/B$ qui est contrôlée par la distance de la chaîne principale et par la structure des chaînes voisines ainsi que par la conformation de la chaîne de polymère [Tazuke, 1989]. Une augmentation de l'encombrement des chaînes branchées bloque la croissance de la valeur de R avec le temps.

I.3. LES PRINCIPALES CLASSES DE COMPOSES TICT

Les classes les plus importantes de composés TICT ont été répertoriées dans la publication de Rettig, 1986. Ici, seuls les composés ayant des propriétés caractéristiques seront décrits.

Les composés TICT étudiés jusqu'à maintenant contiennent en majorité des groupements amino substitués. Dans certains cas, ce sont des composés TICT directement actifs, c'est-à-dire que c'est la liaison reliant le groupement amino au reste de la molécule qui subit une rotation. Dans d'autres cas, le groupement amino augmente le caractère donneur de la partie donneur d'électrons, tandis que la rotation a lieu autour d'une autre liaison. Dans le premier cas, on parle de dérivés "amines aromatiques", dans le second cas de dérivés "aryl-anilines".

I.3.1. LES AMINES AROMATIQUES

Parallèlement au DMABN, les dialkylanilines avec d'autres substituants accepteurs ($-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{COOH}$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{CONH}_2$) présentent également une fluorescence double (figure (I.3).1).

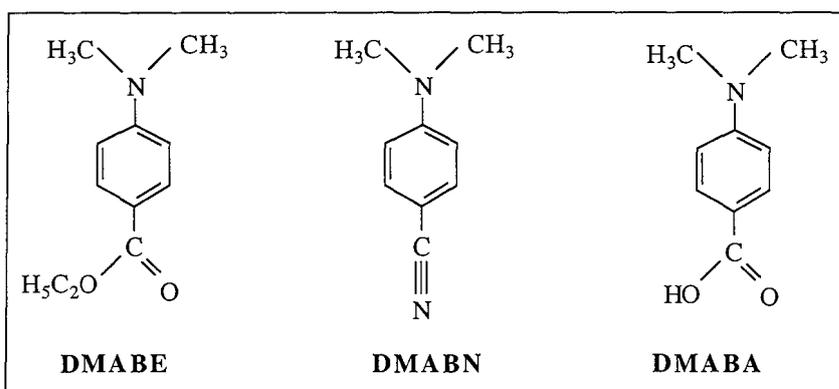


Figure (I.3).1

Exemples d'amines aromatiques.

Dans beaucoup de cas, des composés modèles pontés ou déjà twistés ont permis d'établir la validité du modèle TICT. Des composés tels que le 4-(N,N-diméthylamino) pyridine (DMAPYR) ou le 4-(N,N-diméthylamino) pyrimidine (DMAPYM) (figure (I.3).2) où les substituants accepteurs sont remplacés par une substitution aza, donnent également lieu à une fluorescence duale.

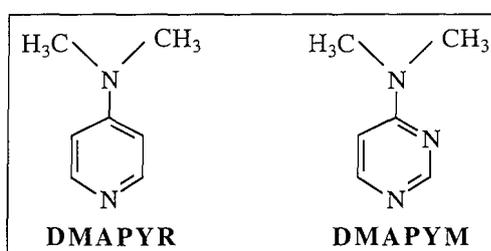


Figure (I.3).2

Composés pontés présentant une fluorescence duale.

I.3.2. LES ARYL-ANILINES

Dans le cas des aryl-anilines (figure (I.3).3), le groupement amino contribue essentiellement à augmenter le caractère électrodonneur de la partie donneur. Ces composés peuvent être comparés au DMABN (composé de type donneur-accepteur) en changeant le groupement accepteur cyano par des groupes aromatiques plus importants tels que le benzonitrile, le naphthalène, l'anthracène, le pyrène, etc.

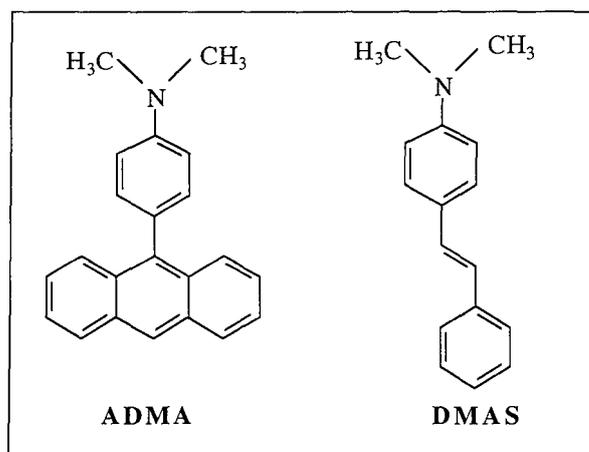


Figure (I.3).3

Composés ayant un groupement accepteur aromatique.

Un des composés les plus étudiés est la ADMA (4-(N,N-diméthylamino)-9-anthracényl benzénamine) dont l'étude du comportement photophysique montre que l'état TICT le plus important est celui impliquant la partie dialkylanilino comme élément donneur, et la partie anthracène comme groupement accepteur.

D'autres composés de ce type étudiés récemment sont les dérivés du stilbène pour lesquels la simple liaison subissant une rotation n'est pas celle du groupement diméthylamino mais celle se trouvant en position-4 de la dialkyl-aniline. Une étude plus détaillée de ce type de composés sera décrite dans la partie I.4.3 de ce chapitre.

I.3.3. LES HETERO-AROMATIQUES

Lorsque le groupement diméthylamino est remplacé par un hétérocycle tel que pyrrole, indole ou carbazole (figure (I.3).4), l'émission de fluorescence est fortement déplacée vers les grandes longueurs d'onde. Ces composés présentent généralement une seule bande d'émission de fluorescence correspondant à la bande "anormale" A*.

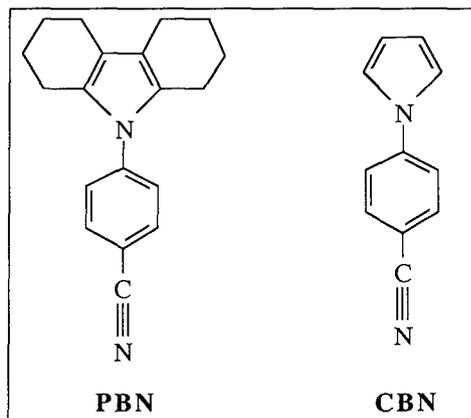
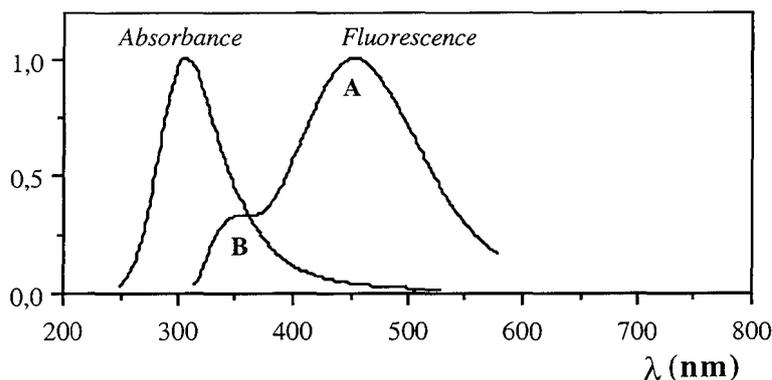


Figure (I.3).4

Composés ayant le groupement diméthylamino remplacé par un hétérocycle azoté.

I.4. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS ETUDIÉS AU GRAPP

De nombreux rotors moléculaires fluorescents absorbant et émettant à diverses longueurs d'onde, ont été étudiés au DCPR-GRAPP dans le cadre de différents projets.



(a)

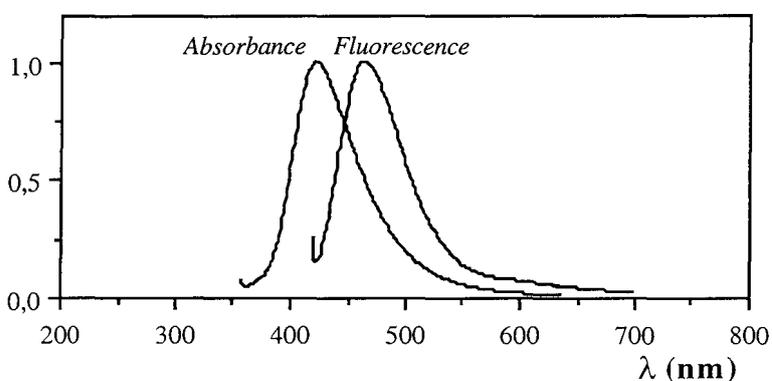
Rotor (0)-COOEt

Type "Benzène"

$\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{emB}} = 349 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{emA}} = 453 \text{ nm}$



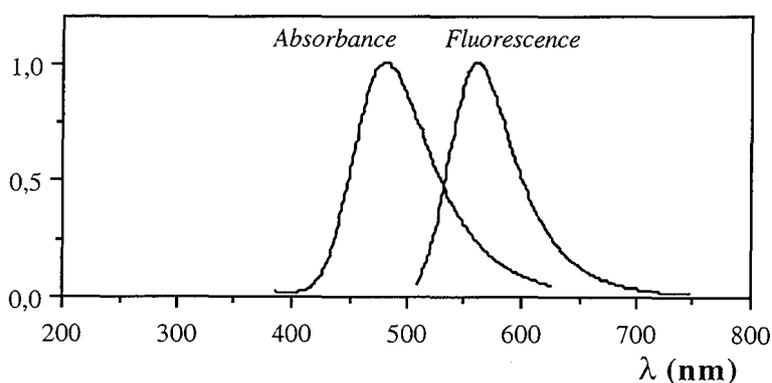
(b)

Rotor (1)-CN

Type "Benzylidène"

$\lambda_{\text{ex}} = 424 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{em}} = 468 \text{ nm}$



(c)

Rotor (2)-CN

Type "Cinnamylidène"

$\lambda_{\text{ex}} = 482 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{em}} = 562 \text{ nm}$

Figure (I.4).1

Spectres normalisés d'absorption UV-Visible et d'émission de fluorescence pour des rotors, dans l'acétate d'éthyle.

I.4.1. CAS DES DERIVES DE TYPE BENZENE

Le 4-(N,N-diméthylamino)benzoate d'éthyle (figure (I.4).2), généralement dénommé DMABE est représentatif des rotors du type "benzène". Dans ce cas, le groupe donneur (N,N-diméthylamino) est relié au groupe accepteur éthoxycarboxyle, à travers le noyau benzénique.

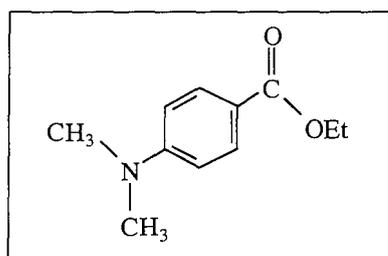


Figure (I.4).2

Le 4-(N,N-diméthylamino)benzoate d'éthyle : DMABE (rotor (0)-COOEt).

Ce rotor, et les dérivés qui en découlent présentent généralement le même comportement photophysique que le DMABN décrit précédemment, à savoir deux bandes d'émission de fluorescence, correspondant à deux états excités qui dépendent fortement de la polarité et de la viscosité de l'environnement moléculaire [Adibnejad, 1996]. A titre d'exemple, la figure (I.4).1a présente, les tracés normalisés de l'absorption photonique et de l'émission de fluorescence du rotor DMABE dans l'acétate d'éthyle.

I.4.2. CAS DES DERIVES DE TYPE BENZYLIDENE ET CINNAMYLIDENE

Les rotors de type "benzylidène" ont été étudiés par Loutfy et ses collaborateurs, et sont amplement décrits dans la littérature [Abdel-Mottaleb, 1990 ; Loutfy, 1982 et 1986].

Au DCPR-GRAPP, des rotors moléculaires des types "benzylidène" et "cinnamylidène" ont fait l'objet de diverses recherches, aussi bien pour leurs synthèses chimiques que pour l'étude de leurs propriétés photophysiques et de leurs applications. Les premiers travaux datent de 1986, avec l'étude menée par Bentikouk [Bentikouk, 1988 et 1990], suivie par diverses autres recherches [Grondin, 1994 ; Mossière, 1992 ; Thauvin, 1991 ; Xuereb, 1991].

Divers rotors ont été synthétisés afin de posséder des molécules présentant des solubilités variées pour les milieux aqueux ou non, et surtout pour posséder des molécules ayant des groupements fonctionnels permettant ensuite de les greffer sur d'autres composés d'intérêt (médicaments, polymères, etc.). A titre d'exemple, la figure (I.4).3 regroupe différents rotors glucidiques synthétisés spécialement pour des applications d'intérêt biologique [Adibnejad, 1996].

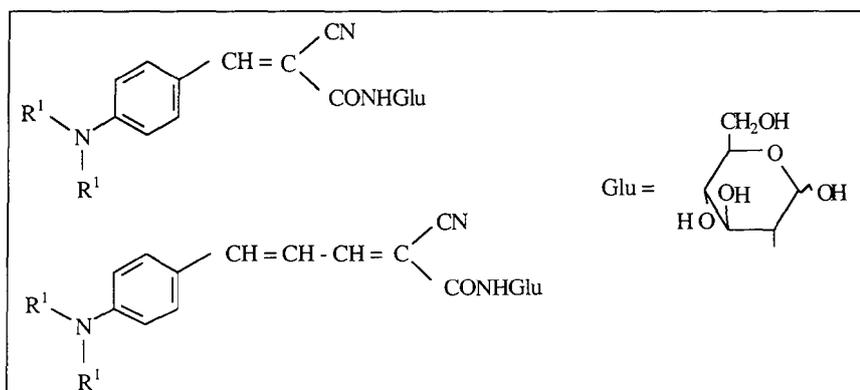


Figure (I.4).3

Rotors glucidiques synthétisés au GRAPP [Adibnejad, 1996].

A/ Composés de type benzylidène

Les rotors du type "benzylidène" ont des groupements donneur (N,N-diméthylamino) et accepteur (esters, cyano, amides, etc.) qui restent du même type que précédemment, mais qui sont séparés par le noyau benzénique conjugué à une double liaison (figure (I.4).4).

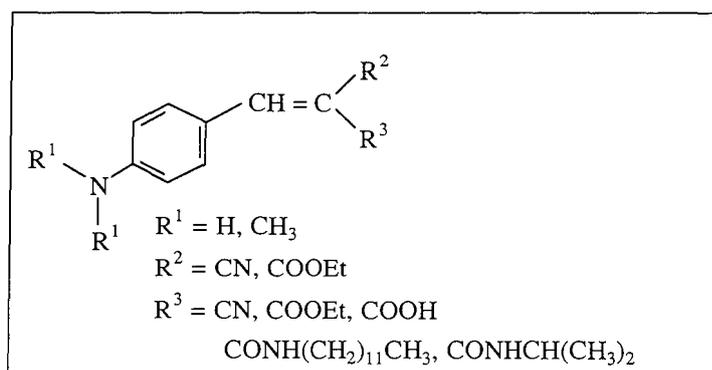


Figure (I.4).4

Rotors de type "benzylidène" synthétisés au DCPR-GRAPP [Bentikouk, 1990].

Dans le cas des dérivés de type "benzylidène" l'émission de fluorescence se traduit par une seule bande. La figure (I.4).1b regroupe les tracés normalisés pour l'absorption photonique et pour l'émission de fluorescence dans l'acétate d'éthyle pour le rotor (1)-CN ($R^1 = CH_3$; $R^2, R^3 = CN$). En comparaison des dérivés de type "benzène", on peut remarquer un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers les hautes longueurs d'onde dû à l'augmentation de la conjugaison apportée par la présence de la double liaison.

La polarité du milieu est aussi un facteur qui influence la longueur d'onde d'émission de fluorescence des rotors de type "benzylidène" ; l'augmentation de la polarité du solvant entraîne un déplacement de $\lambda_{f \max}$ vers le rouge (effet bathochrome).

La viscosité du milieu influence l'efficacité de l'émission de fluorescence. En effet, tout facteur qui empêche la libre rotation des rotors diminue le transfert de charge intramoléculaire entraînant une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

B/ Composés de type cinnamylidène

Des structures analogues à celles des composés du type "benzylidène", mais avec une conjugaison plus longue, par exemple deux doubles liaisons, conduisent aux dérivés du type "cinnamylidène" (figure (I.4).5).

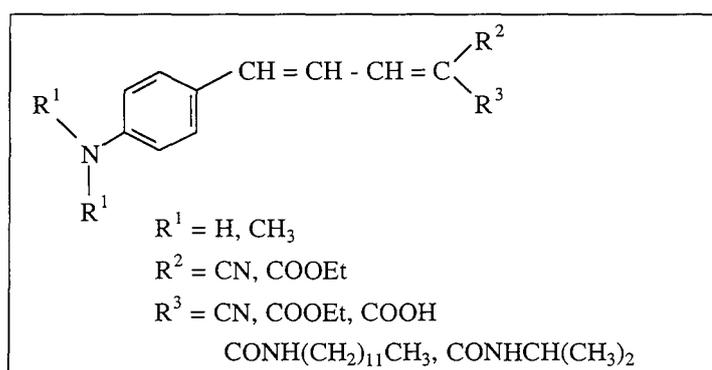


Figure (I.4).5

Rotors de type "cinnamylidène" synthétisés au DCPR-GRAPP [Bentikouk, 1990].

Comme pour les dérivés de type "benzylidène" l'émission de fluorescence des dérivés de type "cinnamylidène" se traduit par une seule bande. La figure (I.4).1c regroupe à titre d'exemple les tracés normalisés pour l'absorption photonique et pour l'émission de fluorescence dans l'acétate d'éthyle du rotor (2)-CN ($R^1=CH_3$; $R^2, R^3=CN$).

L'analyse des différents spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la figure (I.4).1 souligne le déplacement progressif vers les grandes longueurs d'onde apporté par la présence de la conjugaison à la fois pour l'absorption et l'émission de fluorescence en allant du rotor de type "benzène" (pas de conjugaison) au rotor de type "benzylidène" (une double liaison) puis au rotor de type "cinnamylidène" (deux doubles liaisons).

I.4.3. CAS DES DERIVES DE TYPE STILBENE

Les dérivés du stilbène possèdent plusieurs liaisons flexibles (liaisons 1, 2, 4 et 5 ; figure (I.4).6) qui vont exercer une certaine influence sur les propriétés photophysiques de ces composés. L'immobilisation d'une ou plusieurs de ces liaisons par leur insertion dans un cycle rigide a permis d'étudier l'influence de la rotation de chaque liaison sur les propriétés photophysiques de la molécule [Lapouyade, 1992 ; Letard, 1993 et 1994 ; Rettig, 1989].

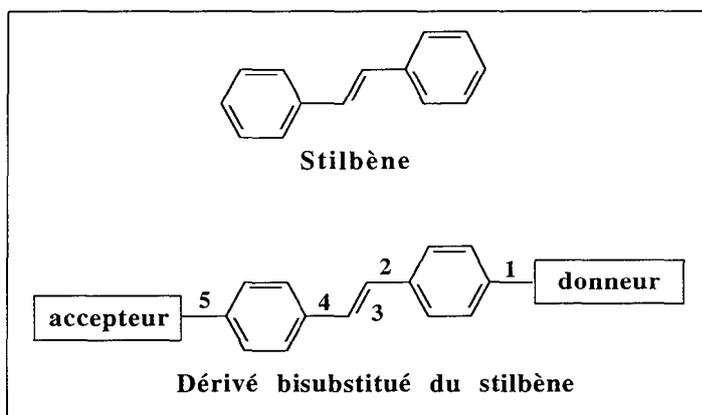


Figure (I.4).6

Le stilbène et ses dérivés bisubstitués.

Au cours de récents travaux menés au DCPR-GRAPP [Jungen, 1996], une étude particulière a été effectuée sur les propriétés photophysiques d'un dérivé stilbène : le 4-(N,N-diméthylamino)-stilbène-4'-carboxylate de méthyle ou DMASCM (figure (I.4).7).

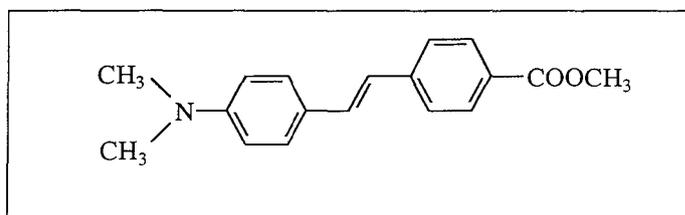


Figure (I.4).7

DMASCM : 4-(N,N-diméthylamino)-stilbène-4'-carboxylate de méthyle.

Les spectres d'émission de fluorescence du DMASCM en solution dans différents solvants présentent une seule bande d'émission quel que soit le solvant utilisé. Cependant la structure de cette bande varie en fonction de la polarité du solvant. En effet, le spectre d'émission de fluorescence est très structuré dans les solvants apolaires tel le cyclohexane alors qu'il ne l'est pas dans des solvants faiblement et fortement polaires (figure (I.4).8).

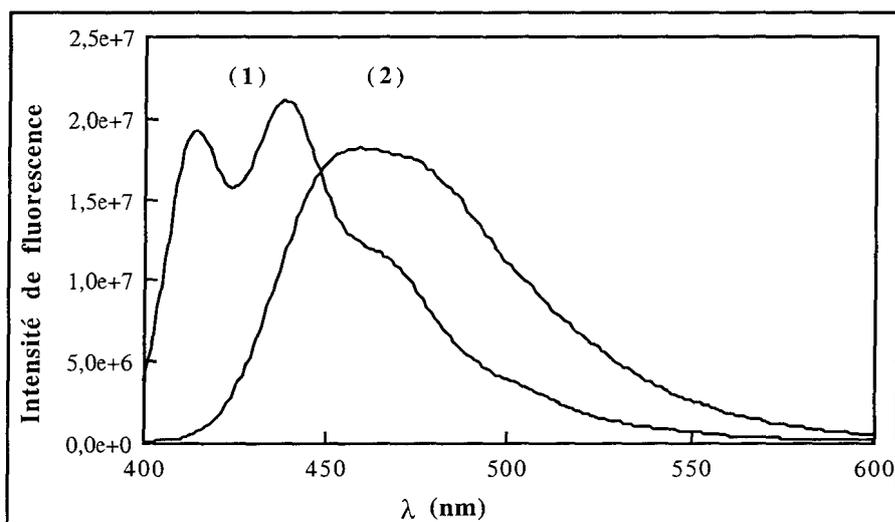


Figure (I.4.8)

Spectres d'émission de fluorescence du DMASCM dans le cyclohexane (1) et le toluène (2) ($\lambda_{ex} = 365$ nm).

Ces résultats sont en accord avec la théorie de l'existence de trois états excités pour les dérivés bisubstitués du stilbène.

Le DMASCM possède un groupement dialkylamino ayant d'excellentes propriétés de donneur et susceptible de subir une rotation. Ce composé possède donc un état excité A^* (état TICT) en plus de l'état excité plan E^* et de l'état P^* conduisant à l'isomérisation photochimique. Le schéma cinétique représenté sur la figure (I.4.9) montre les trois états excités singulets du DMASCM.

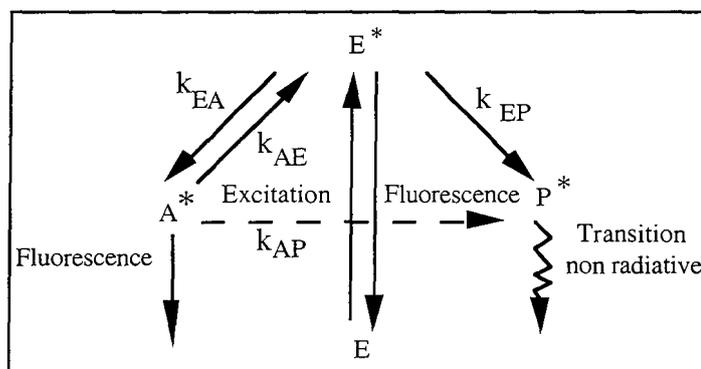


Figure (I.4.9)

Schéma photophysique des composés du type DMASCM.

L'étude des spectres de fluorescence montre que dans les solvants apolaires, la formation de l'état A^* est défavorisée et seule est observée l'émission à partir de l'état E^* , qui conduit à un spectre d'émission de fluorescence structuré. En revanche, dans les solvants légèrement et fortement polaires, la constante de vitesse de formation de l'état excité A^* est très élevée car dans les solvants polaires il n'y a pratiquement pas de barrière d'activation entre les états E^* et A^* et ce dernier est ainsi responsable de l'essentiel de l'émission de fluorescence.

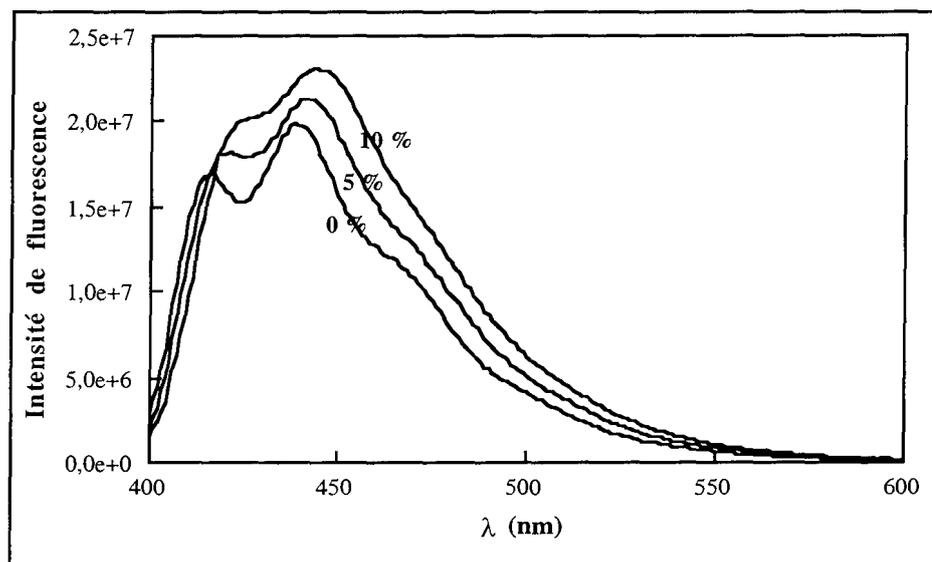


Figure (I.4).10

Variation de la structure vibronique du spectre d'émission de fluorescence du DMASCM dans le mélange cyclohexane-toluène, en fonction du volume de toluène ajouté.

Le spectre d'émission dans le cyclohexane pur présente un épaulement à 415 nm. L'ajout de petites quantités de toluène qui est légèrement plus polaire, conduit à la diminution progressive de cet épaulement et donc à la diminution de la structuration du spectre (figure (I.4).10).

L'épaulement de la bande d'émission serait donc caractéristique de l'émission de fluorescence provenant de la relaxation de l'état E^* qui serait par conséquent responsable de l'essentiel de l'émission de fluorescence dans les solvants apolaires. Lorsque la polarité du solvant est progressivement augmentée, l'émission de fluorescence est composée d'un recouvrement des bandes provenant de la relaxation des états E^* et A^* , ce qui se traduirait donc par la réduction de l'épaulement de la bande d'émission.

I.5. LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS DERIVES DES COUMARINES

Poursuivant les recherches menées au sein de notre groupe dans le domaine des rotors moléculaires fluorescents appliqués à des systèmes biologiques, nous avons principalement abordé au cours de ce travail, l'élaboration de divers composés polycycliques possédant comme unité de base le motif coumarinique.

I.5.1. EVOLUTION DE DIFFERENTES STRUCTURES COUMARINIQUES

Les coumarines et leurs dérivés sont très largement distribués dans la nature. Elles constituent une importante famille de produits naturels possédant un large spectre d'activité biologique. Plus de 800 d'entre elles sont connues [Yasuda, 1984] et sont présentes dans les herbes, la peau des agrumes et les feuilles de certains légumes. A titre d'exemple, la coumarine elle-même est rencontrée dans le trèfle et utilisée comme aromate pour l'élaboration de parfums.

Les coumarines naturelles ou synthétiques possèdent des activités pharmacologiques très diverses [Hoult, 1996 ; Liu, 1997 ; Ratanasavanh, 1996]. Parmi les exemples les plus importants, nous pouvons citer celles utilisées pour le traitement de diverses maladies de la peau (les psoralènes), ou celles employées comme anticoagulants dans le domaine thérapeutique (dicoumarole/warfarine).

Bien que la coumarine ([figure \(I.5\).1](#)) émette assez peu de lumière, de nombreux dérivés coumariniques sont hautement fluorescents et servent dans l'industrie des détergents, des papiers et des textiles notamment pour limiter le jaunissement des matériaux de couleur blanche.

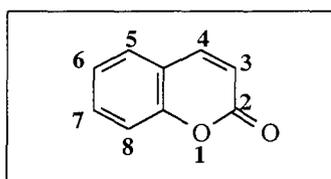


Figure (I.5).1

Structure coumarine.

Les coumarines en grande majorité absorbent la lumière au-dessus de 330 nm et parallèlement à cette propriété, elles montrent le plus souvent des rendements quantiques de fluorescence relativement élevés (0,5 et plus). Pour un grand nombre de coumarines substituées, la fluorescence varie en fonction des facteurs environnants tels que le pH et la polarité du solvant.

Les 7-aminocoumarines, du fait de leur fluorescence située dans la partie bleu-verte du spectre visible (410-590 nm), sont particulièrement utiles pour un bon nombre d'applications [Yarborough, 1974]. Ces structures ont fait l'objet de nombreuses études, qui ont mis en évidence le rôle de la fonction amino et l'influence du substituant alkyle porté par cette fonction.

L'influence sur les propriétés photophysiques d'un second groupement, placé en position-4 ou -3 sur la structure coumarinique a également été largement étudiée [Jones II, 1985].

Répertorier tous les dérivés existants ou ayant fait l'objet d'une étude est impossible, aussi nous allons dans cette partie nous limiter à la compréhension de l'influence des différents substituants associée au rôle du milieu d'étude, sur les propriétés photophysiques des coumarines substituées en position-7 par un groupement dialkylamino électrodonneur, et en position-4 ou -3 par un groupement électroattracteur.

A/ Influence de l'alkylation du groupement amino sur les propriétés photophysiques

Les coumarines, utilisées comme colorant à laser [Jones II, 1980]^{a,b}, possèdent un substituant ayant un fort caractère électrodonneur, qui peut être un groupement hydroxyle, ou un groupement dialkylamino généralement placé en position-7. La coumarine 1 (figure (I.5).2) a été le premier dérivé coumarine qui a permis de mettre en évidence leurs propriétés d'action laser [Sorokin, 1969].

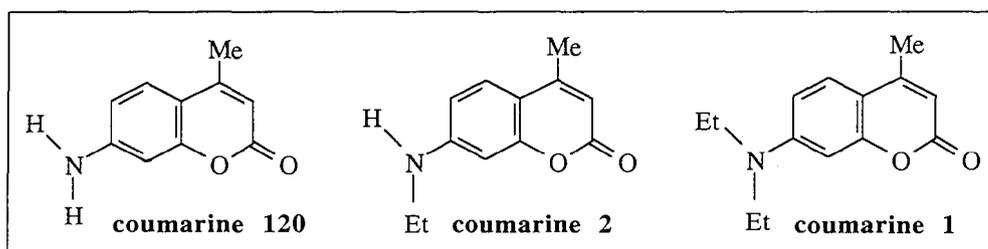


Figure (I.5).2

Structure moléculaire de dérivés 7-aminocoumarine qui lasent dans le bleu [Reynolds, 1975].

La coumarine 2 [Srinivasan, 1969] et la coumarine 120 [Drexhage, 1973] furent ensuite étudiées suivies par plus de 100 dérivés coumarines reconnus pour leur utilité en tant que colorant laser.

Le rendement quantique de fluorescence des dérivés coumarine de la figure (I.5).2 est élevé dans la plupart des solvants organiques. Si cela est encore vrai en milieu aqueux pour les coumarines 120 et 2, le dérivé ayant deux groupements alkyle sur l'azote (coumarine 1) présente un rendement quantique de fluorescence très réduit dans un environnement de forte polarité. Cet effet est encore plus prononcé pour les composés similaires qui portent un groupement attracteur en position-3 ou -4 (figure (I.5).3), puisque leur efficacité est réduite même dans des solvants modérément polaires, comme l'éthanol ou le méthanol.

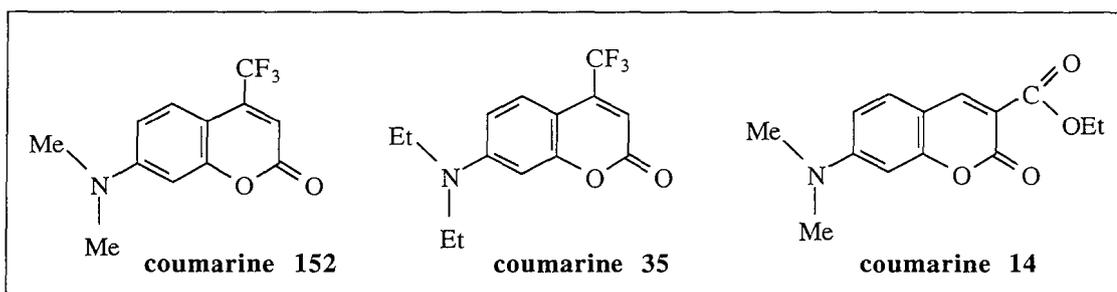


Figure (I.5).3

Dérivés coumarine ayant de faibles rendements quantiques de fluorescence en milieu polaire [Reynolds, 1975].

Ce comportement est expliqué en se basant sur celui des dérivés rhodamine [Drexhage, 1973] : on suppose que la densité des électrons π de la liaison entre le groupement amino et le noyau benzénique est réduite dans l'état excité et, de ce fait, la mobilité du groupement amino augmente la probabilité des transitions non radiatives vers l'état fondamental.

L'hypothèse d'une désactivation non radiative des rhodamines ou des coumarines, par l'intermédiaire du groupement amino mobile, a conduit naturellement à la synthèse de colorants "rigides" comportant des groupements julolidine comme la coumarine 102 (figure (I.5).4) et conduisant à une amélioration de l'efficacité laser [Reynolds, 1975].

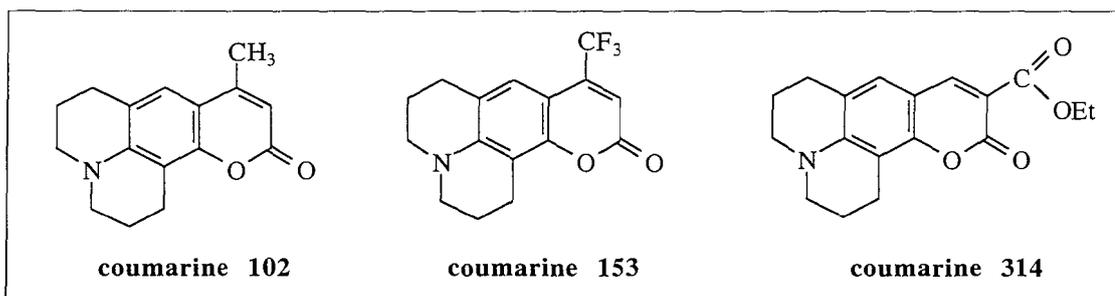


Figure (I.5).4

Dérivés coumarine ayant un groupement amino rigide [Reynolds, 1975].

Les dérivés 4-trifluorométhyle portant deux substituants alkyle sur le groupement amino (coumarines 152 et 35 : figure (I.5).3) ont de faibles rendements quantiques de fluorescence. En rigidifiant le groupement amino, une amélioration considérable des performances de ces produits (coumarine 102 et 153) est observée. Un effet similaire a été observé entre les composés 14 et 314. On constate également un déplacement vers les hautes longueurs d'onde du maximum d'émission de ces composés, puisque le groupement amino rigidifié est un groupement électrodonneur plus efficace que le diméthyl- ou le diéthylamino [Reynolds, 1975].

Enfin, Reynolds et Drexhage, 1975, ont montré qu'il n'était pas nécessaire, pour améliorer les caractéristiques de fluorescence, de rigidifier le groupement amino si celui-ci porte un seul groupement alkyle, comme dans le cas du composé 307 (figure (I.5).6).

La fluorescence des aminocoumarines est donc affectée par :

- la rigidification du groupement dialkylamino qui empêche la rotation et conduit à une fluorescence plus soutenue des composés B par rapport aux composés A (figure (I.5).5),
- le groupement porté par l'amine pour les rotors libres de subir une rotation (pour NR_2 , le déclin non radiatif est selon l'ordre : $\text{R} = \text{éthyle} > \text{R} = \text{méthyle} > \text{R} = \text{hydrogène}$),
- une diminution du déclin non radiatif dans le cas de $-\text{NH}_2$ et $-\text{NHR}$ pour les composés qui portent un substituant en position-6 (en ortho de l'amine),
- la présence d'un groupement en position-3 ayant une structure délocalisée,
- la présence d'un groupement électroattracteur en position-4 qui influe davantage sur les modifications liées à la polarité du solvant.

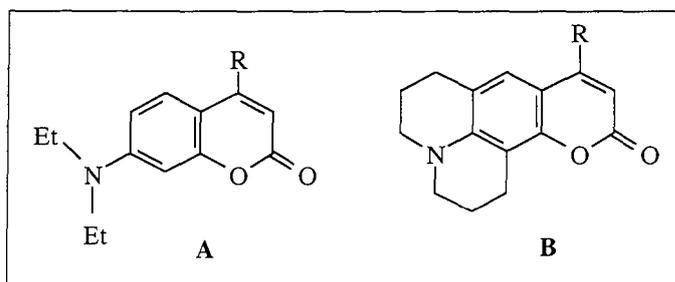


Figure (I.5).5
Influence du substituant dialkylamino.

Les dérivés 7-aminocoumarine, portant une amine primaire, secondaire ou tertiaire bloquée subissent, à l'état excité, un transfert de proton hautement émissif. Néanmoins, les amines tertiaires, libres de subir une rotation (telles que $-\text{NEt}_2$) ont un transfert de protons à l'état excité ayant un déclin peu ou pas radiatif. En fait, l'introduction d'un substituant alkyle sur le groupement amino va changer la basicité de Brönsted de ces composés, et donc augmenter la probabilité de formation de l'état TICT [Druzhinin, 1995].

Une chose est apparue clairement, les coumarines sont divisées en deux familles, en terme de propriétés photophysiques (durée de vie et rendement quantique de fluorescence) lorsque la polarité du solvant augmente :

- pour les dérivés ayant une *fonction amino substituée*, l'émission de fluorescence et la durée de vie de l'état excité sont très nettement réduites dans les solvants polaires,
- pour les dérivés ayant *une structure rigide*, (figure (I.5).4), la réponse en fonction de la polarité du milieu est moins importante, et on constate une réduction du rendement quantique de fluorescence dans des solvants polaires et visqueux, tels que le glycérol.

B/ Rôle et influence du substituant en position-4

En augmentant le degré d'alkylation du groupement amino, les longueurs d'onde d'émission se sont peu à peu décalées vers les grandes longueurs d'onde, et un déplacement important vers le rouge a été obtenu en ajoutant des substituants sur l'hétérocycle. La synthèse de dérivés coumariniques substitués en position-4 non plus par un groupe méthyle mais par un groupement trifluorométhyle, a permis d'améliorer leur stabilité photochimique [Schimitschek, 1974]. La figure (I.5).6 donne des exemples de ces nouveaux dérivés : le groupement trifluorométhyle sur les coumarines 307 et 151 augmente la longueur d'onde d'émission de 50 nm par rapport aux coumarines 2 ou 120 (figure (I.5).2) dans les mêmes solvants.

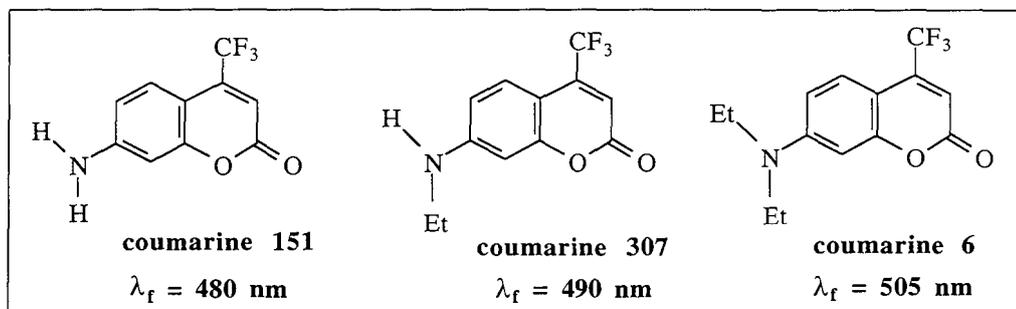


Figure (I.5).6

Structure moléculaire de dérivés 7-aminocoumarine substitués en position-4 [Reynolds, 1975].

Une attention spéciale a été portée sur la possibilité d'une émission duale dans le cas de ces traceurs fluorescents : malgré toutes les recherches menées, sur l'évolution vers les grandes longueurs d'onde, sur l'élargissement de la bande de fluorescence et ses changements de structure, sur la réduction du rendement quantique de fluorescence pour des composés du type 4-trifluorométhyl-7-diéthylaminocoumarine (coumarine 35, figure (I.5).3), l'apparition d'une seconde bande d'émission de fluorescence dépendant du milieu d'étude n'a jamais été démontrée [Taneja, 1995].

Druzhinin et al., 1995, ont étudié l'influence de la basicité sur des dérivés tels que les 7-aminocoumarines, libres de subir une rotation et présentant un transfert de proton à l'état excité, afin de comprendre la faible fluorescence de ces dérivés.

Les auteurs ont montré que l'addition de H₂SO₄ dans des solutions éthanoliques de composés représentés sur la figure (I.5).7, diminuait l'intensité des spectres d'absorption et d'émission, et provoquait l'apparition d'une seconde bande d'émission (à hautes longueurs d'onde) due à la fluorescence du cation formé par la protonation du groupement C=O.

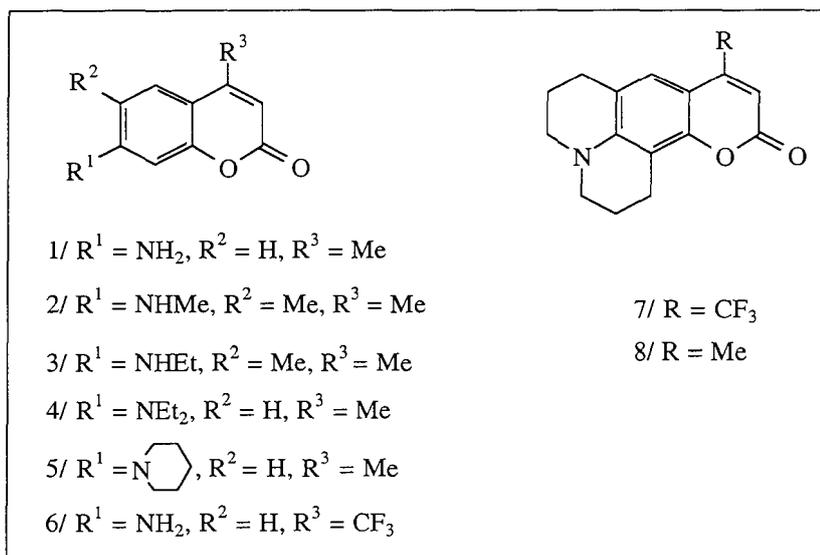


Figure (I.5).7

Composés présentant un transfert de proton à l'état excité.

En conclusion, il est apparu que la structure de l'état excité, de molécules ayant subi un transfert de proton, était plane pour les composés portant une amine primaire, secondaire ou tertiaire bloquée (composés 1-3 et 5-8 : [figure \(I.5\).7](#)). Ainsi, dans la mesure où le groupement carbonyle protoné peut être considéré comme un substituant accepteur d'électrons, on peut assimiler l'état excité des composés ayant subi un transfert de proton à un état de transfert de charge intramoléculaire (ICT).

Les composés 4 et 5, ont une structure dont le transfert de proton va favoriser un transfert de charge pour activer la formation de l'état TICT et donc conduire à un déclin non radiatif.

C/ Influence du milieu sur les propriétés photophysiques

La réponse, en terme d'émission de fluorescence dépend du chemin de substitution de la coumarine mais également de la polarité du solvant : le rendement quantique de fluorescence ainsi que la durée de vie des colorants coumarine, sont considérablement réduits, dans des solvants polaires, si le substituant porté par le groupement amino est libre de subir une rotation.

Cet effet de la polarité est interprété en terme de relaxation de l'état excité, à partir d'une conformation plane vers un état twisté zwitterionique.

Ainsi l'influence de la structure dépend principalement de la possibilité ou non d'une rotation, ainsi que de la formation de charges positives ou négatives qui dépendent du groupement $-\text{NR}_2$.

Jones II et al., 1980^b, ont étudié les propriétés du solvant qui gouvernent la compétition entre les déclins radiatifs et non radiatifs des dérivés coumarine. Ils ont mis en évidence :

- un déplacement vers le rouge des longueurs d'onde d'absorption et d'émission lorsque la polarité du milieu augmente,
- un élargissement général de la bande d'émission dans les solvants les plus polaires et protiques.

Les résultats confirment donc la nature polaire de l'état fluorescent des aminocoumarines, et suggèrent l'établissement d'un modèle pour le déclin non radiatif en ce qui concerne les espèces à l'état excité, qui ont un caractère à transfert de charge intramoléculaire.

D/ Modèles proposés pour un déclin non radiatif

Les propriétés photophysiques et photochimiques des coumarines sont mal comprises et ont conduit à la proposition de plusieurs mécanismes de désactivation. Ainsi, lorsque l'atome d'azote est substitué par deux groupements éthyle, on assiste à une baisse considérable du rendement quantique et de la durée de vie de fluorescence en solution aqueuse ($\tau_f < 500$ ps) ainsi que dans les solvants très polaires et donneurs de liaisons hydrogène. Cet effet suggère l'ouverture d'une voie de désactivation non radiative.

De nombreux auteurs suggèrent la possibilité d'un deuxième état excité, un état à transfert de charge intramoléculaire "twisté" (TICT) qui présenterait des orbitales découplées sur le carbone de l'azote de la liaison CN. L'existence de cet état est celui communément admis pour la molécule de DMABN [Grabowski, 1979 et 1983], le plan constitué par l'atome d'azote et les deux groupements alkyle serait perpendiculaire à celui des cycles aromatiques de la coumarine.

Un autre modèle, celui de l'ouverture-fermeture du parapluie ("Umbrella-Like Motion", ULM) proposé dans la littérature [Lopez-Arbeloa, 1993] est basé sur un changement d'hybridation $sp^2 \rightarrow sp^3$ qui faciliterait à partir de la configuration sp^3 la conversion interne non radiative $S_1 \rightarrow S_0$. Une meilleure compréhension des mécanismes de désactivation des coumarines en phase aqueuse est nécessaire et dans ce contexte, l'interaction soluté-solvant apparaît dès lors comme un élément essentiel.

i/ Concept de l'état TICT

Les modifications des propriétés photophysiques des coumarines, par alkylation d'un groupement amino en position-7, sont interprétables en terme de réorganisation des états n, π^* et π, π^* , avec un état excité à transfert de charge intramoléculaire (ICT) qui implique la promotion d'un électron depuis une orbitale liée à la fonction amino.

L'influence du solvant ou du substituant est interprétée en terme de structures A et B (figure (I.5).8) qui représentent la contribution de la résonance de la molécule, et de façon approximative les états électroniques excités des molécules de type aminocoumarine.

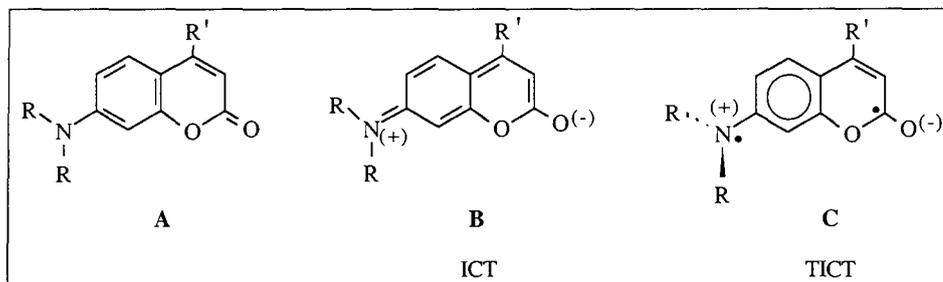


Figure (I.5).8

Les différents états accessibles aux 7-dialkylaminocoumarines substituées en position-4 [Bangar Raju, 1994].

L'état fondamental est représenté par la structure A, tandis que l'état excité de plus faible énergie (état S_1) est majoritairement représenté par un état polaire, à transfert de charge intramoléculaire (état ICT) qui ressemble à la structure B. L'état S_1 présente un moment dipolaire élevé, et en ajoutant sur le chromophore des substituants supplémentaires, on augmente ou diminue le moment dipolaire de l'état excité.

Ainsi, la formation d'un état excité (FC) est suivie par une première relaxation vers un état plan à transfert de charge intramoléculaire (ICT), hautement émissif et modérément polaire. Pour les composés qui n'ont pas une géométrie rigide, cette relaxation peut se poursuivre par la rotation du groupement amino, qui conduit à une conformation non planaire : un état "twisted" à transfert de charge intramoléculaire (TICT) d'énergie plus basse que l'état ICT (figure (I.5).9). Cet état présente une grande séparation de charges qui devient de plus en plus importante en milieu polaire.

La formation et la stabilisation de l'état TICT des aminocoumarines sont déterminées par les caractéristiques des groupements électrodonneurs et accepteurs portés par la structure coumarine, et par la polarité du solvant, comme l'on décrit Jones II et al., 1980^a. La viscosité du solvant peut également affecter la désactivation non radiative dans la mesure où ce procédé met en jeu une rotation des liaisons qui relie les groupements donneur et accepteur à la structure coumarine.

Ainsi, toutes les caractéristiques de fluorescence des sondes dérivées de coumarines, sont contrôlées par la formation de l'état TICT, puisque ce dernier agit souvent comme un inhibiteur de la fluorescence.

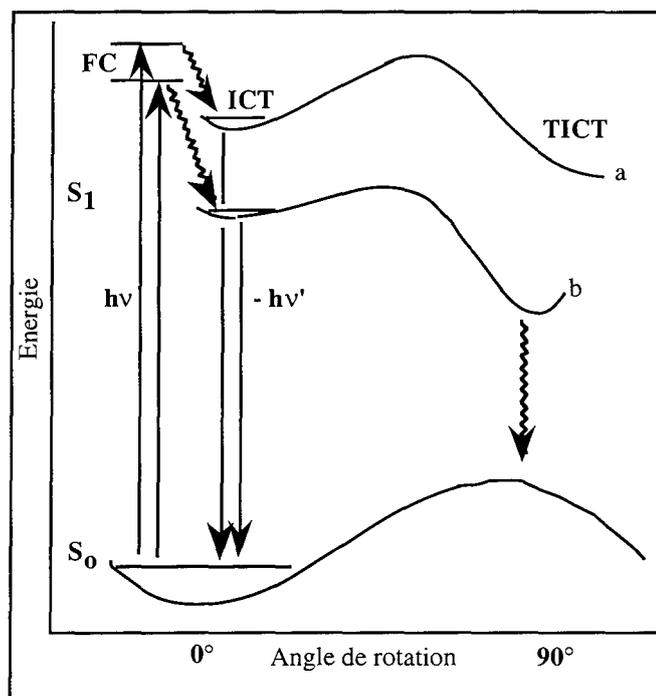


Figure (I.5).9

Relations qualitatives entre les transitions de Franck-Condon (FC), les sauts d'énergie pour permettre les rotations, la stabilisation des états ICT et TICT dans le cas de solvants modérément polaires (a) et polaires (b).

Deux approches ont été proposées pour contrôler la formation de l'état TICT :

- la première consiste à rigidifier le système, et ainsi à empêcher la formation de l'état TICT [Rettig, 1986],
- la seconde consiste à augmenter le niveau d'énergie de formation de l'état TICT par rapport à l'état ICT, tout en gardant le système flexible, de façon à défavoriser la formation de l'état TICT. Cela peut-être fait (i) en réduisant le caractère donneur du groupement amino ou (ii) en diminuant le caractère accepteur du substituant [Bangar Raju, 1994].

Le mécanisme de désactivation de l'état ICT vers l'état TICT est important en milieu polaire où les charges sont le plus espacées, favorisant ainsi la stabilité de la forme zwitterionique. Les changements structuraux tels que la rigidification de la fonction amino (empêchement de la rotation) ou l'influence du groupement $-NR_2$ (qui favorise ou réduit la formation de charges) influencent aussi ce phénomène.

L'étude des coumarines 151, 152 et 35 (figure (I.5).10) a également montré que la vitesse du déclin de fluorescence a une dépendance inverse avec la taille du rotor.

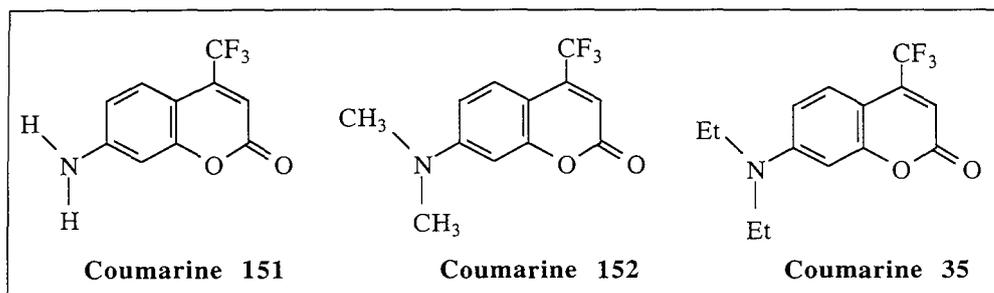


Figure (I.5).10
Influence de la taille du rotor.

Enfin, le modèle ICT-TICT est l'un de ceux adopté par Grabowski et al., 1979, à propos du comportement d'un grand nombre d'espèces polaires à l'état excité, mais diffère du modèle proposé pour des composés du type *p*-diméthylaminobenzonitrile (DMABN), en ce sens que la forme twistée, dans le cas des coumarines, n'est pas ou peu émissive.

ii/ Modèle ULM ("Umbrella-Like Motion")

Un autre mécanisme de désactivation non radiative proposé dans la littérature [Lopez-Arbeloa, 1993] est le modèle ULM. Le processus de conversion interne représenté sur la figure (I.5).11 est assimilé à un changement de structure du groupement amino qui passe d'une configuration plane (hybridation sp^2 de l'atome d'azote) à une configuration pyramidale (hybridation sp^3 de ce même atome).

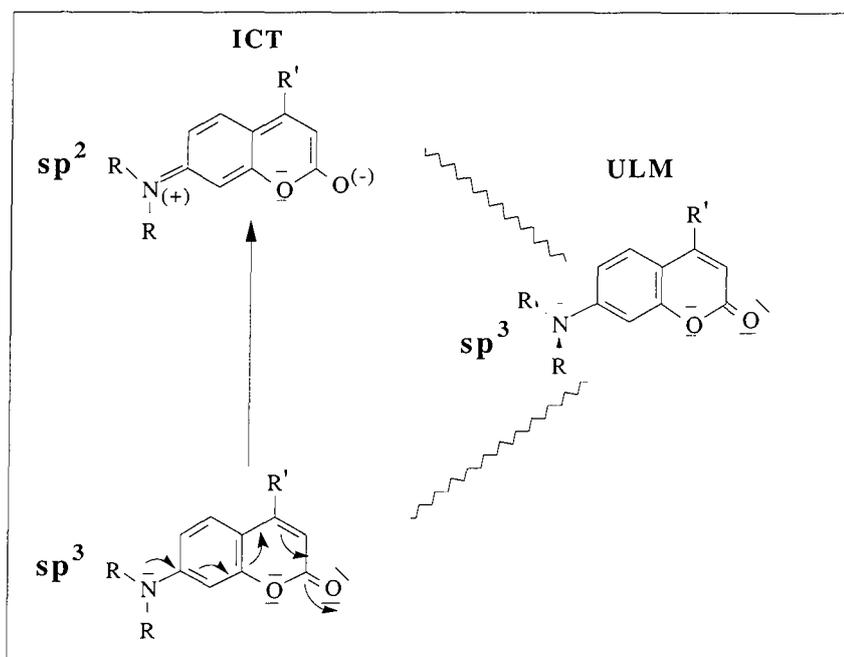


Figure (I.5).11
Désactivation selon le modèle ULM.

Le caractère de double liaison entre le groupement amino et les deux cycles aromatiques disparaît lors de ce processus pour laisser place à une simple liaison et une redistribution du système π . Ce modèle explique la variation des constantes de désactivation non radiative lorsque le degré d'alkylation du groupement amino augmente. Dans l'état excité, le caractère de double liaison est alors plus marqué et la probabilité d'une telle conversion interne devrait diminuer. Lorsque la polarité du solvant augmente, la forme mésomère B (figure (I.5).12) est stabilisée entraînant une augmentation de la constante de désactivation non radiative.

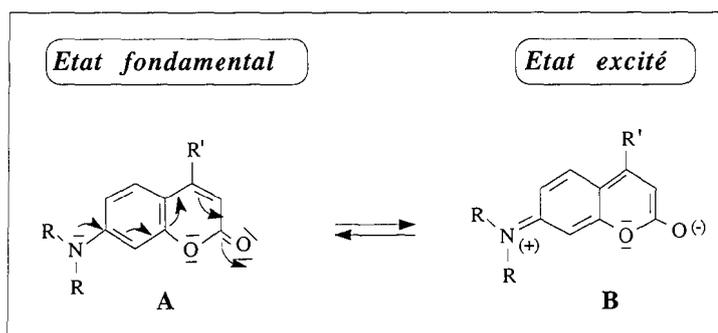


Figure (I.5).12

Les deux formes mésomères présentes dans l'état fondamental S_0 et l'état excité S_1 .

I.5.2. DERIVES DU TYPE 7-(N,N-DIALKYLAMINO)COUMARINE SUBSTITUES EN POSITION-3

Les dérivés coumarine, substitués en position-3 se comportent, dans l'ensemble, comme ceux décrits précédemment. Nous montrerons donc que ces composés ont également des propriétés photophysiques qui dépendent fortement du milieu d'étude, et de la force du caractère électroaccepteur du substituant en position-3 [Kaholek, 1997].

Bangar Raju et Varadarajan, 1994 ont étudié les propriétés photophysiques de dérivés 7-diéthylaminocoumarine, substitués en position-3 par des fonctions à caractères électroattracteurs différents (figure (I.5).13).

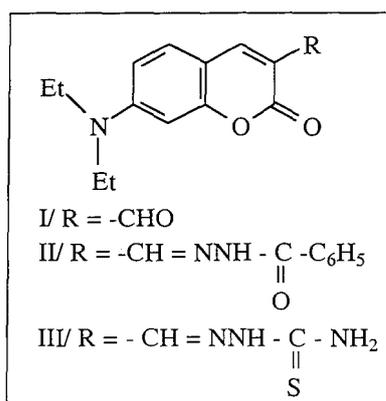


Figure (I.5).13

Dérivés 7-diéthylaminocoumarine substitués en position-3 [Bangar Raju, 1994].

Une analyse comparative des caractéristiques d'absorption et d'émission des traceurs II et III a révélé que, l'introduction d'un groupement amino électrodonneur à la place d'un groupement phényle, et le remplacement de l'oxygène par un soufre (composé III) sur le substituant thiosemicarbazide en position-3 conduit à des changements importants. En effet, bien que le rendement quantique de fluorescence de ces deux traceurs soit soutenu même dans des solvants polaires, la constante de déclin radiatif k_r est toujours inférieure à la constante de déclin non radiatif k_{nr} dans le cas du traceur II, tandis qu'un comportement inverse est observé pour le traceur III.

Tous les changements observés dans les propriétés de fluorescence ont été interprétés en terme de formation de l'état TICT dans le cas des 7-aminocoumarines. Une molécule ayant un groupement électrodonneur (usuellement un groupement dialkylamino) et un groupement électroaccepteur qui assure la délocalisation de la molécule, présente un état ICT ayant un transfert partiel d'électrons initialement formé sous excitation. En milieu polaire, le groupement dialkylamino subit une rotation qui positionne l'orbitale donneur perpendiculairement à l'orbitale accepteur. Cela résulte en un transfert total des charges, et donc à la formation de l'état TICT.

Bangar Raju et Varadarajan, 1994, ont montré que dans la mesure où ces différents traceurs avaient le même groupement électrodonneur, seul le substituant en position-3 influait sur les propriétés photophysiques. La présence d'un groupement électroattracteur fort (composé I), va faciliter le transfert de charge depuis le groupement électrodonneur. Ainsi la polarité de la molécule augmente, et devient encore plus forte sous excitation. Dans des solvants de polarité élevée, le groupement accepteur va faciliter le transfert de charge et abaisser le niveau d'énergie de l'état TICT, par rapport aux état excités des conformations planes et twistées. Ainsi, l'état ICT va se relaxer spontanément vers un niveau d'énergie inférieure : l'état TICT qui est faiblement ou non fluorescent.

Ainsi, la fluorescence de l'état ICT va être inhibée, comme les auteurs ont pu l'observer dans le cas du traceur I en milieu polaire. Les traceurs II et III ont des groupements électroaccepteurs de force réduite, en raison de la longueur de délocalisation de la chaîne, et donc les interactions donneur-accepteur sont compromises en raison de la conjugaison de système π . La formation de l'état TICT reste possible, étant donné que la rotation du groupement dialkylamino n'est pas empêchée, mais l'énergie de cet état est certainement défavorable par rapport à celle de l'état ICT, ayant une conformation plane. Cela explique le rendement quantique de fluorescence élevé des traceurs II et III, même dans des solvants de constante diélectrique élevée.

Une seconde étude, réalisée par les mêmes auteurs, mais sur un composé différent (une 7-diéthylaminocoumarine portant un substituant hétéroaryle en position-3 : [figure \(I.5\).14](#)) a également été menée [Bangar Raju, 1995].

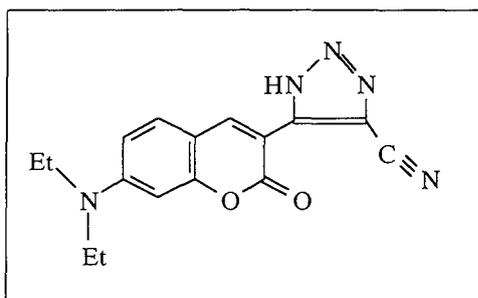


Figure (I.5).14

Dérivés DACH [Bangar Raju, 1995].

Les auteurs ont montré que la substitution du dérivé 7-dialkylamino en position-3, par des groupements fortement délocalisés va inhiber la formation de l'état TICT, bien que la rotation de la molécule reste envisageable. Cela permet donc d'obtenir des traceurs fluorescents ayant un rendement quantique élevé, même dans des milieux de forte polarité.

Enfin, Griffiths et al., 1995, ont également étudié une grande variété de composés 7-diéthylamino, substitués en position-3 par des groupements électroattracteurs de nature différente et de conjugaison plus ou moins longue.

Leur première constatation porte sur l'influence importante de la conjugaison sur la valeur de la longueur d'onde au maximum d'émission de fluorescence pour les composés : l'apport d'une unité vinylique supplémentaire peut induire un effet inverse, c'est-à-dire un déplacement hypsochromique du spectre en raison des interactions stériques créées et que de façon générale, les coumarines vinylyle ne sont pas aussi fluorescentes que les coumarines simples du type 7-dialkylamino portant un groupement électroattracteur en position-3.

Parallèlement, l'augmentation de la conjugaison peut entraîner une augmentation de la flexibilité de la molécule et donc des largeurs de bandes des spectres d'absorption plus importantes correspondant à une perte d'efficacité de la fluorescence. Ce sont également ces molécules qui possèdent différentes conformations *cis-trans* en solution, qui conduisent à des coefficients d'extinction molaires plus faibles et donc à un effet bathochromique réduit.

Ainsi, si les coumarines portant en position-7 un groupement électrodonneur, tel qu'un groupement hydroxyle, alkoxy ou amino bisubstitué et un groupement électroaccepteur en position-3, -4 ou -6 sont les plus efficaces sur le plan des propriétés photophysiques, il ne faut pas perdre de vue que la nature de ces substituants joue un rôle primordial quant à la présence d'interactions soluté-solvant, à la formation de conformères, à la facilité d'une rotation de la molécule et à la faveur d'une désactivation non radiative.

I.6. CONCLUSION

C'est après avoir étudié toutes ces données bibliographiques, et après avoir pris en compte l'importance et l'étendue des applications liées aux dérivés coumarines que nous avons orienté nos recherches vers la synthèse de nouveaux composés coumariniques.

L'intérêt de ces composés réside, pour nous, dans leur utilisation comme sondes fluorescentes en biochimie en tant que marqueurs de nombreuses protéines, récepteurs mono- ou polysaccharides [Kasten, 1996], avec l'avantage d'avoir des propriétés photophysiques sensibles aux conditions d'environnement. Nous rappelons également que l'un de nos objectifs étant l'observation de systèmes biologiques fluorescents par le biais de la microscopie optique en champ proche, nous avons choisi d'élaborer des traceurs présentant des longueurs d'onde d'absorption voisines de 490 nm, longueur d'onde de la source photonique disponible sur l'appareil.

Dans toute la gamme des dérivés coumarine, nous avons porté notre attention sur ceux substitués en position-7 par un groupement dialkylamino, ces composés présentant pour nous un double avantage :

- la grande majorité des 7-aminocoumarine absorbent la lumière au-dessus de 330 nm, permettant ainsi une excitation en dehors des limites d'absorption des protéines et des acides nucléiques,
- parallèlement à cette propriété, elles montrent le plus souvent des rendements quantiques de fluorescence relativement élevés (0,5 et plus) et une fluorescence située dans la partie bleu-verte du spectre visible.

Bien que la présence d'un groupement $-NH_2$ en position-7 donne accès à de meilleurs rendements de fluorescence, nous avons choisi de fixer un groupement $-NEt_2$ sur la structure coumarine afin de déplacer les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le rouge. L'utilisation d'un groupement donneur ayant une structure rigide était à exclure. Même si leurs longueurs d'onde sont très nettement déplacées vers le rouge, nous venons de rapporter que pour les dérivés ayant une structure rigide, la réponse en fonction de la polarité du milieu est moins importante, et conduit même à une réduction du rendement quantique et de la durée de vie de fluorescence dans les solvants polaires et visqueux, tels que le glycérol.

Nous avons également montré, que l'influence de l'environnement sur les propriétés photophysiques des dérivés coumarines est encore plus prononcée pour les composés 7-dialkylamino qui portent un groupement attracteur en position-3 ou -4 puisque leur efficacité est réduite même dans des solvants modérément polaires, comme l'éthanol ou le méthanol.

Nous avons donc choisi d'élaborer des molécules ayant un groupement électrodonneur et un groupement électroaccepteur, placé en position-3 sur la structure coumarinique, qui assure la délocalisation de la molécule.

Pour ce faire, nous avons modifié l'hétérocycle 7-N,N-diéthylamino déjà fluorescent pour améliorer ses caractéristiques photophysiques et lui transmettre une nouvelle réactivité par l'apport de substituants (fonctions esters, acides et amides) afin de préparer des composés capables de réactions spécifiques vis-à-vis de groupements fonctionnels.

Ces nouveaux composés seront donc susceptibles de présenter un état ICT ayant un transfert partiel d'électron initialement formé sous excitation. En milieu polaire, le groupement diéthylamino qui peut subir une rotation va positionner l'orbitale donneur perpendiculairement à l'orbitale accepteur et permettre un transfert total des charges d'où la formation de l'état TICT.

Pour les traceurs dont le groupement électroaccepteur est de force réduite, en raison de la longueur de délocalisation de la chaîne, les interactions donneur-accepteur seront compromises. En raison de la conjugaison du système π et bien que la formation de l'état TICT reste possible, puisque la rotation du groupement dialkylamino n'est pas empêchée, l'énergie de cet état sera certainement défavorable par rapport à celle de l'état ICT, ayant une conformation plane. Cela devrait conduire à un rendement quantique de fluorescence élevé de ces traceurs même dans des solvants de constante diélectrique élevée.

Partant de toutes ces constatations, nous avons choisi de synthétiser six nouveaux composés, ayant tous un groupement électrodonneur 7-diéthylamino libre de subir une rotation, et un groupement électroattracteur en position-3 de force plus ou moins grande (figure (I.6).1). La synthèse de ces composés est décrite dans le chapitre II suivant.

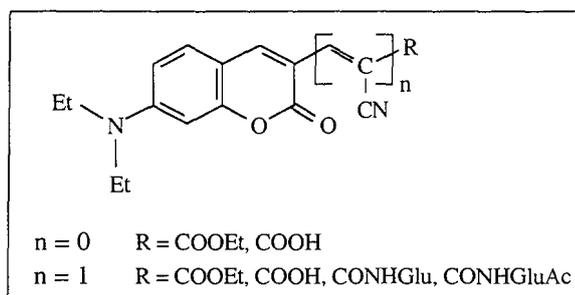


Figure (I.6).1

Structure de base des différentes coumarines synthétisées*.

* La structure détaillée des différents composés fait l'objet d'une fiche d'aide, jointe au manuscrit.

CHAPITRE II

SYNTHESE DES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

II.1. OBJECTIF DE LA SYNTHÈSE	41
II.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES	43
II.2.1. MATÉRIELS POUR LA SYNTHÈSE CHIMIQUE.....	43
<i>A/ Produits chimiques.....</i>	43
<i>B/ Solvants</i>	43
II.2.2. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SUIVI DES RÉACTIONS ET DE PURIFICATION DES PRODUITS.....	44
II.2.3. MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DES PRODUITS	44
II.3. DESCRIPTION DES MÉTHODES DE SYNTHÈSE	45
II.3.1. ROTOR DÉRIVÉ DU BENZIMIDAZOLE.....	45
II.3.2. ROTORS DÉRIVÉS DU THIOPHÈNE.....	45
<i>A/ Réaction de substitution nucléophile</i>	45
<i>B/ Réaction de Knœvenagel</i>	46
II.3.3. ROTORS DÉRIVÉS DES COUMARINES.....	47
<i>A/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (1)</i>	47
<i>B/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique (2).....</i>	48
<i>C/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4).....</i>	48
<i>i/ Voie de synthèse utilisant le malonate de diéthyle</i>	49
<i>ii/ Voie de synthèse utilisant le glutaconate de diéthyle</i>	49
<i>iii/ Bilan concernant les deux procédés.....</i>	51
<i>D/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle (6)</i>	51
<i>E/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique (7)</i>	52
II.3.4. SYNTHÈSE ET UTILISATION DE LA GLUCOSAMINE DANS SA FORME ACÉTYLÉE.....	52
<i>A/ Acétylation de la D-glucosamine.....</i>	53
<i>B/ Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée.....</i>	53
<i>C/ Hydrolyse des fonctions acétyles.....</i>	53
II.4. PROTOCOLES DE SYNTHÈSE ET CARACTÉRISTIQUES PHYSICO- CHIMIQUES	55
II.4.1. DÉRIVÉ BENZIMIDAZOLE.....	55
<i>A/ Synthèse du 2-(4'-N,N diméthylaminophényl)-5-carboxybenzimidazole.....</i>	55
II.4.2. DÉRIVÉS THIOPHÈNES	55
<i>A/ Synthèse des dérivés 2-formyl-5-N,N-dialkylaminothiophène.....</i>	55
<i>i/ Synthèse du 2-formyl-5-N,N-diméthylaminothiophène</i>	55
<i>ii/ Synthèse du 2-formyl-5-N,N-pipéridinothiophène.....</i>	56

<i>B/ Synthèse des dérivés 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-dialkylaminothiophène.....</i>	<i>56</i>
<i>i/ Synthèse du 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-diméthylaminothiophène.....</i>	<i>56</i>
<i>ii/ Synthèse du 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-pipéridinothiophène.....</i>	<i>57</i>
II.4.3. DERIVES COUMARINE.....	57
<i>A/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylate d'éthyle, (1)-Rotor COOEt</i>	<i>57</i>
<i>B/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique, (2)-Rotor COOH ..</i>	<i>58</i>
<i>C/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine, (3).....</i>	<i>59</i>
<i>D/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-acrylate d'éthyle, (5).....</i>	<i>60</i>
<i>E/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl, (4)</i>	<i>60</i>
<i>i/ Première voie de synthèse</i>	<i>60</i>
<i>ii/ Deuxième voie de synthèse</i>	<i>61</i>
<i>F/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle, (6)</i>	
<i>Rotor CNCOOEt</i>	<i>61</i>
<i>G/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique, (7)</i>	
<i>Rotor CNCOOH.....</i>	<i>62</i>
<i>H/ Synthèse et utilisation de la glucosamine sous sa forme acétylée</i>	<i>63</i>
<i>i/ Acétylation de la D-Glucosamine</i>	<i>63</i>
<i>ii/ Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée, (8)-Rotor CNCONHGluAc</i>	<i>64</i>
<i>iii/ Synthèse du 2-déoxy-2-[3-(7-N,N-diéthylaminocoumarine)-2-cyanoacryloyl]amino-D-glucose, (9)-Rotor CNCONHGlu.....</i>	<i>65</i>

II.5. CONCLUSION

II.1. OBJECTIF DE LA SYNTHÈSE

Avec l'objectif de pouvoir disposer de nouveaux traceurs fluorescents pour des applications d'intérêt biologique, nous avons réalisé la synthèse de rotors moléculaires fluorescents ayant des structures nouvelles par rapport à la gamme de rotors déjà disponibles au DCPR-GRAPP [Adibnejad, 1996 ; Bentikouk, 1990 ; Jungen, 1996].

Ainsi que nous venons de le voir, la particularité des rotors moléculaires est leur sensibilité aux modifications d'environnement (polarité, viscosité, température...). Leur incorporation dans des systèmes cellulaires devrait permettre d'appréhender les modifications de différents systèmes biologiques et d'observer des modifications à l'échelle submicronique grâce à la microscopie optique en champ proche.

Notre intérêt, lié aux systèmes biologiques nous a conduits tout naturellement à considérer des marqueurs fluorescents dont l'émission de fluorescence est déplacée vers les grandes longueurs d'onde. En effet, l'absorption dans la région visible (longueur d'onde d'excitation supérieure à 450 nm), dans le cas de matériaux biologiques, est préférable à l'absorption dans la région UV car les cellules biologiques peuvent présenter une fluorescence "naturelle" (flavines, NADH...) sous excitation UV [Valeur, 1993] qui serait alors confondue avec la fluorescence du traceur introduit.

Pour que ces traceurs présentent une spécificité, quant à leur localisation, vis-à-vis des systèmes biologiques nous avons choisi de greffer ces nouvelles sondes sur une molécule d'ancrage de type sucre : la glucosamine.

Au cours de cette dernière décennie divers types de rotors glucidiques ont été élaborés, et l'objectif de cette étude a été d'élargir la gamme des rotors moléculaires fluorescents.

Pour cela, nous avons synthétisé de nouveaux traceurs fluorescents ayant des longueurs d'onde d'absorption de l'ordre de 488 nm en augmentant la conjugaison existant entre les groupements électrodonneur et électroaccepteur de la molécule. Contrairement à ce qui a été fait jusqu'à présent au DCPR-GRAPP, nous n'avons pas cherché à augmenter le nombre de doubles liaisons liées au noyau benzénique des dérivés benzylidène ou cinnamylidène (figure (II.1).1), mais à introduire un hétérocycle insaturé accolé au noyau aromatique. Pour cela, trois types de composés susceptibles de présenter des longueurs d'onde d'absorption déplacées vers le rouge ont été sélectionnés (figure (II.1).2).

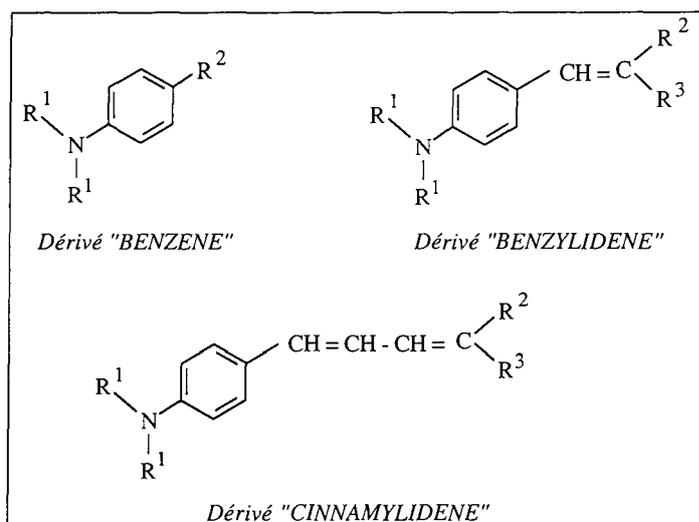


Figure (II.1).1

Formule de base des rotors de type benzène, benzylidène et cinnamylidène synthétisés au DCPR-GRAPP [Bentikouk, 1990 ; Adibnejad, 1996].

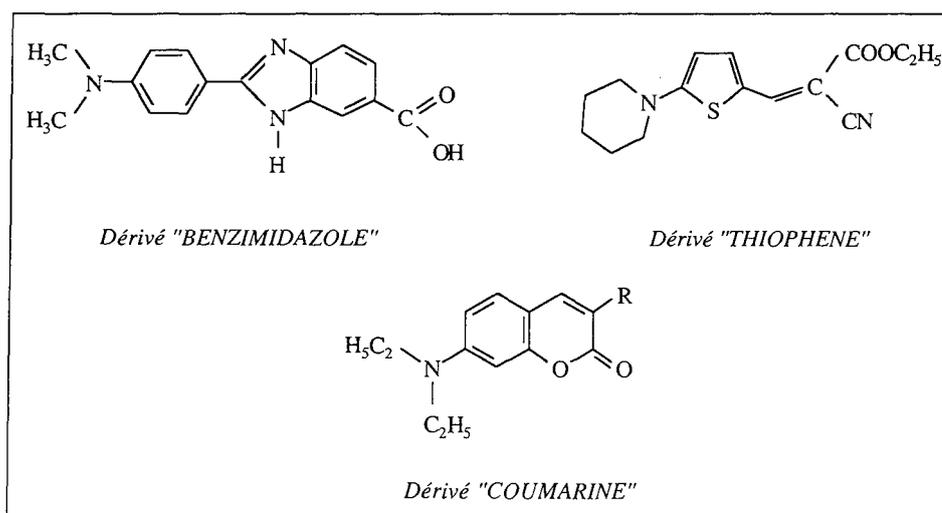


Figure (II.1).2

Formules de base des nouveaux rotors synthétisés.

En ce qui concerne la structure de ce chapitre, les réactions utilisées au cours des différentes étapes nécessaires à l'obtention des produit désirés seront décrites, ainsi que le détail des protocoles expérimentaux et des caractéristiques physico-chimiques des produits obtenus.

II.2. MATERIELS ET METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

II.2.1. MATERIELS POUR LA SYNTHÈSE CHIMIQUE

A/ Produits chimiques

Acétate de cuivre II	(Aldrich, réf. 32,675-5)	M = 181,64 g/mol
Acétate de sodium	(Aldrich, réf. 11,019-1)	M = 82,03 g/mol
Acide chlorhydrique 37%	(Fluka, réf. 84419)	M = 36,5 g/mol
Acide cyanoacétique	(Aldrich, réf. 23,997-6)	M = 85,06 g/mol
Acide 3,4-diaminobenzoïque	(Aldrich, réf. D1,260-0)	M = 152,15 g/mol
Anhydride acétique	(Aldrich, réf. 11,004-3)	M = 102,09 g/mol
Hydrogénocarbonate de sodium	(Lancaster, réf. 13292)	M = 84,01 g/mol
5-Bromo-2-thiophèncarboxaldéhyde	(Aldrich, réf. 15,262-5)	M = 191,05 g/mol
Chlorhydrate de D-Glucosamine	(Aldrich, réf. 23 046)	M = 118,97 g/mol
Cyanoacétate d'éthyle	(Fluka, réf. 28429)	M = 113,12 g/mol
4-(N,N-diméthylamino)benzaldéhyde	(Fluka, réf. 39 070)	M = 149,19 g/mol
4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde	(Aldrich, réf. 22,568-1)	M = 193,25g/mol
Glutaconate de diéthyle	(Aldrich, réf. D9,580-8)	M = 186 g/mol
1-Hydroxybenzotriazole	(Aldrich, réf. 15,726-0)	M = 135,13 g/mol
Malonate de diéthyle	(Aldrich, réf. D 9,775-4)	M = 160,17g/mol
Méthylate de sodium	(Aldrich, réf. 40,306-7)	M = 54,02 g/mol
Oxyde de magnésium	(Fluka, réf. 63090)	M = 40,31g/mol
Oxychlorure de phosphore	(Aldrich, réf. 20,117-0)	M = 153,33 g/mol
Periodate de sodium	(Aldrich, réf. 31,144-8)	M = 213,89 g/mol
Salicylaldéhyde	(Aldrich, réf. 22,568-1)	M = 193 g/mol
Sulfure de sodium nonahydrate	(Aldrich, réf. 43,164-8)	M = 240,18 g/mol
Tétroxyde d'osmium	(Aldrich, réf. 20,886-8)	M = 254,20 g/mol
Pipéridine	(Aldrich, réf. 41,102-7)	M = 96,24 g/mol
Pyridine	(Aldrich, réf. 27, 040-7)	M = 84,14 g/mol

B/ Solvants

Tous les solvants utilisés sont des solvants purs pour synthèse.

Acétate d'éthyle	(SdS, réf. 00202)
Acétone	(SdS, réf. 00502)
Benzène	(SdS, réf. 01602)
Chloroforme	(SdS, réf. 02402)

Dichlorométhane	(SdS, réf. 02902 E)
Diéthyléther	(SdS, réf. 04402)
Diméthylformamide	(SdS, réf. 03402)
Ethanol absolu	(SdS, réf. 01302)
Ether de pétrole	(SdS, réf. 04510)
Méthanol	(SdS, réf. 09302)

II.2.2. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES DE SUIVI DES REACTIONS ET DE PURIFICATION DES PRODUITS

Le suiti des réactions a généralement été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant comme adsorbant des plaques de silice, Kieselgel 60 F₂₅₄ (SdS, réf. CCM 221254).

La CCM nous a servi à analyser les mélanges réactionnels de façon qualitative, à identifier les composants des mélanges et à contrôler la pureté des produits finaux.

Les produits ont été dans la plupart des cas purifiés par une séparation utilisant la chromatographie liquide sur colonne (gel de silice, 70-200 µm, SdS, réf. 210 00 17).

II.2.3. METHODES DE CARACTERISATION DES PRODUITS

Les méthodes classiques de caractérisation de composés chimiques ont été utilisées pour confirmer les structures attendues lors des diverses réactions de synthèse mises en œuvre.

Les points de fusion sont mesurés sur un banc Kofler.

Les spectres d'absorption UV-Visible seront décrits dans le chapitre suivant, car les conditions d'absorption conditionnent les propriétés d'émission de fluorescence qui feront l'objet du chapitre III.

Les spectres de RMN ¹H ont été effectués sur un appareil Brücker AC 200 P. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage sont données en Hz. Les formes des signaux sont données de la manière suivante : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet.

Les spectres Infrarouge sont à transformée de Fourier et ont été effectués sur un appareil Brücker IFS 25. Les nombres d'onde sont exprimés en cm⁻¹, et seuls les signaux caractéristiques ont été répertoriés.

Les analyses élémentaires ont été réalisées au centre CNRS de Vernaison.

II.3. DESCRIPTION DES METHODES DE SYNTHESE

II.3.1. ROTOR DERIVE DU BENZIMIDAZOLE

Le premier composé auquel nous nous sommes intéressés est un dérivé benzimidazole. Celui-ci est obtenu par condensation de l'acide 3,4-diaminobenzoïque et du 4-(N,N diméthylamino) benzaldéhyde en présence d'acide (figure (II.3).1).

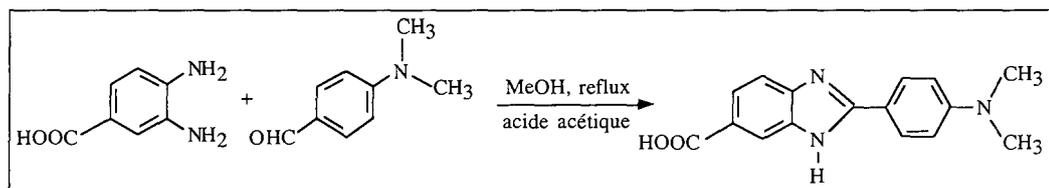


Figure (II.3).1

Schéma de synthèse du

2-[4'-(N,N diméthylamino)phényl]-5-carboxybenzimidazole [Denny, 1990].

En raison des résultats observés au cours de l'étude photophysique, et qui seront décrits dans le chapitre III, nous avons écarté de nos recherches les dérivés benzimidazole pour finalement nous intéresser aux dérivés thiophène.

II.3.2. ROTORS DERIVES DU THIOPHENE

Le second type de composé auquel nous nous sommes intéressés a largement été étudié comme matériau pour l'optique non linéaire [Jen, 1994]. En effet, ce type d'études utilise également des composés dont la structure chimique fait intervenir la juxtaposition de deux groupes, l'un donneur d'électrons, l'autre accepteur, séparés par une jonction plus ou moins longue mais permettant un transfert de charge intramoléculaire à l'état excité.

L'un des résultats décrit par Jen et al. montre que le remplacement, dans une molécule, d'un cycle benzène par un cycle thiophène augmente d'environ 50 nm sa longueur d'onde d'absorption.

Ce résultat nous a donc conduits à synthétiser une nouvelle "famille" de rotors en remplaçant le cycle benzénique par un cycle thiophène dans les rotors de type benzylidène (figures (II.1).1 et (II.1).2).

A/ Réaction de substitution nucléophile

La première étape de synthèse est une substitution nucléophile du brome porté par le 2-formyl-5-N,N-dialkylaminothiophène par une amine. Ce protocole décrit par Chippendale et al., 1974, a été appliqué à deux types d'amines : la diméthylamine et la pipéridine (figure (II.3).2).

En effet, en raison du caractère volatil de la diméthylamine, il nous a semblé judicieux de tester le protocole à partir d'une autre amine.

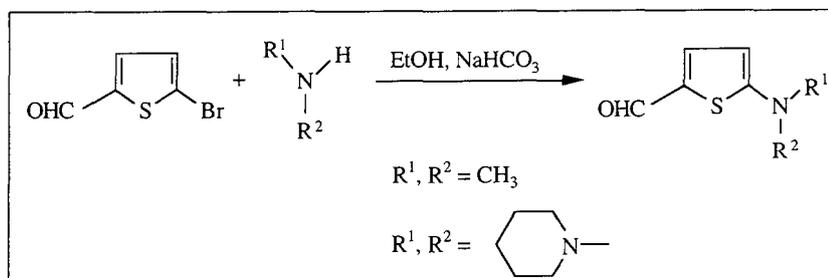


Figure (II.3).2

Schéma de synthèse de la substitution nucléophile conduisant au 2-formyl-5-N,N-dialkylaminothiophène.

Ces réactions ont été menées avec de très faibles rendements : 10% et 15% selon qu'on utilise respectivement la diméthylamine ou la pipéridine.

B/ Réaction de Knœvenagel

La réaction de Knœvenagel consiste à condenser l'aldéhyde hétérocyclique avec un composé méthylène actif pour aboutir à la formation d'une liaison éthylénique (figure (II.3).3). Le rendement de cette synthèse est de 90% quelle que soit l'amine utilisée.

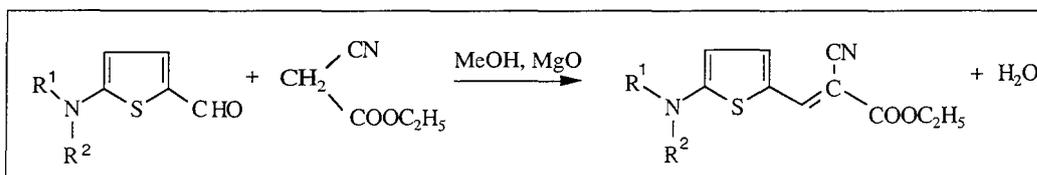


Figure (II.3).3

Schéma représentant la condensation de Knœvenagel conduisant au 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-dialkylaminothiophène.

La réaction se fait en présence soit d'un catalyseur basique (pipéridine) [Jones, 1967], soit d'une quantité stœchiométrique d'oxyde de magnésium selon un procédé légèrement modifié décrit par Moison et al., 1987. Le principe consiste à arracher un proton du méthylène actif de façon à ce que le carbanion formé réagisse sur la fonction carbonyle par attaque nucléophile selon le mécanisme proposé sur la figure (II.3).4.

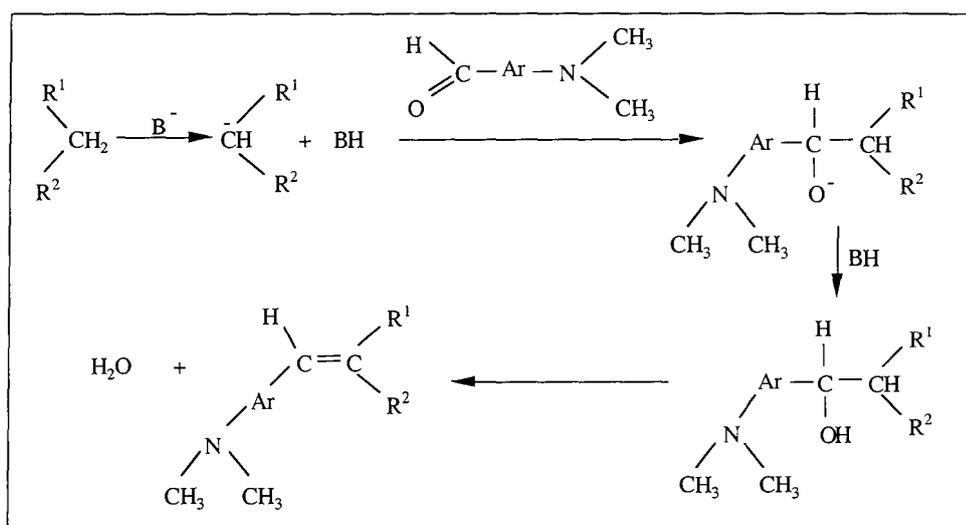


Figure (II.3).4

Mécanisme proposé pour la réaction de Knoevenagel.

En accord avec les travaux décrits par Jen et al., 1994, une augmentation de 50 nm de la longueur d'onde d'absorption a été obtenue, en remplaçant dans les dérivés benzylidène, le cycle aromatique par un cycle thiophène (chapitre III). Néanmoins, en raison des difficultés rencontrées pour synthétiser ces composés, nous n'avons pas développé davantage notre étude. En effet, il aurait été intéressant de synthétiser des dérivés thiophène analogues aux dérivés cinnamylidène, c'est-à-dire des composés comportant deux doubles liaisons.

A ce stade, une troisième voie de synthèse a été développée concernant des dérivés coumarine. Nous avons étudié ces composés qui sont souvent décrits comme fortement dépendants de la polarité des solvants [Rettig, 1986] mais également comme ayant des propriétés d'émission de fluorescence très intéressantes.

II.3.3. ROTORS DERIVES DES COUMARINES

Dans un premier temps, nous avons synthétisé la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle connue pour ses propriétés photophysiques intéressantes et son utilité en tant que marqueur fluorescent [Jones II, 1980]^{a, b}.

A/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (1)

Le produit est obtenu par condensation malonique, en milieu basique, entre le malonate de diéthyle et le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde (figure (II.3).5).

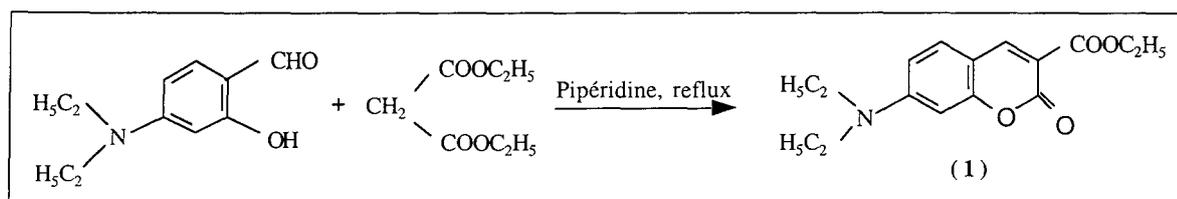


Figure (II.3).5

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle [Van Gompel, 1987].

Nous avons obtenu à l'issue de cette synthèse, des cristaux jaunes avec un rendement de 85%. La saponification de ce composé nous a donné son homologue acide.

B/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique (2)

Ce composé est obtenu par hydrolyse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (1) en présence d'acide chlorhydrique concentré (figure (II.3).6).

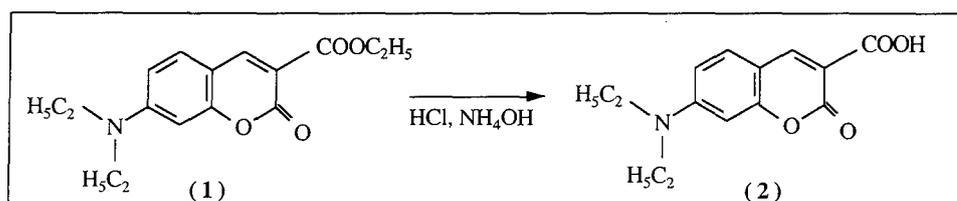


Figure (II.3).6

Schéma de synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique [Van Gompel, 1987].

Nous avons obtenu à l'issue de cette synthèse, une poudre orange d'une grande pureté avec un rendement de 78%.

En raison de la facilité de mise en œuvre de la synthèse des coumarines, et des premiers résultats de photophysique correspondant à ce que nous attendions, nous avons voulu augmenter la longueur d'onde d'absorption des composés obtenus. Nous avons alors envisagé d'introduire un groupement 2-cyanopropénoate d'éthyle en position-3, ce qui a nécessité la synthèse d'un composé intermédiaire, la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4).

C/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4)

Pour la préparation de ce produit, nous avons voulu tester deux protocoles différents. Le premier a fait l'objet d'un brevet [Harnisch, 1975], tandis que le second est issu d'une publication beaucoup plus récente [Padmanabhan, 1996].

i/ Voie de synthèse utilisant le malonate de diéthyle

Le premier procédé auquel nous nous sommes intéressés utilise comme produit de départ la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (1) décrite précédemment (§ II.3.3.A) et fait intervenir deux étapes supplémentaires.

La première étape est une décarboxylation en milieu acide de la fonction éthoxycarboxyle en position-3 pour conduire à la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine (3) (figure (II.3).7). Le produit final est obtenu avec un rendement de 92%.

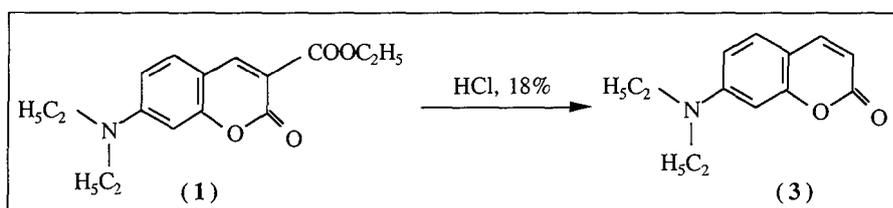


Figure (II.3).7

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine
[Harnisch, 1975].

La 7-(N,N-diéthylamino)coumarine (3) peut être formylée par une réaction de Vilsmeier-Haack mettant en jeu l'action de POCl_3 dans le diméthylformamide pour conduire à l'aldéhyde désiré (figure (II.3).8).

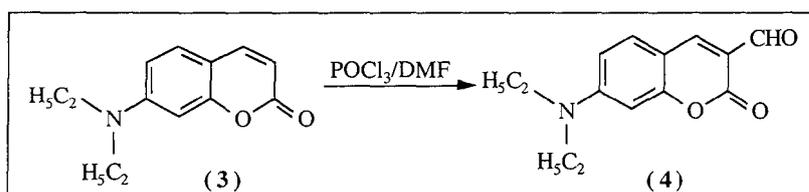


Figure (II.3).8

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl
[Harnisch, 1975].

Le produit se présentant sous forme de cristaux oranges a été isolé avec un rendement de 70%.

ii/ Voie de synthèse utilisant le glutaconate de diéthyle

Le second procédé auquel nous nous sommes intéressés fait intervenir le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde, et le glutaconate de diéthyle dans une condensation de Knœvenagel, en milieu basique (figure (II.3).9).

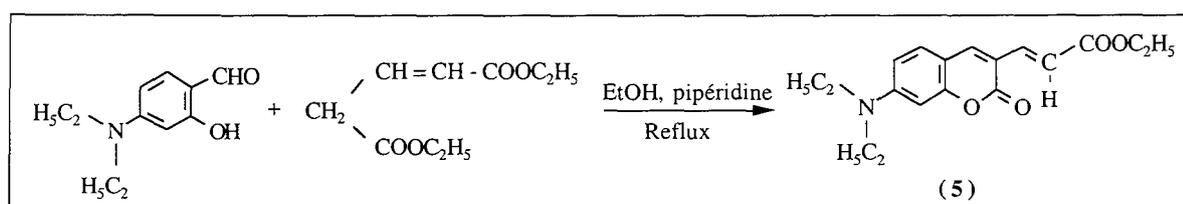


Figure (II.3).9

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-acrylate d'éthyle
[Padmanabhan, 1996].

Cette synthèse conduit à la formation d'un composé solide orange avec un rendement de 90%.

La double-liaison de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-acrylate d'éthyle (5) est ensuite soumise à une cis-dihydroxylation par le tétraoxyde d'osmium. Une réaction de Malaprade (oxydation du diol par NaIO_4), conduit à la formation de l'aldéhyde désiré (figure (II.3).10).

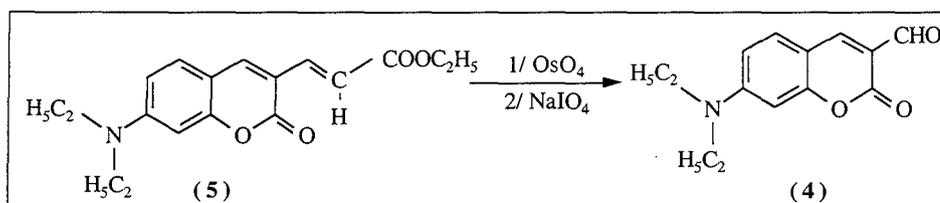
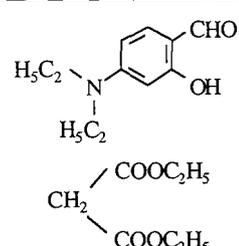
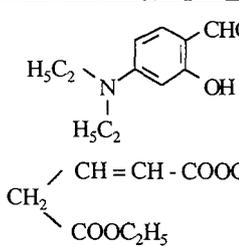
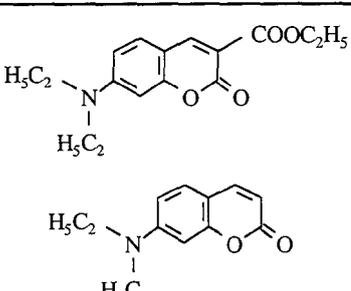
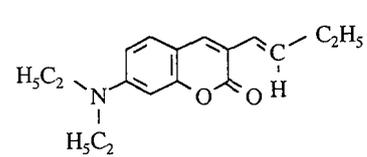
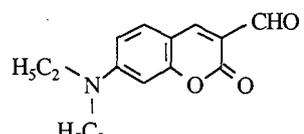


Figure (II.3).10

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl
[Padmanabhan, 1996].

L'aldéhyde est obtenu avec un rendement de 83%. L'analyse en RMN du proton montre la présence de traces d'impuretés, qui n'étaient pas constatées avec le premier procédé.

iii/ Bilan concernant les deux procédés

	Procédé 1 [HARNISCH, 1975]	Procédé 2 [PADMANABHAN, 1996]
PRODUITS DE DEPART		
PRODUITS INTERMEDIAIRES		
PRODUIT FINAL		
NOMBRE D'ETAPES	3	2
RENDEMENT GLOBAL	55%	75%
PURETE DU PRODUIT (Déterminée par RMN ¹ H)	Très satisfaisante	Peu satisfaisante
COÛT EN REACTIFS (F / g de produit synthétisé)	49	94

Le premier procédé, bien qu'ayant un rendement inférieur au second, et mettant en jeu une étape supplémentaire, présente de nombreux avantages. En effet, c'est le procédé qui présente le prix de revient le plus bas, et qui permet d'obtenir des produits intermédiaires de grande pureté pour la suite des expériences. Enfin, les protocoles mis en jeu dans ce procédé sont faciles à réaliser.

D/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle (6)

Le produit est obtenu par une condensation de Knoevenagel entre la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4) et le cyanoacétate d'éthyle en présence de pipéridine (figure (II.3).11).

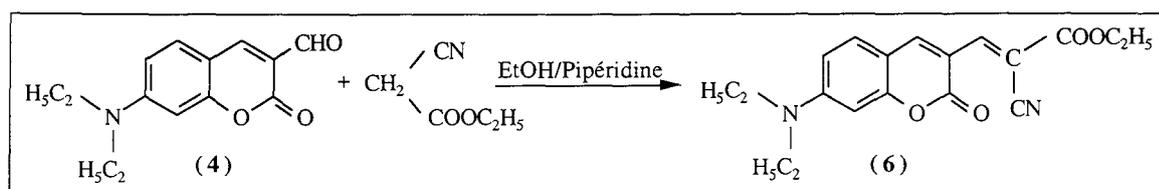


Figure (II.3).11

Schéma de synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle [Harnisch, 1975].

Cette synthèse a conduit à la formation d'un composé solide de couleur rouge avec un rendement de 70%.

E/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique (7)

On effectue une condensation de Knoevenagel entre la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4) et l'acide cyanoacétique en présence de pipéridine (figure (II.3).12).

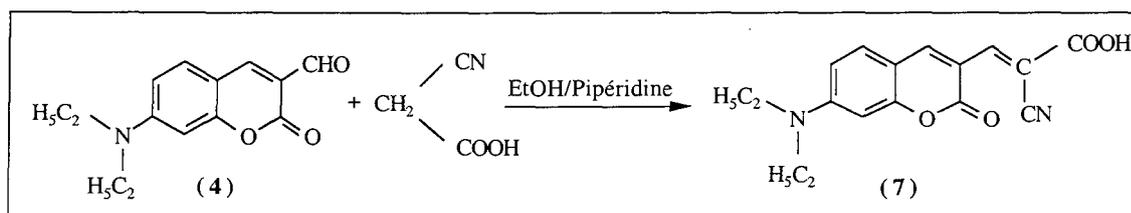


Figure (II.3).12

Schéma de synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique [Harnisch, 1975].

Le rendement de la réaction est de 80% et on obtient un composé solide de couleur rouge.

II.3.4. SYNTHÈSE ET UTILISATION DE LA GLUCOSAMINE DANS SA FORME ACÉTYLÉE

Pour réaliser la synthèse des amides glucidiques, il n'a pas été possible de condenser directement la glucosamine sous sa forme commerciale en raison de sa trop forte polarité ; il a fallu avoir recours à la condensation de son dérivé acétylé (§ II.3.4.B) suivie de l'hydrolyse des fonctions acétyle (§ II.3.4.C). Le schéma de ces différentes étapes est présenté sur la figure (II.3).13.

A/ Acétylation de la D-glucosamine

L'acétylation de la D-glucosamine est effectuée selon le schéma réactionnel décrit sur la figure (II.3).13 [Bergmann, 1932 ; Dardoize, 1989].

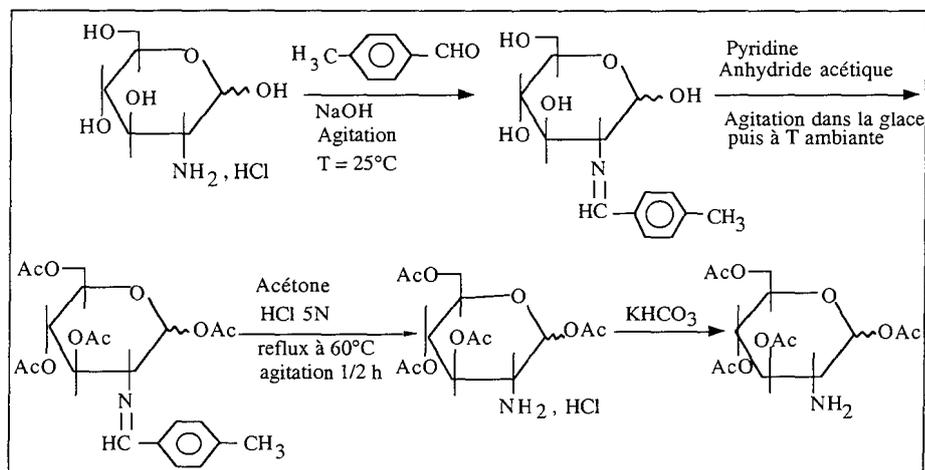


Figure (II.3).13

Schéma représentant les étapes nécessaires à l'acétylation de la D-glucosamine.

B/ Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée

La condensation de la glucosamine dans sa forme acétylée sur le rotor acide (7) (rendement : 40%), est réalisée dans le diméthylformamide à température ambiante, en utilisant une activation de la fonction carboxylique par le couple N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI)/1-hydroxybenzotriazole (HOBT) (figure (II.3).14) [Dardoize, 1989].

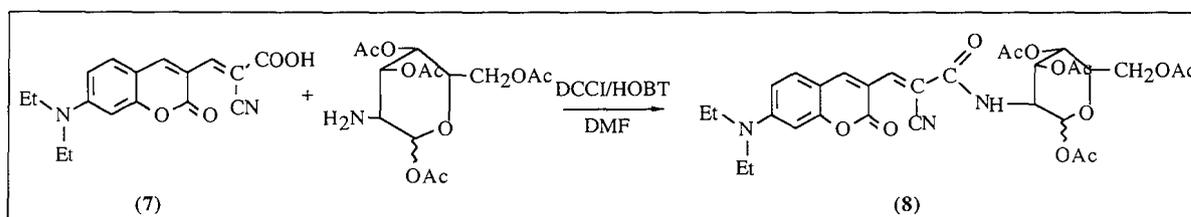


Figure (II.3).14

Schéma représentant la condensation de la D-glucosamine sur l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique.

C/ Hydrolyse des fonctions acétyles

Pour revenir à la forme non acétylée du groupe glucosamine, une hydrolyse en milieu basique du composé précédent a été effectuée (rendement : 60%). Cette étape est réalisée dans le méthanol anhydre en présence de MeONa (figure (II.3).15).

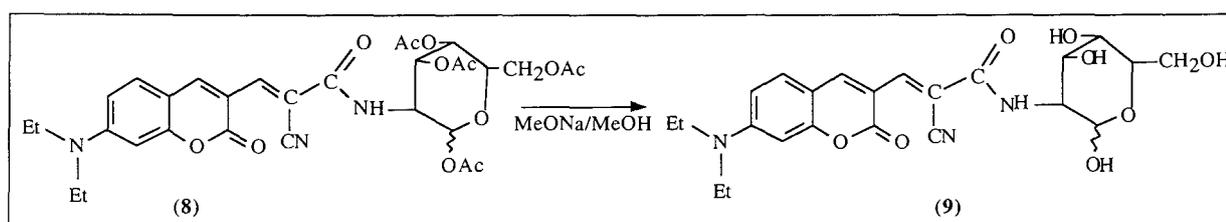


Figure (II.3).15

Schéma représentant l'hydrolyse de la forme acétylée du
2-déoxy-2-[3-(7-N,N-diéthylaminocoumarine)-2-cyanoacryloyl]amino-D-glucose.

II. 4. PROTOCOLES DE SYNTHÈSE ET CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

II.4.1. DERIVÉ BENZIMIDAZOLE

A/ Synthèse du 2-(4'-N,N diméthylaminophényl)-5-carboxybenzimidazole

A l'acide 3,4-diaminobenzoïque (0,8 g ; 5,5 mmol) dissous dans une solution de NaOH 0,3 N sont ajoutées quelques gouttes d'acide acétique jusqu'à atteindre un pH 3. On ajoute alors le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (1,095 g ; 7,35 mmol) dissous dans 40 mL de méthanol et l'acétate de cuivre II (1,5 g ; 7,51 mmol) dissous dans 20 mL d'eau. Le mélange est chauffé sous agitation jusqu'à ébullition, et maintenu sous reflux pendant 30 min.

La solution résultante est filtrée à chaud et le précipité, lavé à l'eau, est dissous dans une solution constituée de 40 mL d'éthanol et 2 mL de HCl concentré. Au mélange précédent est ajoutée une solution aqueuse de 2 g de sulfure de sodium nonahydrate ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) qui est ensuite acidifiée avec HCl concentré.

Le mélange obtenu est alors filtré à chaud, pour éliminer le précipité de sulfure de cuivre, et dilué dans 20 mL d'eau. Le pH est ajusté à 5-6. La solution est alors concentrée de moitié et le précipité obtenu est redissous dans de l'éthanol bouillant. Le produit final ($M = 281 \text{ g/mol}$) est recristallisé dans le DMF.

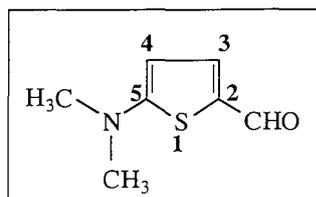
II.4.2. DERIVÉS THIOPHÈNE

A/ Synthèse des dérivés 2-formyl-5-N,N-dialkylaminothiophène

i/ Synthèse du 2-formyl-5-N,N-diméthylaminothiophène

Dans un ballon de 250 mL, est introduit un mélange équimolaire (10,5 mmol) de 5-bromo-2-thiophénecarboxaldéhyde (2 g) et d'hydrogénocarbonate de sodium (0,882 g) dans 100 mL d'éthanol en présence de diméthylamine en solution dans l'éthanol (60 mmol ; 12 mL de sol. à 33%).

Le mélange est agité à température ambiante pendant 20h puis filtré. L'éthanol est évaporé sous pression réduite, pour donner un résidu qui est dissous dans du dichlorométhane. Cette solution est lavée à l'eau et la phase organique est séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : CHCl_3) pour conduire au produit attendu avec un rendement très faible ($M = 155 \text{ g/mol}$; 10%).

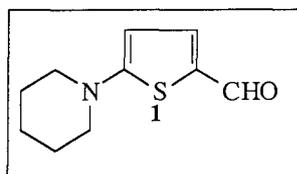


- RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

3,15 (6H, s, -N(CH ₃) ₂)	7,56 (1H, d, H ₃ , J = 5,54 Hz)
5,85 (1H, d, H ₄ , J = 5,54 Hz)	9,58 (1H, s, -CHO)

ii/ Synthèse du 2-formyl-5-N,N-pipéridinothiophène

Le protocole expérimental est le même que celui décrit précédemment, en utilisant comme amine la pipéridine. Le mélange réactionnel est agité sous reflux pendant 20h, et le résidu final est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/Hexane, 1/1, v/v) pour conduire au produit attendu (M = 195 g/mol ; 15%).



- RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

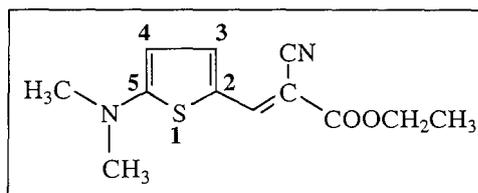
1,6 (10H, m, -N(C ₅ H ₁₀))	7,56 (1H, d, H ₃ , J = 5,54 Hz)
5,85 (1H, d, H ₄ , J = 5,54 Hz)	9,58 (1H, s, -CHO)

B/ Synthèse des dérivés 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-dialkylaminothiophène

i/ Synthèse du 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-diméthylaminothiophène

Dans un ballon de 100 mL, on introduit un mélange équimolaire (10 mmol) de 2-formyl-5-N,N-diméthylaminothiophène (1,55 g) et de cyanoacétate d'éthyle (1,13 g ; 1,1 mL) dans 20 mL de méthanol en présence de 12 mmol (0,48 g) de MgO.

Le mélange réactionnel est agité pendant 24h à température ambiante. La solution résultante est filtrée sur célite rincée au dichlorométhane. Le solvant est évaporé avec l'évaporateur rotatif, et le produit solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/Hexane, 1/1, v/v) pour conduire au produit attendu (M = 250 g/mol ; 90%).

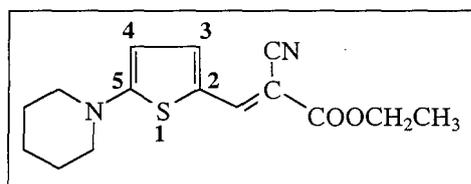


- RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,23 (3H, t, $-\text{CH}_3$)	6,02 (1H, d, $-\text{H}_4$, $J = 5$ Hz)
3,32 (6H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$)	7,54 (1H, d, $-\text{H}_3$, $J = 5$ Hz)
4,12 (2H, q, $-\text{CH}_2-$)	7,89 (1H, s, $-\text{H}_6$)

ii/ Synthèse du 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-pipéridinothiophène

Le protocole expérimental est le même que celui décrit précédemment, en utilisant comme amine la pipéridine. Le résidu final est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt/Hexane, 4/6, v/v) pour conduire au produit attendu ($M = 290$ g/mol ; 92%).



- RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

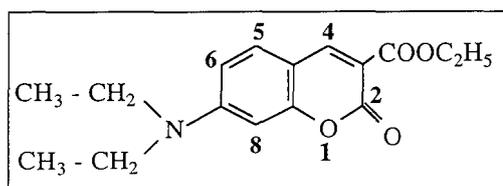
1,25 (3H, t, $-\text{CH}_3$)	6,12 (1H, d, $-\text{H}_4$, $J = 5$ Hz)
1,72 (10H, m, $-\text{N}(\text{C}_5\text{H}_{10})$)	7,44 (1H, d, $-\text{H}_3$, $J = 5$ Hz)
4,12 (2H, q, $-\text{CH}_2-$)	8,15 (1H, s, $-\text{H}_6$)

II.4.3. DERIVES COUMARINE

A/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle, (1)-Rotor COOEt

Le malonate de diéthyle (20,7 mmol ; 2,4 g), le 4-diéthylamino 2-hydroxybenzaldéhyde (13,8 mmol ; 2,7 g) et la pipéridine (41,5 mmol ; 4,5 mL) sont dissous dans un mélange constitué de 50 mL d'acétonitrile et de 100 mL de toluène. Le mélange est porté à reflux pendant 3h puis lentement distillé de façon azéotropique. L'éthanol et l'eau produits par la réaction de condensation sont distillés en premier ; par ajout de toluène, l'acétonitrile est éliminé par distillation azéotropique.

Le résidu obtenu est purifié sur colonne chromatographique (AcOEt/ CH_2Cl_2 , 1/9, v/v). Les cristaux obtenus (coloration jaune) sont isolés par filtration, lavés avec du pentane et séchés ($M = 289$ g/mol ; 85%).



• Point de fusion : 74°C

• IR (KBr)

1735 (-COOEt) cm⁻¹

• RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,23 (6H, t, -N(CH₂-CH₃)₂)

6,47 (1H, d, -H₈), J = 2,5 Hz

1,39 (3H, t, -O-CH₂-CH₃)

6,60 (1H, dd, -H₆), J = 2,5 et 9 Hz

3,45 (4H, q, -N(CH₂-CH₃)₂)

7,37 (1H, d, -H₅), J = 9 Hz

4,39 (2H, q, -O-CH₂-CH₃)

8,43 (1H, s, -H₄)

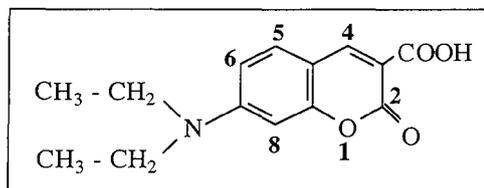
• Analyse : C₁₆H₁₉NO₄

Calc. % : C 66,42 ; N 4,84 ; H 6,63.

Tr. : 66,53 ; 5,18 ; 6,64.

B/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique, (2)-Rotor COOH

La 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (14 mmol ; 4,1 g) est dissoute dans 210 mL d'acide chlorhydrique concentré, le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Au mélange réactionnel refroidi dans un bain de glace et maintenu sous agitation, on ajoute lentement 140 mL de NH₄OH. Le précipité orange est isolé par filtration, lavé à l'eau puis suspendu dans 320 mL d'eau. Une solution de NaOH à 10% est ajoutée goutte à goutte jusqu'à disparition du solide en suspension. La solution orange est filtrée et lentement réacidifiée avec une solution de HCl à 10%. L'acide précipité est filtré, lavé à l'eau et séché sous vide. Le produit résultant est obtenu avec une grande pureté (M = 261 g/mol ; 78%).



• Point de fusion : 228°C

• IR (KBr)

1736 (COOH) cm⁻¹

3459 (COOH) cm⁻¹

- RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz)

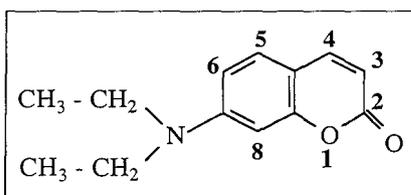
1,27 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,45 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,49 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	8,65 (1H, s, -H ₄)
6,53 (1H, d, -H ₈), J = 2,3 Hz	12,4 (1H, s, -COOH)
6,73 (1H, dd, -H ₆), J = 2,3 et 9 Hz	
- Analyse : C₁₄H₁₅NO₄

Calc. % : C 64,36 ; N 5,36 ; H 5,79.

Tr. : 66,53 ; 5,56 ; 6,01.

C/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine, (3)

Un mélange de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (2 g ; 7 mmol) dans 10 mL de HCl à 18% est porté à reflux pendant 5h. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante puis à 0°C, 2 mL d'une solution saturée d'acétate de sodium sont ensuite ajoutés. Après addition de 20 mL d'une solution de NaOH à 10% jusqu'à atteindre un pH de 4-5, le précipité obtenu est dissous, puis extrait par le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec le reste de la solution NaOH à 10% puis séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif on obtient un produit cristallisé (M = 217 g/mol ; 92%).



- Point de fusion : 95°C
- IR (KBr)

1616 (C=C) cm ⁻¹
1703 (C=O) cm ⁻¹
- RMN 1H ($CDCl_3$, 200 MHz)

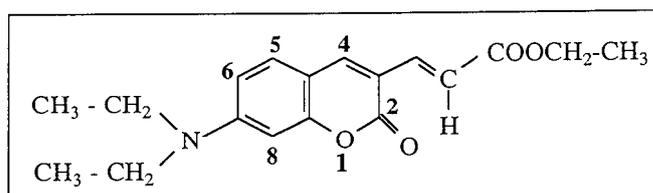
1,20 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	6,55 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 et 9 Hz
3,41 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,52 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
6,01 (1H, d, -H ₃), J = 9 Hz	7,22 (1H, d, -H ₄), J = 9 Hz
6,47 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	
- Analyse : C₁₃H₁₅NO₂

Calc. % : C 71,87 ; N 6,45 ; H 6,95.

Tr. : 71,95 ; 6,59 ; 6,99.

D/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-acrylate d'éthyle, (5)

A une solution de 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde (12 mmol ; 2,3 g) et de glutaconate de diéthyle (12,6 mmol ; 2,34 g) dans 30 mL d'éthanol, on ajoute environ 30 gouttes de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 6h, puis refroidi à température ambiante. Les cristaux oranges obtenus sont filtrés et lavés avec du pentane, puis recristallisés dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (M = 315 g/mol ; 90%).



- Point de fusion : 124°C
- IR (KBr)
1709 (COOEt) cm⁻¹
- RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,20 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	6,57 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 et 9 Hz
1,30 (3H, t, -O-CH ₂ -CH ₃)	6,95 (1H, d, -CH=CH-COOEt), J = 15 Hz
3,43 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,29 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
4,23 (2H, q, -O-CH ₂ -CH ₃)	7,54 (1H, d, -CH=CH-COOEt), J = 15 Hz
6,46 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	7,71 (1H, s, -H ₄)
- Analyse : C₁₈H₂₁NO₄
Calc. % : C 68,55 ; N 4,44 ; H 6,72.
Tr. : 68,51 ; 4,57 ; 6,70.

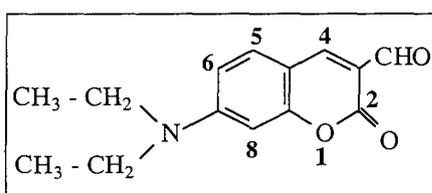
E/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl, (4)

i/ Première voie de synthèse

A 0,7 mL de DMF (9,5 mmol) agité, on ajoute goutte à goutte 0,9 mL de POCl₃ (9,7 mmol) sous atmosphère inerte pendant 45 min à 50°C. A cette solution sont ajoutées 6,8 mmol de 7-(N,N-diéthylamino)coumarine (1,5 g) dissoutes dans 1,7 mL de DMF (23,8 mmol). Le mélange est chauffé à 60°C pendant 2h. On introduit ensuite 14 mL d'eau glacée dans le mélange réactionnel et l'agitation est poursuivie pendant 2h. Le précipité orange est filtré, lavé à l'eau et séché (M = 245 g/mol ; 70%).

ii/ Deuxième voie de synthèse

A une solution de 3,17 mmol de 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-acrylate d'éthyle (1 g) dans 12 mL de THF et 3 mL d'eau, on ajoute 5 mL d'une solution de OsO₄ à 2,5% dans le *t*-butanol. Le mélange est agité pendant 1h à température ambiante, puis on ajoute 6,97 mmol (1,5 g) de NaIO₄ en poudre sur une durée de 30 min. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 jours. Le solvant est évaporé et la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, on recueille un produit solide de coloration orange dont la RMN¹H est identique à celle du composé issu de la réaction de Vilsmeier-Haack. On note cependant la présence d'un bruit de fond plus important et la présence de quelques pics dus à des impuretés (M = 245 g/mol ; 83%).

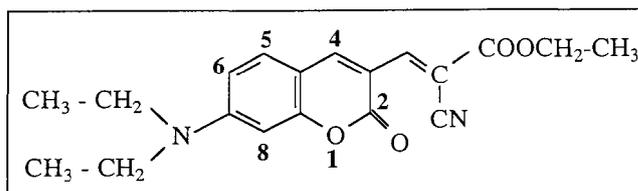


- Point de fusion : 170°C
- IR (KBr)
 - 1719 (HC=O) cm⁻¹
 - 2715 (HC=O) cm⁻¹
- RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,26 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,42 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,48 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	8,26 (1H, s, -H ₄), J = 9 Hz
6,49 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	10,13 (1H, s, -CHO)
6,63 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 Hz et 9 Hz	
- Analyse : C₁₄H₁₅NO₃
 - Calc. % : C 68,56 ; N 5,71 ; H 6,16.
 - Tr. : 68,04 ; 5,76 ; 6,14.

F/ Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle, (6)-Rotor CNCOOEt

Un mélange constitué de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (4 mmol ; 1 g), et de cyanoacétate d'éthyle (5 mmol ; 0,5 mL) dans 6 mL d'éthanol est traité avec 80 mL de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 1h, concentré à l'évaporateur rotatif et purifié sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂/cyclohexane, 10%, v/v). On obtient un produit solide de couleur rouge foncé (M = 340 g/mol ; 70%).

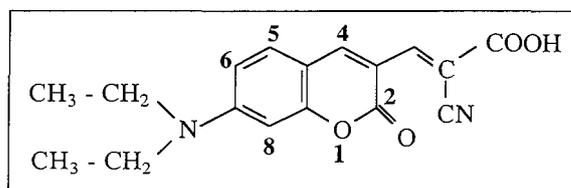


- Point de fusion : 126°C
- IR (KBr)
 - 1725 (COOEt) cm^{-1}
 - 2211 (CN) cm^{-1}
- RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	6,61 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 et 9 Hz
1,38 (3H, t, -O-CH ₂ -CH ₃)	7,41 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,47 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	8,55 (1H, s, -H ₄)
4,36 (2H, q, -O-CH ₂ -CH ₃)	8,87 (1H, s, -CH=)
6,45 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	
- Analyse : C₁₉H₂₀N₂O₄
 - Calc. % : C 67,04 ; N 8,23 ; H 5,93.
 - Tr. : 66,88 ; 7,91 ; 6,08.

G/ Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique, (7)-Rotor CNCOOH

Un mélange constitué de 2 mmol de 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-formyl (0,5 g) et de 4 mmol (0,4 g) d'acide cyanoacétique dans 7 mL d'éthanol est traité avec 40 μL de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 1h, concentré à l'évaporateur rotatif et purifié sur colonne de silice (éluant : CH_2Cl_2 pour éliminer le produit de départ puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8/2, v/v). On obtient un produit solide de couleur rouge (M = 312 g/mol ; 80%).



- Point de fusion : 263°C
- IR (KBr)
 - 1729 (COOH) cm^{-1}
 - 2218 (CN) cm^{-1}
 - 3431 (COOH) cm^{-1}

- RMN ¹H (Acétone D₆, 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	6,88 (1H, dd, -H ₆), J = 2,4 et 9 Hz
3,01 (1H, s, -OH)	7,62 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,64 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	8,46 (1H, s, -H ₄)
6,59 (1H, d, -H ₈), J = 2,4 Hz	8,82 (1H, s, -CH=C-)

- Analyse : C₁₇H₁₆N₂O₄

Calc. % : C 65,38 ; N 8,97 ; H 5,16.

Tr. : 65,29 ; 8,10 ; 5,49.

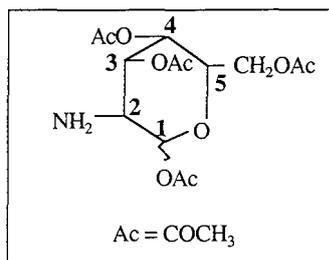
H/ Synthèse et utilisation de la glucosamine sous sa forme acétylée

i/ Acétylation de la D-Glucosamine

Au chlorhydrate de D-glucosamine (46,5 mmol ; 10,03 g) dissous dans une solution de NaOH 1N (50 mL) maintenue sous agitation à 2°C, est ajouté le *p*-tolualdéhyde (1 éq. mol. ; 46,5 mmol ; 5,6 g). Après 1h d'agitation, le précipité obtenu est filtré, lavé successivement avec de l'eau froide, de l'éthanol et de l'éther éthylique, puis mis à sécher au dessiccateur sous vide pour conduire à l'imine (N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine) (M = 281 g/mol ; 87%).

Un excès d'anhydride acétique (10,2 éq. mol. ; 159 mmol ; 15 mL) est additionné goutte à goutte à la N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine (15,5 mmol ; 4,37 g) dissoute dans de la pyridine (27 mL) maintenue sous agitation à 0°C et sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est ensuite laissé sous agitation à 25°C pendant 24h. Le produit brut est jeté sur de l'eau glacée. Le précipité est filtré, lavé à l'eau et à l'éthanol, puis laissé une nuit au dessiccateur sous vide pour conduire à la N-(*p*-méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine (M = 449 g/mol ; 67%).

A une solution de N-(*p*-méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine (10,38 mmol ; 4,66 g) dans l'acétone (30 mL) est ajouté 1 éq. mol. d'acide chlorhydrique 5 N (2,1 mL). Un précipité blanc se forme rapidement, après 30 min d'agitation à température ambiante, le brut réactionnel est dissous dans de l'eau et l'acétone évaporée sous vide. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ pour éliminer l'aldéhyde. La phase aqueuse est ensuite neutralisée par de l'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO₃) et extraite au CH₂Cl₂. La phase organique séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée conduit à la D-glucosamine tétra-O-acétylée (M = 347 g/mol ; 85%).

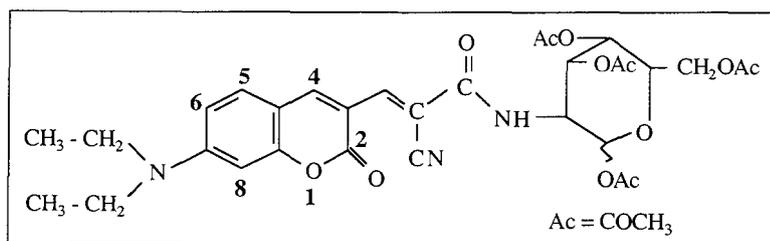


- Point de fusion : 138 °C
- RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,55 (2H, m, -NH ₂)	4,08 ; 4,33 (2H, m, -CH ₂ -OAc)
2,05 ; 2,10 ; 2,13 ; 2,23 (12H, 4 s, 4 -OCOCH ₃)	5,05 (2H, m, H ₃ , H ₄)
3,03 (1H, t, H ₂ , J = 9 Hz)	5,46 (1H, d, H ₁ , J = 8,5 Hz)
3,80 (1H, m, H ₅)	

ii/ Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée, (8)-Rotor CNCONHGluAc

L'acide CNCOOH (7) (3,37 mmol ; 1 g) est dissous dans 8,5 mL de CH₂Cl₂. A cette solution maintenue à 0°C, sous atmosphère d'azote et sous agitation, on ajoute successivement l'HOBt (1,2 éq. mol. ; 4 mmol ; 0,54 g) en solution dans 6 mL de DMF, la DCCI (1 éq. mol. ; 3,37 mmol ; 0,7 g) dissoute dans 6 mL de CH₂Cl₂. Après retour à température ambiante et agitation du milieu réactionnel pendant 30 min, la D-glucosamine sous forme acétylée (1 éq. mol. ; 3,37 mmol ; 1,17 g) solubilisée dans 6 mL de CH₂Cl₂ est additionnée goutte à goutte. On laisse le tout sous agitation à 25°C pendant 2 jours. Le mélange est ensuite filtré, lavé avec CH₂Cl₂. La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de NaHCO₃ et séchée sur du sulfate de magnésium. Après filtration, le solvant (CH₂Cl₂) est évaporé sous vide et le résidu chromatographié sur gel de silice (AcOEt/CH₂Cl₂, 1/4, v/v) pour conduire au produit désiré (M = 641 g/mol ; 40%).



- RMN ¹H (DMSO d₆, 200 MHz)

En plus des groupements de la D-glucosamine acétylée on peut observer sur le spectre :

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,48 (1H, d, -CO-NH-, J = 7,5 Hz)
2,05 ; 2,10 ; 2,13 ; 2,23 (12H, 4 s, 4 -OCOCH ₃)	7,62 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,64 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	8,46 (1H, s, -H ₄)
6,59 (1H, d, -H ₈), J = 2,4 Hz	8,82 (1H, s, -CH = C)
6,88 (1H, dd, -H ₆), J = 2,4 et 9 Hz	

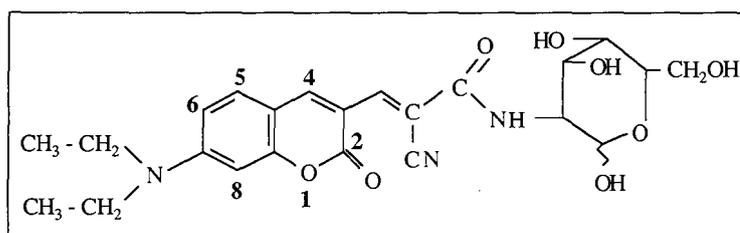
- Analyse : $C_{31}H_{35}N_3O_{12}$

Calc. % : C 58,03 ; N 6,55 ; H 5,46.

Tr. : 58,34 ; 6,67 ; 5,45.

iii/ Synthèse du 2-déoxy-2-[3-(7-N,N-diéthylaminocoumarine)-2-cyanoacryloyl]amino-D-glucose, (**9**)-Rotor CNCONHGlucose

Le dérivé acétylé CNCONHGlucose (0,25 mmol ; 0,16 g) est solubilisé dans 6 mL de méthanol anhydre en présence de MeONa (50 μ L ; 0,5 M dans MeOH). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 28h (le déblocage est suivi par CCM, éluant $CHCl_3/MeOH$, 10/1 puis 10/5, v/v). Le méthanol est évaporé sous vide, et le précipité résultant est lavé à l'eau, puis à l'éther éthylique. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice ($MeOH/CH_2Cl_2$, 2/8, v/v) pour conduire au produit attendu ($M = 473$ g/mol ; 60%).



- RMN 1H (DMSO d_6 , 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	6,88 (1H, dd, -H ₆), J = 2,4 et 9 Hz
3,64 (4H, q, -N(CH ₂ -CH ₃) ₂)	7,48 (1H, d, -CO-NH-, J = 7,5 Hz)
4,08 ; 4,33 (2H, m, -CH ₂ -OH)	7,62 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
4,46 ; 4,69 ; 4,96 ; 5,11 (4H, m, -OH)	8,46 (1H, s, -H ₄)
6,59 (1H, d, -H ₈), J = 2,4 Hz	8,82 (1H, s, -CH=)

- Analyse : $C_{23}H_{27}N_3O_8$

Calc. % : C 58,34 ; N 8,87 ; H 5,75.

Tr. : 58,34 ; 8,67 ; 5,65.

II.5. CONCLUSION

Les synthèses que nous avons développées nous ont donc permis d'obtenir de nouveaux rotors moléculaires, pour lesquels les caractéristiques d'absorption UV-Visible et d'émission de fluorescence vont faire l'objet du chapitre III suivant.

Les cinq nouveaux rotors synthétisés seront nommés pour la suite de la manière suivante :

COMPOSE	NOMENCLATURE ADOPTEE
1	COOEt
2	COOH
6	CNCOOEt
7	CNCOOH
8	CNCONHGluAc
9	CNCONHGlu

Parmi eux, seuls les rotors CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc feront l'objet d'études dans des milieux membranaires artificiels (liposomes de DPPC), afin de pouvoir discuter de l'influence de la fonction glucosamine. Parallèlement, nous comparerons les rotors CNCONHGlu et CNCONHGluAc qui n'ont pas la même polarité, et ne présentent donc pas la même affinité envers les milieux biologiques (chapitre IV).

Enfin, nous pourrons observer la fluorescence de cellules biologiques marquées avec la sonde CNCONHGlu, par microscopie optique en champ proche : cette étude sera présentée dans le chapitre V.

CHAPITRE III

**PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES
ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS**

III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE	69
III.2. MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE	71
III.2.1. MATERIELS.....	71
III.2.2. METHODES.....	72
<i>A/ Spectroscopie d'absorption UV-Visible.....</i>	<i>72</i>
<i>B/ Spectroscopie de fluorescence en excitation continue.....</i>	<i>72</i>
<i>C/ Spectroscopie de fluorescence en excitation pulsée : comptage monophotonique en excitation laser pulsé.....</i>	<i>74</i>
<i>i/ Appareil.....</i>	<i>74</i>
<i>ii/ Principe de la technique de comptage monophotonique.....</i>	<i>75</i>
<i>iii/ Méthode d'exploitation des déclinés de fluorescence.....</i>	<i>76</i>
<i>D/ Principe de la détermination des rendements quantiques de fluorescence.....</i>	<i>78</i>
III.3. ETUDE DES DERIVES BENZIMIDAZOLE ET THIOPHENE	79
III.3.1. DERIVE DE TYPE BENZIMIDAZOLE.....	79
III.3.2. DERIVE DE TYPE THIOPHENE.....	79
<i>A/ Description des résultats d'absorption UV-Visible.....</i>	<i>80</i>
<i>B/ Description des résultats de fluorescence en excitation continue.....</i>	<i>80</i>
III.4. ETUDE PHOTOPHYSIQUE EN EXCITATION STATIONNAIRE DES ROTORS COUMARINE	82
III.4.1. SPECTROSCOPIES UV-VISIBLE ET DE FLUORESCENCE DES DIFFERENTS ROTORS.....	83
<i>A/ Récapitulatif des résultats de spectroscopie UV-Visible.....</i>	<i>83</i>
<i>B/ Allure des spectres d'émission de fluorescence.....</i>	<i>86</i>
<i>C/ Récapitulatif des résultats de spectroscopie de fluorescence.....</i>	<i>90</i>
III.4.2. INFLUENCE DU MILIEU SUR LES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS CNCOOEt ET CNCONHGlU.....	93
<i>A/ Influence de la polarité du solvant.....</i>	<i>94</i>
<i>i/ Etude en fonction du paramètre de polarité $E_T(30)$.....</i>	<i>94</i>
<i>ii/ Etude en fonction du paramètre de Lippert et Mataga.....</i>	<i>97</i>
<i>B/ Influence de la viscosité du solvant.....</i>	<i>99</i>
<i>i/ Détermination des énergies d'activation.....</i>	<i>99</i>
<i>ii/ Mise en évidence de deux régimes de viscosité.....</i>	<i>101</i>
<i>C/ Influence de la température du milieu.....</i>	<i>102</i>

III.5. ETUDE PHOTOPHYSIQUE DYNAMIQUE DES ROTORS COUMARINE CNCOOEt, CNCONHGluc et CNCONHGlucAc	104
III.5.1. DESCRIPTION DES RESULTATS	104
III.5.2. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.....	106
<i>A/ Etude dans le glycérol</i>	106
<i>B/ Etude dans le toluène</i>	107
III.5.3. INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EMISSION	108
<i>A/ Etude dans le glycérol</i>	108
<i>B/ Etude dans le toluène</i>	109
III.5.4. CONCLUSION	110
III.6. COMPARAISON DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS GLUCIDIQUES DE TYPE COUMARINE ET DES ROTORS GLUCIDIQUES DES TYPES BENZYLIDENE ET CINNAMYLIDENE	111
III.6.1. COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES D'ABSORPTION	111
III.6.2. COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES D'EMISSION DE FLUORESCENCE	112
III.7. CONCLUSION	114
ANNEXES	117
Annexe 1	117
Annexe 2	123

III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

Tout au long de ce travail, nous nous sommes intéressés à différents traceurs fluorescents susceptibles de présenter des domaines d'absorption déplacés vers les hautes longueurs d'onde.

Pour cela, nous avons synthétisé différents composés qui présentent tous une conjugaison à travers divers hétérocycles, qui se différencient des autres composés déjà largement étudiés au GRAPP et qui présentaient une conjugaison à travers des liaisons éthyléniques.

L'étude du comportement photophysique des nouveaux rotors moléculaires a pour objectif de déterminer d'une part leurs propriétés d'absorption photonique (ce qui nous permettra de fixer le domaine de longueur d'onde d'excitation propre à chaque rotor) et d'autre part leurs propriétés d'émission de fluorescence, tant en excitation continue, qu'en excitation pulsée.

La particularité la plus étudiée des rotors moléculaires fluorescents, est leur comportement photophysique très sensible à la polarité et à la viscosité de leur environnement. En effet, leurs propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence (longueurs d'onde d'émission maximales : $\lambda_{f \text{ max}}$; rendements quantiques de fluorescence : ϕ_f) dépendent de la polarité, de la viscosité, ou de la température du milieu d'étude, et ce sont ces propriétés qui seront mises en évidence dans la suite de ce travail. Pour cela, des études ont été menées pour relier les paramètres photophysiques des nouveaux rotors moléculaires fluorescents à ces facteurs d'influence.

Notre étude sur les rotors de type benzimidazole ou thiophène n'ayant pas montré des propriétés photophysiques satisfaisantes, nous n'avons pas été au-delà de la détermination des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence. Par contre, nous mettrons en évidence l'intérêt des rotors dérivés de coumarines qui présentent l'avantage d'avoir des domaines d'excitation et d'émission déplacés vers le rouge, souvent au-delà des domaines d'absorption et d'émission intrinsèques des constituants biologiques, et cela avec un rendement quantique de fluorescence non négligeable.

Les variations de polarité ont été établies sur une large gamme de solvants : toluène, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol, glycérol et eau et leur influence a été démontrée tant sur les spectres d'absorption que sur les spectres d'émission pour tous les rotors de type coumarine synthétisés.

L'influence de la viscosité a été mise en évidence dans le glycérol pour différentes températures, et l'influence de la température a été étudiée dans l'eau et l'éthanol pour deux types de rotors uniquement, le rotor CNCOOEt et le rotor CNCONHGlu. Les déclin de fluorescence ont également fait l'objet d'une étude comparative entre les rotors CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc ; l'intérêt de cette étude étant de montrer l'influence du groupement glucidique polaire sur la structure coumarinique.

Enfin, il nous a semblé intéressant de faire une étude comparative entre les rotors dérivés des coumarines, et ceux déjà étudiés au GRAPP [Adibnejad, 1996]. Les caractéristiques photophysiques des rotors moléculaires étant en premier lieu une fonction de leur structure chimique, nous pouvons nous attendre à une différence de comportement lorsque le système conjugué de la molécule est inclus dans un hétérocycle accolé au noyau aromatique comme c'est le cas pour les dérivés coumarine, plutôt que par un système de doubles liaisons comme dans le cas des dérivés "benzylidène" et "cinnamylidène".

Ce chapitre va donc être développé de la façon suivante :

- une présentation des matériels nécessaires à l'enregistrement des spectres, tant d'absorption UV-Visible, que d'émission de fluorescence ainsi qu'une description des méthodes nécessaires à l'interprétation des résultats nous permettra d'accéder : à la détermination des longueurs d'onde maximales d'émission de fluorescence ($\lambda_{f \max}$), des rendements quantiques de fluorescence (ϕ_f) en excitation continue et à la détermination des déclin de fluorescence en excitation pulsée,
- en décrivant ensuite les caractéristiques photophysiques des dérivés des types benzimidazole et thiophène, nous expliquerons pourquoi nous ne nous sommes pas intéressés davantage à ces composés,
- puis nous passerons à une étude détaillée des caractéristiques photophysiques des rotors dérivés de coumarine en mettant en évidence l'influence de la polarité, de la viscosité ou de la température sur les propriétés des différents composés. Nous aborderons également l'étude des déclin de fluorescence de ces nouvelles sondes,
- et nous terminerons par une étude comparative des propriétés photophysiques des rotors dérivés des coumarines par rapport aux rotors des types "benzylidène" et "cinnamylidène", ce qui nous permettra de conclure quant à l'utilité des nouveaux traceurs de type coumarine.

III.2. MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

III.2.1. MATERIELS

Les solvants utilisés pour l'étude photophysique des composés sont, sauf indications complémentaires, de qualité Spectrosol :

- Acétate d'éthyle (SdS, réf. 00227)
- Acétone (SdS, réf. 00527)
- Acétonitrile (SdS, réf. 00627)
- 2-Butanol (Fluka, réf. 19440), PURISS
- Chloroforme (SdS, réf. 024 27E)
- Dichlorométhane (SdS, réf. 029 27E)
- Diéthyléther (SdS, réf. 04427)
- Ethanol absolu (SdS, réf. 013 A27)
- Glycérol (Prolabo, réf. 24 388.295), NORMAPUR
- Méthanol (SdS, réf. 09327)
- 1-Propanol (Aldrich, réf. 27, 954-4), anhydre 99,7%
- 2-Propanol (Prolabo, réf. 20 886.290)
- Tétrahydrofuranne (SdS, réf. 07027)
- Toluène (SdS, réf. 07127)

Les produits utilisés pour cette étude sont issus des synthèses décrites dans le chapitre II et sont :

- le 2-(4'-N,N diméthylaminophényl)-5-carboxybenzimidazole : dérivé benzimidazole
- le 2-(cyanoacrylate d'éthyle)-5-N,N-pipéridinothiophène : dérivé thiophène
- la 7-N,N-diéthylaminocoumarine 3-carboxylate d'éthyle : rotor COOEt
- l'acide 7-N,N-diéthylaminocoumarine-3-carboxylique : rotor COOH
- la 7-(N,N-diéthylaminocoumarine)-3-cyanoacrylate d'éthyle : rotor CNCOOEt
- l'acide 7-(N,N-diéthylaminocoumarine)-3-cyanoacrylique : rotor CNCOOH
- la 2-déoxy-2-[3-(7-N,N-diéthylaminocoumarine)-2-cyanoacryloyl]amino-D-glucose : rotor CNCONHGlu et son homologue tétra O-acétylée : CNCONHGluAc

Les mesures d'intensité de fluorescence sont des mesures relatives puisqu'elles dépendent des fonctions de l'appareil (lampe, monochromateurs, fentes, photomultiplicateur, etc.). Pour s'affranchir de ces différents paramètres, il est nécessaire d'utiliser une référence et de rapporter les valeurs des intensités de fluorescence des différents rotors à cette référence. Nous avons choisi comme référence une solution aqueuse de fluorescéine (Fluka, réf. 46960) de concentration 5.10^{-6} M ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_f = 517$ nm). Pour toutes les mesures, la largeur des fentes a été fixée à 1,5 mm, ce qui correspond à une bande passante de 5,66 nm.

Enfin, pour toutes les études de spectroscopie (UV-Visible, fluorescence) nous avons utilisé une cuve en quartz ayant un parcours optique de 1 cm.

III.2.2. METHODES

A/ Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 2. Cet appareil permet de mesurer l'absorbance ou densité optique d'une substance de concentration connue, pour les diverses longueurs d'onde d'absorption λ selon la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot C \cdot l}$

- avec
- I intensité lumineuse
 - I_0 intensité lumineuse incidente
 - ϵ coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 - C concentration ($mol \cdot L^{-1}$)
 - l trajet optique (cm)

L'absorbance (ou densité optique) DO_λ à la longueur d'onde λ correspond à $DO_\lambda = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon \cdot C \cdot l$ et est une valeur sans unité.

Le tracé des spectres peut se faire soit en absorbance, soit en transmission, et dans ce cas I/I_0 est exprimé en % et l'absorbance est égale à $-\log_{10}T$.

Connaissant la concentration d'une substance et le parcours optique de la cellule, il est possible de déterminer la valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ pour une longueur d'onde d'absorption considérée.

B/ Spectroscopie de fluorescence en excitation continue

Les spectres de fluorescence en excitation continue sont enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog-2, dont le principe est schématisé sur la figure (III.2).1, piloté et contrôlé par un ordinateur IBM PC/XT.

Le spectrofluorimètre est équipé d'une lampe Xénon (puissance 450 W) dont l'image est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation : celui-ci permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} de la lumière qui excite l'échantillon. La correction de la lampe nécessite l'utilisation d'un système de référence : une solution de rhodamine B à 0,02 M dans l'éthylène glycol.

Les monochromateurs d'excitation et d'analyse sont de type 1681 (bande passante (nm) = largeur de fente (mm) x 3,77) ; ils permettent de choisir respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse. Une fraction de la luminescence émise par l'échantillon est renvoyée vers la fente d'entrée du monochromateur d'émission (dit encore analyse). Ce dernier en transmet une étroite bande spectrale centrée sur la longueur d'onde d'émission λ_{em} .

Le système de détection est un photomultiplicateur de type Hamamatsu R928 utilisé en compteur de photons. Placé à la sortie du monochromateur, il détecte la quantité de lumière correspondant à λ_{em} et génère un signal qui, après amplification, peut être utilisé de diverses façons.

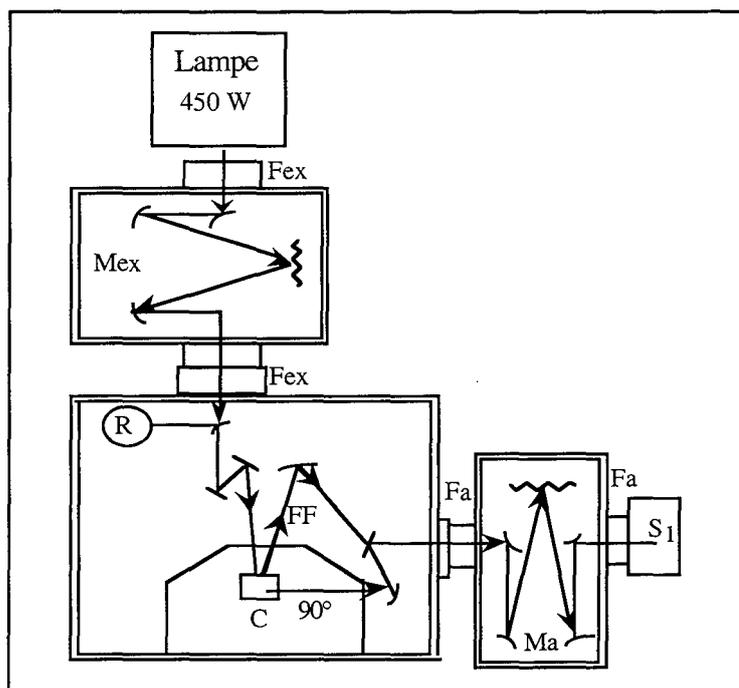


Figure (III.2).1

Schéma représentatif de la configuration du SPEX

Analyse possible selon deux modes : FF : "Front Face" et à angle droit (90°).

- | | |
|---|---------------------------------------|
| C : Compartiment cellule | Fex : Fente à l'excitation |
| Fa : Fente à l'analyse | Mex : Monochromateur à l'excitation |
| Ma : Monochromateur à l'analyse | S ₁ : Système de détection |
| R : Système de référence pour la correction de la lampe | |

La grande sensibilité de cet appareil permet des mesures de fluorescence pour de très faibles concentrations. Les mesures de fluorescence en excitation continue sont généralement réalisées à l'aide du montage classique (analyse à 90°), et les mesures quantitatives pour corrélérer l'intensité de fluorescence à la concentration du fluorophore ne peuvent se faire que pour de faibles absorbances ($\leq 0,2$) pour éviter les problèmes liés à l'effet de "peau" (réception non homogène de l'émission de fluorescence à l'entrée du monochromateur d'analyse due à une trop grande absorption de la solution).

Pour cela, on utilise dans la plupart des cas des solutions en sonde fluorescente de concentration avoisinant $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Dans le cas où l'étude nécessite des concentrations élevées en fluorophore (donc des absorbances $\geq 0,2$) un dispositif différent de l'analyse à 90° peut être utilisé, à savoir un dispositif où l'excitation et l'analyse sont frontales (dispositif "Front Face").

Cet appareil permet de réaliser soit des spectres d'excitation, soit des spectres d'émission.

Le *spectre d'excitation* affiche la variation d'intensité de l'émission mesurée à longueur d'onde fixée, pendant que la longueur d'onde d'excitation parcourt le spectre d'absorption.

Réciproquement, le *spectre d'émission* traduit la variation d'intensité de luminescence en fonction de la longueur d'onde d'observation, pour une excitation à une longueur d'onde fixe donnée. Cette longueur d'onde d'excitation correspond soit à $\lambda_{\text{absorption max}}$, soit à une longueur d'onde d'absorption moyenne définie par les exigences liées aux déterminations des rendements quantiques de fluorescence (partie D).

Enfin, le logiciel de traitement, lié à cet appareil permet de sélectionner et d'agrandir une partie du spectre et également de superposer différentes courbes, d'effectuer un traitement mathématique sur les spectres (normalisation, soustraction de différents spectres) et également de calculer l'aire sous la courbe. Par ailleurs, il permet de réaliser des enregistrements de l'émission de fluorescence en fonction du temps.

C/ Spectroscopie de fluorescence en excitation pulsée : comptage monophotonique en excitation laser pulsé

La mesure de déclin de fluorescence par comptage monophotonique repose sur l'idée que la distribution des probabilités d'émission d'un seul photon, à la suite d'une excitation, reproduit la véritable distribution de l'intensité en fonction du temps de tous les photons émis [André et al., 1990]. En échantillonnant l'émission monophotonique produite par un très grand nombre d'éclairs d'excitation, l'expérience permet de reconstruire cette distribution de probabilité.

i/ Appareil

La figure (III.2).2 représente le principe d'un appareil de comptage monophotonique, qui permet d'obtenir les déclin de fluorescence par excitation laser pulsé.

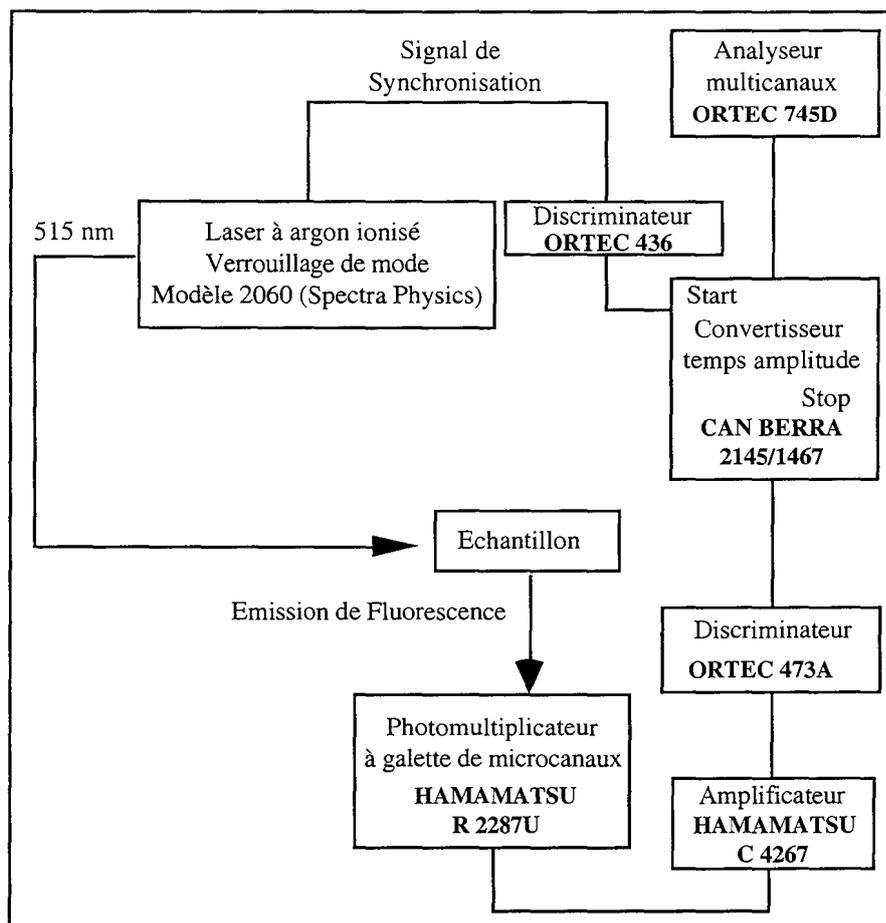


Figure (III.2).2

Appareil de comptage monophotonique,
fondé sur l'utilisation d'une excitation laser pulsé.

ii/ Principe de la technique de comptage monophotonique

Un laser à argon ionisé est utilisé comme source lumineuse et délivre un faisceau pulsé (515 nm, 82 MHz). La méthode du comptage de photon unique consiste à établir une corrélation entre une impulsion laser et un photon de fluorescence recueilli sur une galette de microcanaux. Le traitement de signal nécessite un appareillage électronique de haute qualité ; néanmoins la fonction de réponse de l'appareillage impose l'utilisation d'un programme de déconvolution pour obtenir le déclin réel de fluorescence (par exemple, l'impulsion du laser à argon dont la largeur à mi-hauteur est d'environ 150 picosecondes se transforme après passage dans la chaîne électronique, en une impulsion de durée environ égale à 400 picosecondes). La stabilité de cette méthode est un facteur limitant, les durées de vie inférieures à 100 picosecondes ne sont pas mesurables avec une bonne précision. Une source électronique de référence ("trigger") génère un signal électrique à un instant exactement corrélé à l'instant d'émission d'un éclair optique. Le signal est dirigé sur l'entrée <START> d'un convertisseur temps - amplitude, qui commence alors à charger un condensateur. Dans le même temps, l'éclair optique excite l'échantillon et produit donc des photons de fluorescence.

Dans les conditions où un seul photon est enregistré, après chaque excitation sur une galette de microcanaux (deux étages d'amplification), on dirige le signal électrique ainsi produit (et amplifié) sur l'entrée <STOP> du convertisseur. Ceci a pour effet de stopper la charge du condensateur. L'impulsion émise par le convertisseur a une hauteur proportionnelle au temps écoulé entre les signaux <START> et <STOP>. Cet "événement" est alors stocké dans un analyseur multicanaux à l'adresse correspondant à la hauteur de l'impulsion du convertisseur. Cette expérience, répétée un grand nombre de fois, permet de reconstituer l'histogramme recherché. Cette représentation du déclin est discrétisée, le nombre de "coups" dans chaque canal correspondant à un domaine temporel de largeur finie.

Le photomultiplicateur utilisé est une galette Hamamatsu R22870 (amplificateur Hamamatsu modèle C4267)).

Le signal obtenu doit être déconvolué, ce qui nécessite d'enregistrer la fonction de réponse de l'appareillage. Celle-ci est obtenue en remplaçant l'échantillon fluorescent par un simple diffuseur de lumière. L'étalonnage en temps se fait en mesurant un train d'impulsion laser (82 MHz).

iii/ Méthode d'exploitation des déclins de fluorescence

Les courbes de déclin de fluorescence de molécules de courtes durées de vie, électroniquement excitées par des impulsions lumineuses, sont déformées par la réponse temporelle de l'appareillage électronique et la durée naturelle de l'éclair. Ainsi, on observe la convolution de cette dernière, appelée éclair (ou "flash"), et du déclin de fluorescence de l'espèce en solution.

C'est la relation de convolution suivante qui représente l'évolution temporelle du système réactif :

$$f_{\text{exp}}(t) = \text{Ec}(t) \otimes f_{\text{th}}(t) = \int_0^t \text{Ec}(t - \tau) f_{\text{th}}(\tau) d\tau$$

avec :

- $f_{\text{exp}}(t)$: courbe du déclin observé,
- $\text{Ec}(t)$: fonction de l'appareil ("flash") et réponse de l'électronique,
- $f_{\text{th}}(t)$: réponse du système fluorescent,
- t : temps,
- τ : durée de vie de la molécule fluorescente.

En effectuant une transformation de Fourier (TF) de l'équation ci-dessus, on obtient :

$$\text{TF}(f_{\text{exp}}(t)) = \text{TF}(\text{Ec}(t)) \text{TF}(f_{\text{th}}(t))$$

d'où $\text{TF}(f_{\text{th}}(t))$, et par transformée inverse, l'expression de $f_{\text{th}}(t)$. Mais pour effectuer un tel calcul, il faudrait connaître, à tout temps t , les fonctions $\text{Ec}(t)$ et $f_{\text{exp}}(t)$.

Or expérimentalement la valeur obtenue dans un canal est en fait la valeur intégrée sur l'ensemble de ce canal. De plus des erreurs de troncature apparaissent, du fait que l'enregistrement est non périodique et limité dans le temps. L'exploitation de cette technique, mathématiquement rigoureuse, sur des données expérimentales s'avère ainsi très délicate.

Une autre technique plus sûre est celle de la reconvolution qui prend en compte la nature discrétisée des signaux. Dans cette technique, on considère une fonction hypothétique $f_{th}(t)$ sous une forme analytique choisie *a priori* et possédant plusieurs paramètres. On calcule alors le produit de convolution précédent pour une valeur de départ des paramètres, que l'on compare au signal observé. On ajuste ensuite progressivement les paramètres par une méthode d'optimisation comme nous allons le décrire dans le cas d'un signal de type monoexponentiel.

La fonction $f_{th}(t)$ choisie est alors de la forme :

$$f_{th}(t) = c_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

avec :

- c_1 : coefficient préexponentiel,

L'optimisation se fait par la recherche de τ par la méthode du nombre d'or alors que c_1 est calculé analytiquement. La fonction optimisée est le χ^2 , prenant une valeur voisine de 1 quand l'optimum est atteint et qui est définie de la façon suivante :

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \left[\frac{C_1 * U_1(i) - H(i)}{\sigma(i)} \right]^2}{N_p}$$

avec :

- $U_1(i)$: valeur de la fluorescence calculée par convolution pour le canal i ,
- $H(i)$: valeur de la fluorescence expérimentale au canal i ,
- N_p : nombre de canaux,
- σ_i^2 : déviation standard, égale à 1 si $H(i) = 0$ et à $H(i)$ pour les autres valeurs.

C_1 est calculé en résolvant l'équation : $\frac{d\chi^2}{dt} = 0$

Pour tenir compte de la discrétisation du signal, différentes méthodes numériques sont décrites [Bouchy, 1982].

Dans le cas d'un signal de type biexponentiel, le principe de la méthode est le même et conduit à la détermination des paramètres τ_1 , τ_2 , C_1 , C_2 de la fonction :

$$f_{th}(t) = C_1 \exp(-t/\tau_1) + C_2 \exp(-t/\tau_2)$$

D/ Principe de détermination des rendements quantiques de fluorescence

Le rendement quantique d'émission de fluorescence Φ_f est le rapport du nombre de photons émis par unité de temps, au nombre de photons absorbés durant le même temps. Cela se traduit par la relation suivante :

$$\Phi_f = \frac{\text{Nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{Nombre de photons absorbés}}$$

Le principe de détermination du rendement quantique de fluorescence peut se décrire comme suit :

Composé	DO à $\lambda_{excitation}$	Aire sous la courbe	Indice de réfraction
X	DO _X	Aire _X	n _X
Référence	DO _{Référence}	Aire _{Référence}	n _{Référence}

- les deux composés, composé X à analyser ($\Phi_{f,X}$ à déterminer) et le composé de référence ($\Phi_{f,référence}$) sont excités à la même longueur d'onde (pour éviter les corrections relatives aux éléments de l'excitation : lampe, monochromateur d'excitation, etc.) pour des valeurs d'absorbance $\leq 0,2$ (pour être dans des conditions de non saturation en relation avec l'effet de peau),
- les spectres d'émission de l'échantillon et du témoin sont enregistrés, corrigés par rapport à une solution aqueuse de fluorescéine de concentration 5.10^{-6} M, et les aires sous la courbe sont analysées (calcul effectué par le logiciel d'exploitation),
- les valeurs d'absorbance du composé (DO_X) et de la référence (DO_{Référence}) sont lues sur les spectres d'absorption UV-Visible, à la longueur d'onde d'excitation choisie,
- enfin, les solutions à analyser étant prises dans différents solvants, une correction sur les valeurs des indices de réfraction du solvant considéré par rapport à celui du témoin, est effectuée.

La détermination de $\Phi_{f,X}$ repose finalement sur le calcul suivant :

$$\Phi_{f,X} = \Phi_{f,Référence} \left(\frac{\text{Aire}_X}{\text{Aire}_{Référence}} \right) \left(\frac{\text{DO}_{Référence}}{\text{DO}_X} \right) \left(\frac{n_X}{n_{Référence}} \right)^2$$

III.3. ETUDE DES DERIVES BENZIMIDAZOLE ET THIOPHENE

III.3.1. DERIVE DE TYPE BENZIMIDAZOLE

Le premier composé auquel nous nous sommes intéressés, est un dérivé benzimidazole, dont la structure est représentée sur la figure (III.3).1.

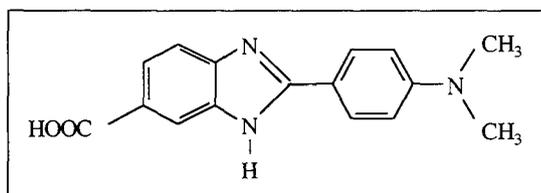


Figure (III.3).1

Structure du rotor de type benzimidazole.

Ne sachant pas dans quelle gamme de longueur d'onde ce composé absorbait, nous avons simplement réalisé un spectre d'absorption et un spectre d'émission de fluorescence dans l'acétate d'éthyle.

Nous avons trouvé, comme longueur d'onde d'absorption photonique, 328 nm. En fixant le domaine de longueur d'onde d'excitation à cette valeur, nous avons recueilli le signal d'émission de fluorescence dont le maximum était situé à 398 nm.

Les données de photophysique de cette sonde étant en dehors de notre objectif nous n'avons pas poursuivi notre étude vers des dérivés de type benzimidazole.

III.3.2. DERIVE DE TYPE THIOPHENE

Nous nous sommes ensuite intéressés à des dérivés de type thiophène. Ces composés, très utilisés pour des études en optique non linéaire, ont montré une longueur d'onde d'absorption augmentée de 50 nm lorsque l'on remplace le cycle aromatique dans des composés de type benzène par un cycle thiophène [Jen, 1993]. Partant de cette hypothèse, nous avons synthétisé un composé thiophène portant une double liaison en position-2 et un groupement pipéridino en position-5 (figure (III.3).2).

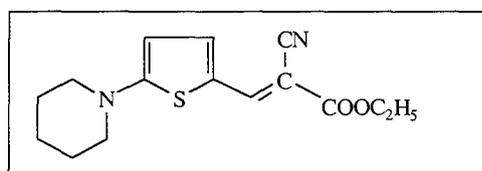


Figure (III.3).2

Rotor de type thiophène.

A/ Description des résultats de spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible du dérivé thiophène ont été étudiés dans des solvants de polarité (paramètre $E_T(30)$, voir la définition dans le § III.4.2 A i) et de viscosité croissantes et à des concentrations de l'ordre de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Solvant	λ_a max	ϵ
Toluène	454	36 400
Acétate d'éthyle	453	44 200
Ethanol	461	53 800
Méthanol	462	57 800
Glycérol	473	102 000
Eau	471	32 200

Tableau (III.3).1

Caractéristiques d'absorption UV-Visible
du rotor moléculaire de type "thiophène", à 25°C dans différents solvants
(λ_a max en nm ; ϵ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Les résultats en absorption UV-Visible (tableau (III.3).1) permettent de mettre en évidence le déplacement bathochrome des longueurs d'onde d'absorption lié à l'augmentation de polarité du solvant. On peut noter un écart de l'ordre de 20 nm entre les différentes longueurs d'onde lorsque l'on passe d'un solvant apolaire, tel que le toluène, à un solvant très polaire.

On peut également mettre en évidence une augmentation du coefficient d'extinction molaire au fur et à mesure que la polarité du solvant augmente traduisant une interaction lumière-matière de plus en plus importante, sauf pour l'eau.

L'eau est un solvant à part qui met en jeu des interactions fortes entre la molécule et le milieu environnant. Ce solvant joue un double rôle sur le spectre d'absorption de la molécule : il peut avoir des effets :

- d'interaction universelle (effet de la constante diélectrique du solvant),
- d'interaction par liaisons hydrogène.

Ces effets, déjà présents dans la plupart des solvants, sont accentués dans le cas de l'eau et modifient notablement le spectre d'absorption.

B/ Description des résultats de fluorescence en excitation continue

De même que le composé étudié présentait un déplacement bathochrome de son spectre d'absorption UV-Visible lorsque la polarité du solvant augmente, son spectre d'émission de fluorescence est modifié avec la polarité du solvant (tableau (III.3).2).

Avec le même choix de solvants, les spectres d'émission de fluorescence en excitation continue du dérivé thiophène ont été enregistrés pour des absorbances inférieures à 0,2.

Solvant	λ_f max (nm)	Φ_f
Toluène	482	0,048
Acétate d'éthyle	482	0,124
Ethanol	486	0,257
Méthanol	488	0,248
Glycérol	493	0,447
Eau	489	0,042

Tableau (III.3).2

Caractéristiques d'émission de fluorescence du rotor moléculaire de type "thiophène", à 25°C dans différents solvants classés par ordre de polarité croissante.

La valeur du rendement quantique de fluorescence dans le glycérol, à 25°C pour le rotor (2)-COOEt* (figure (III.3).3), $\Phi_f = 0,22$ [Bentikouk, 1990], a servi de valeur de référence pour la détermination des rendements quantiques de fluorescence du rotor étudié.

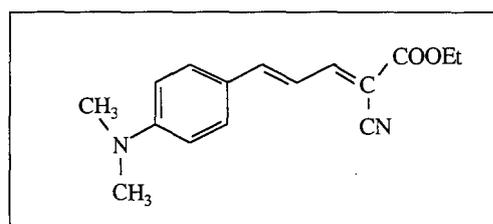


Figure (III.3).3

Structure du rotor (2)-COOEt.

Les maxima d'émission de fluorescence obtenus, dans les différents solvants, présentent un faible écart. Si l'on compare les maxima de fluorescence obtenus dans le toluène et le glycérol, considérés comme les deux extrêmes dans notre gamme de polarité, on note une différence de seulement 10 nm. Le comportement photophysique de ce composé semble donc faiblement influencé par la nature du milieu environnant. Pourtant, sa structure chimique est telle, que le moindre empêchement à sa libre rotation devrait conduire à des changements structuraux importants de la molécule, et donc de ses caractéristiques d'émission de fluorescence.

A ce stade de notre étude, nous avons dû nous intéresser à un autre type de composé. En effet, le dérivé benzimidazole présente une longueur d'onde d'absorption trop faible pour atteindre notre objectif, et les dérivés thiophène, bien qu'ayant une longueur d'onde d'absorption moyenne proche de celle désirée ont d'une part des propriétés photophysiques peu sensibles aux modifications de leur environnement en terme de polarité, et d'autre part requièrent une synthèse difficile à mettre en œuvre, de sorte que l'on ne peut envisager d'augmenter encore la longueur de la conjugaison et donc la valeur de sa longueur d'onde d'absorption.

* Nomenclature utilisée dans la thèse de Adibnejad, 1996.

III.4. ETUDE PHOTOPHYSIQUE EN EXCITATION STATIONNAIRE DES ROTORS COUMARINE

Les dérivés aminocoumarine apparaissent comme étant des sondes fluorescentes ayant des propriétés photophysiques très intéressantes. En particulier, les coumarines ayant un groupement dialkylamino en position-7, et un substituant attracteur d'électrons en position-3 présentent des caractéristiques d'absorption et d'émission de fluorescence fortement dépendantes des propriétés du solvant d'étude [Bangar Raju, 1994]. De plus, le rendement quantique de fluorescence ainsi que la durée de vie de ces composés s'avèrent être également influencés par le milieu environnant [Jones II, 1980]. Ainsi, dans notre recherche pour trouver de nouveaux rotors moléculaires fluorescents, nous avons envisagé de faire varier la longueur de chaîne du substituant en position-3 dans la classe des 7-diéthylaminocoumarines.

Les nouveaux rotors moléculaires dont l'étude photophysique est développée dans ce chapitre, ont pour formules générales les structures représentées sur la figure (III.4).1 pour les rotors dénommés COOEt et COOH et sur la figure (III.4).2 pour les rotors dénommés CNCOOEt, CNCOOH, CNCONHGlu et CNCONHGluAc. Nous avons voulu comparer les deux composés glucidiques : l'un sous sa forme hydroxylée, l'autre sous sa forme acétylée, car ces deux traceurs, bien qu'ayant des structures identiques, diffèrent par leur balance hydrophile-hydrophobe.

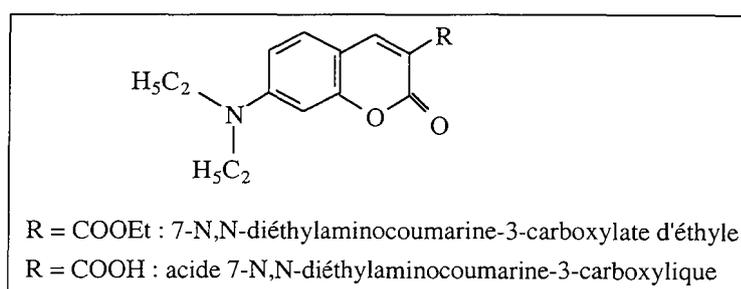


Figure (III.4).1

Structure des rotors moléculaires
COOEt (R = COOEt) et COOH (R = COOH)

Dans notre notation, le CN indique la présence d'un groupement cyano et donc d'une double liaison en position-3 sur le groupement coumarine.

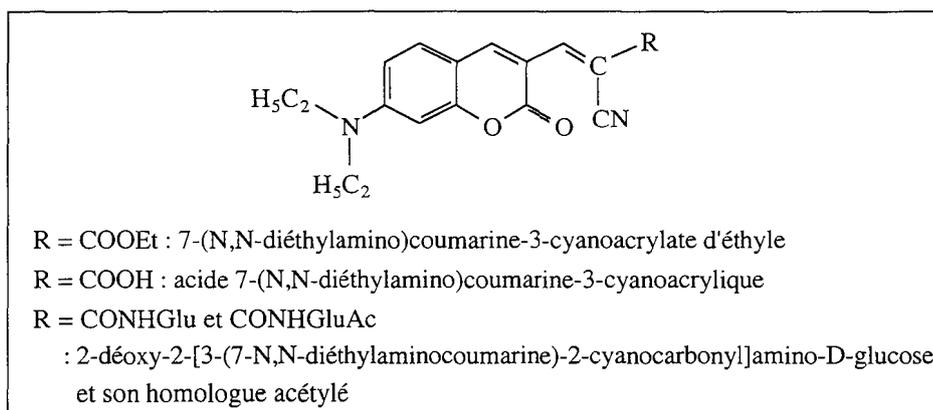


Figure (III.4).2

Structure des rotors moléculaires

CNCOOEt (R = COOEt) ; CNCOOH (R = COOH),
 CNCONHGlu (R = CONHGlu) ; CNCONHGluAc (R = CONHGluAc)

Nous avons donc commencé par étudier les composés COOEt et COOH pour connaître leurs propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence selon le milieu d'étude (changement de polarité ou de viscosité).

Les résultats nous ont encouragés à poursuivre dans cette direction, et à nous intéresser aux composés CNCOOEt, CNCOOH, CNCONHGlu et CNCONHGluAc qui possèdent une conjugaison plus importante et donc des longueurs d'onde d'absorption déplacées vers le rouge. Afin de comparer tous les résultats et de discuter en terme d'influence du groupement électroaccepteur, nous présenterons simultanément les valeurs concernant les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence des différents composés.

III.4.1. SPECTROSCOPIES UV-VISIBLE ET DE FLUORESCENCE DES DIFFERENTS ROTORS

A/ Récapitulatif des résultats de spectroscopie UV-Visible

Les propriétés d'absorption UV-Visible des six rotors ont été étudiées dans des solvants qui possèdent tous des caractéristiques différentes en termes de polarité et de viscosité.

De façon générale, tous les composés possèdent une double bande d'absorption dont les maxima se situent au-delà de 400 nm et en dessous de 350 nm.

A titre d'exemple la figure (III.4).3a montre l'allure générale d'un spectre d'absorption sur lequel on peut distinguer :

- une bande d'absorption à 505 nm correspondant à l'absorption du composé pour passer de l'état fondamental au niveau S_1 ,
- une bande d'absorption à 320 nm correspondant à l'absorption du composé pour passer de l'état fondamental au niveau S_2 ,
- et une particularité sur ce spectre, autour de 410 nm qui correspond en fait à une impureté du composé. Cette particularité se voit uniquement avec le composé glucidique CNCONHGlu, et ce dans tous les solvants.

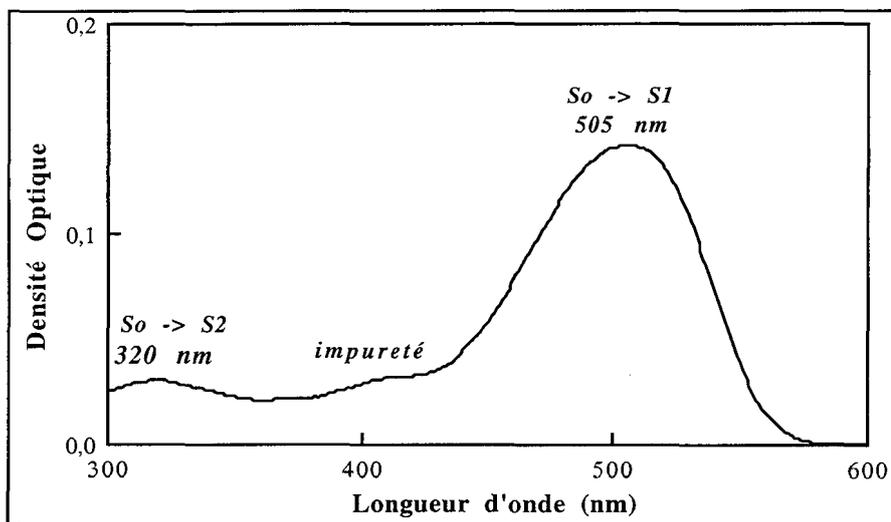


Figure (III.4).3a

Spectre d'absorption du composé CNCONHGlu en solution dans le glycérol.

La figure (III.4).3b quant à elle présente les spectres d'absorption (1) et d'excitation (2) du composé CNCONHGlu dans le glycérol.

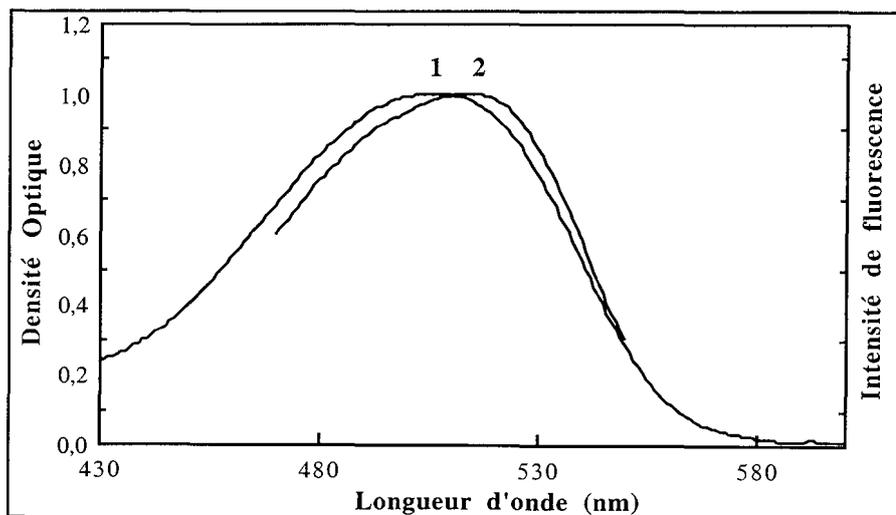


Figure (III.4).3b

Spectre d'absorption (1) et d'excitation (2) [$\lambda_{em} = 568$ nm]
du composé CNCONHGlu en solution dans le glycérol.

Par la suite, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux bandes d'absorption de plus faible énergie dont le maximum se situe dans la zone bleu-verte du spectre visible : les caractéristiques d'absorption UV-Visible sont regroupées dans le tableau (III.4).1.

Les différents solvants sont classés par ordre de polarité croissante pour mettre en évidence le déplacement bathochrome des longueurs d'onde d'absorption avec l'augmentation de polarité.

On remarque, en règle générale, que les rotors absorbent à des longueurs d'onde quasi-similaires pour les couples de solvants suivants :

- toluène et acétate d'éthyle,
- éthanol et méthanol.

Si l'on corrèle les valeurs d'absorption UV-Visible aux paramètres de polarité $E_T(30)$ de chaque solvant [Reichardt, 1979], on retrouve des valeurs voisines pour chacun de ces couples. Cela peut expliquer que la longueur d'onde d'absorption varie peu pour deux solvants dont les paramètres de polarité sont proches.

	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	MeOH	Glycérol	Eau
	$E_T(30)$	33,9	38,1	51,9	55,4	57	63,1
Rotor COOEt	$\lambda_{a \text{ max}}$	409	407	420	417	427	428
	ϵ	45 640	40 860	44 180	37 980	30 660	22 300
COOH	$\lambda_{a \text{ max}}$	424	424	396	400	414	410
	ϵ	31 120	43 140	25 380	29 620	25 900	30 460
CNCOOEt	$\lambda_{a \text{ max}}$	499	498	505	503	521	510
	ϵ	47 460	47 020	30 940	13 640	28 340	13 640
CNCOOH	$\lambda_{a \text{ max}}$	500	443	454	460	487	478
	ϵ	24 600	30 920	38 660	32 500	35 300	42 300
CNCONHGlu	$\lambda_{a \text{ max}}$	476	468	476	474	506	494
	ϵ	12 900	22 960	22 320	26 160	23 420	27 440
CNCONHGluAc	$\lambda_{a \text{ max}}$	478	489	496	500	514	511
	ϵ	34 280	35 580	38 280	38 080	44 220	37 040

Tableau (III.4).1

Caractéristiques d'absorption UV-Visible des rotors
pour des concentrations en composé de $5 \cdot 10^{-6}$ M
($\lambda_{a \text{ max}}$ en nm ; ϵ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; $E_T(30)$ en $kcal \cdot mol^{-1}$ à $25^\circ C$).

Dans le cas des rotors acides, COOH et CNCOOH on constate une diminution des longueurs d'onde d'absorption lorsque la polarité augmente, alors que nous nous attendions à observer un déplacement des longueurs d'onde vers le rouge. L'explication la plus probable, réside dans la possibilité d'un échange d'hydrogène entre le groupement acide et l'amino du groupement diéthylamino, conduisant à un ion ammonium de telle sorte que la molécule ne joue plus sa fonction de rotor et donc que l'influence du solvant n'intervient plus.

Qu'en est-il de la différence de comportement des différents rotors ?

Lorsque l'on augmente la conjugaison par ajout d'une double liaison (passage du rotor COOEt au rotor CNCOOEt), on note une évolution de 90 nm dans les longueurs d'onde d'absorption, et ce quel que soit le solvant. De plus, on peut noter qu'il y a une chute des longueurs d'onde d'absorption lorsque l'on passe du dérivé ester à son homologue acide, probablement pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le paragraphe précédent.

En ce qui concerne le rotor glucidique, on observe une légère diminution de ses longueurs d'onde d'absorption par rapport au dérivé ester mais les résultats sont tout à fait en accord avec ceux attendus : le nouveau rotor glucidique absorbe dans la région bleu-vert du spectre visible, à une longueur d'onde permettant de travailler avec des systèmes biologiques, en dehors des longueurs d'onde d'absorption des composants intrinsèques des cellules susceptibles de fournir une autofluorescence.

B/ Allure des spectres d'émission de fluorescence

En conservant les mêmes solvants que pour l'étude en spectroscopie UV-Visible, nous avons effectué les spectres d'émission de fluorescence en excitation continue des différents rotors coumarines. Les spectres d'émission des différents solvants purs ont été soustraits des spectres obtenus pour les différentes coumarines.

Les rendements quantiques de fluorescence des rotors dérivés de coumarine ont été calculés en utilisant comme références :

- une solution aqueuse de fluorescéine (pH 10 à 25°C) de rendement quantique de fluorescence $\Phi_f = 0,81$ dans les mêmes conditions [Viriot, 1989], dans le cas des rotors CNCOOEt, CNCOOH, CNCONHGlu et CNCONHGluAc,
- une solution de 4-(N,N-diméthylamino)benzylidène malonitrile dans le glycérol à 25°C de rendement quantique de fluorescence $\Phi_f = 0,021$ dans les mêmes conditions [Loutfy, 1982], dans le cas des rotors COOEt et COOH.

Comme nous l'avons signalé dans les résultats de spectroscopie UV-Visible, les différents composés présentent deux bandes d'absorption : l'une au-delà de 400 nm et l'autre en deçà de 350 nm. Les spectres d'émission de fluorescence à ces deux longueurs d'onde sont tout à fait superposables comme on peut le voir dans le cas du rotor CNCONHGlu dans le glycérol (figure (III.4).4), à l'exception de leurs largeurs de bande qui diffèrent.

Le spectre qui présente une bande de fluorescence plus large correspond à l'émission du premier état singulet excité S_1 .

La bande étroite pourrait être attribuée au fait que la transition $S_2 \rightarrow S_1$ positionne la molécule non plus sur un niveau électronique mais plutôt sur un niveau vibrationnel intermédiaire et le retour à l'état fondamental conduit à un spectre de fluorescence plus étroit.

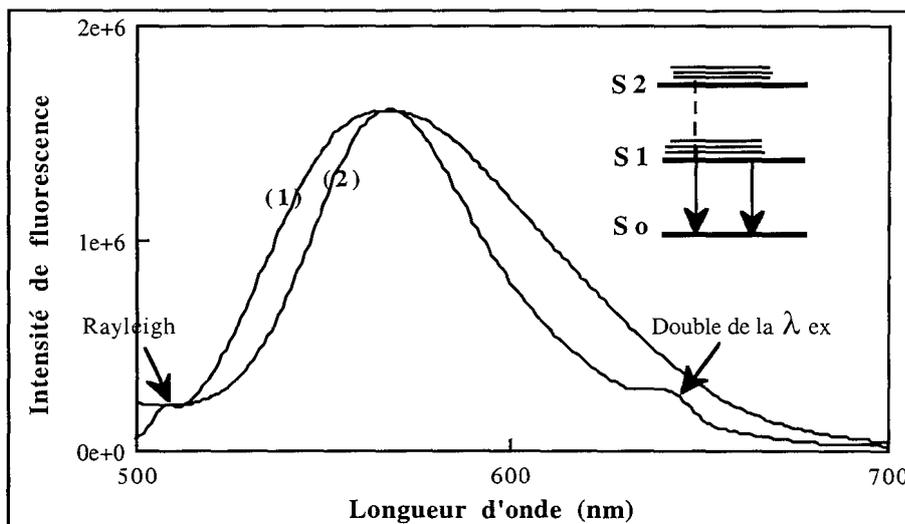


Figure (III.4).4

Spectres d'émission de fluorescence du rotor CNCONHGlu dans le glycérol à deux longueurs d'onde d'excitation : $\lambda_{ex 1} = 506 \text{ nm}$ et $\lambda_{ex 2} = 320 \text{ nm}$.

On constate également un déplacement du maximum de fluorescence vers les hautes longueurs d'onde lorsque la polarité du solvant augmente.

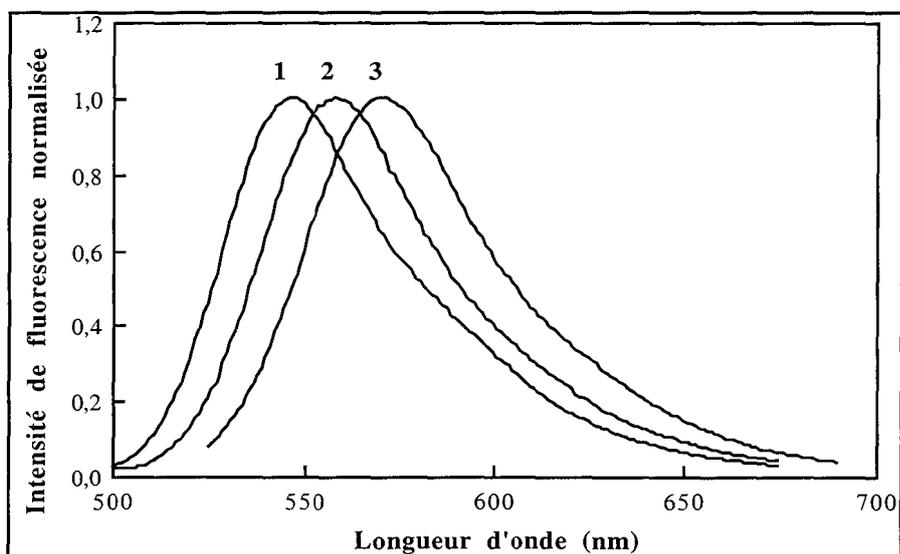


Figure (III.4).5a

Spectres d'émission de fluorescence (intensités normalisées)

du rotor CNCONHGlu à 25°C dans différents solvants :

acétate d'éthyle (1) [$\lambda_{ex 1} = 468 \text{ nm}$], éthanol (2) [$\lambda_{ex 2} = 476 \text{ nm}$] et glycérol (3) [$\lambda_{ex 3} = 506 \text{ nm}$].

La figure (III.4).5a présente les spectres d'émission de fluorescence du rotor CNCONHGlu dans des solvants de polarité différente : l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le glycérol. Ce déplacement vers le rouge des longueurs d'onde d'émission a été interprété, pour bon nombre de dérivés aminocoumarine, en terme de polarité-polarisabilité, liaisons hydrogène et paramètres de cohésion [Coosemans, 1979].

La figure (III.4).5b présente les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence du rotor CNCONHGlu en solution dans l'acétate d'éthyle.

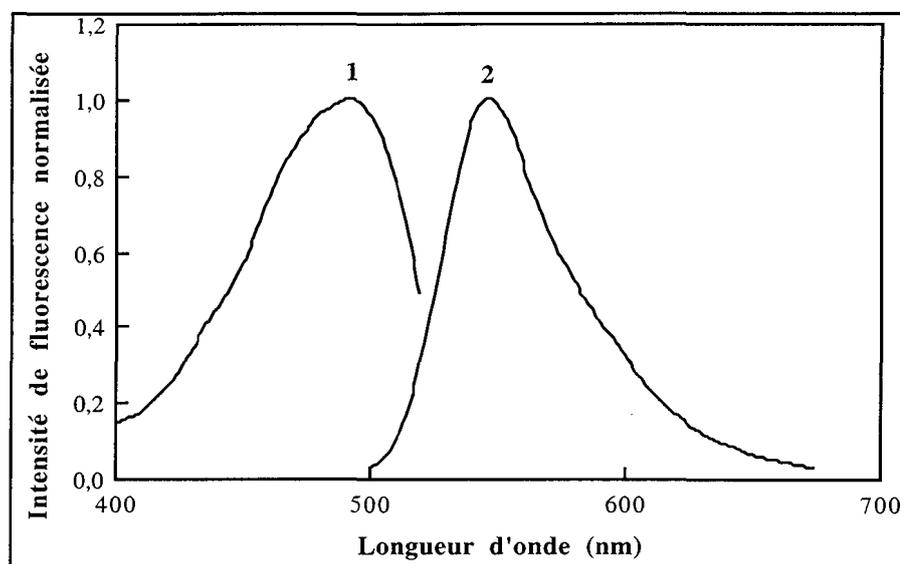


Figure (III.4).5b

Spectres d'excitation (1) [$\lambda_{em\ 1} = 546\text{ nm}$] et
d'émission de fluorescence (2) [$\lambda_{ex\ 2} = 468\text{ nm}$]
du rotor CNCONHGlu à 25°C en solution dans l'acétate d'éthyle.

On retrouve bien sur la figure (III.4).5b, une relation de type symétrie par réflexion dans un miroir des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. On note dans ce cas de figure un déplacement de Stokes de 55 nm.

Enfin, pour chaque rotor, quel que soit le solvant d'étude, les spectres présentent une seule bande d'émission de fluorescence à la longueur d'onde d'absorption qui nous a intéressée. La figure (III.4).6 présente les spectres des différentes coumarines synthétisées dans le glycérol.

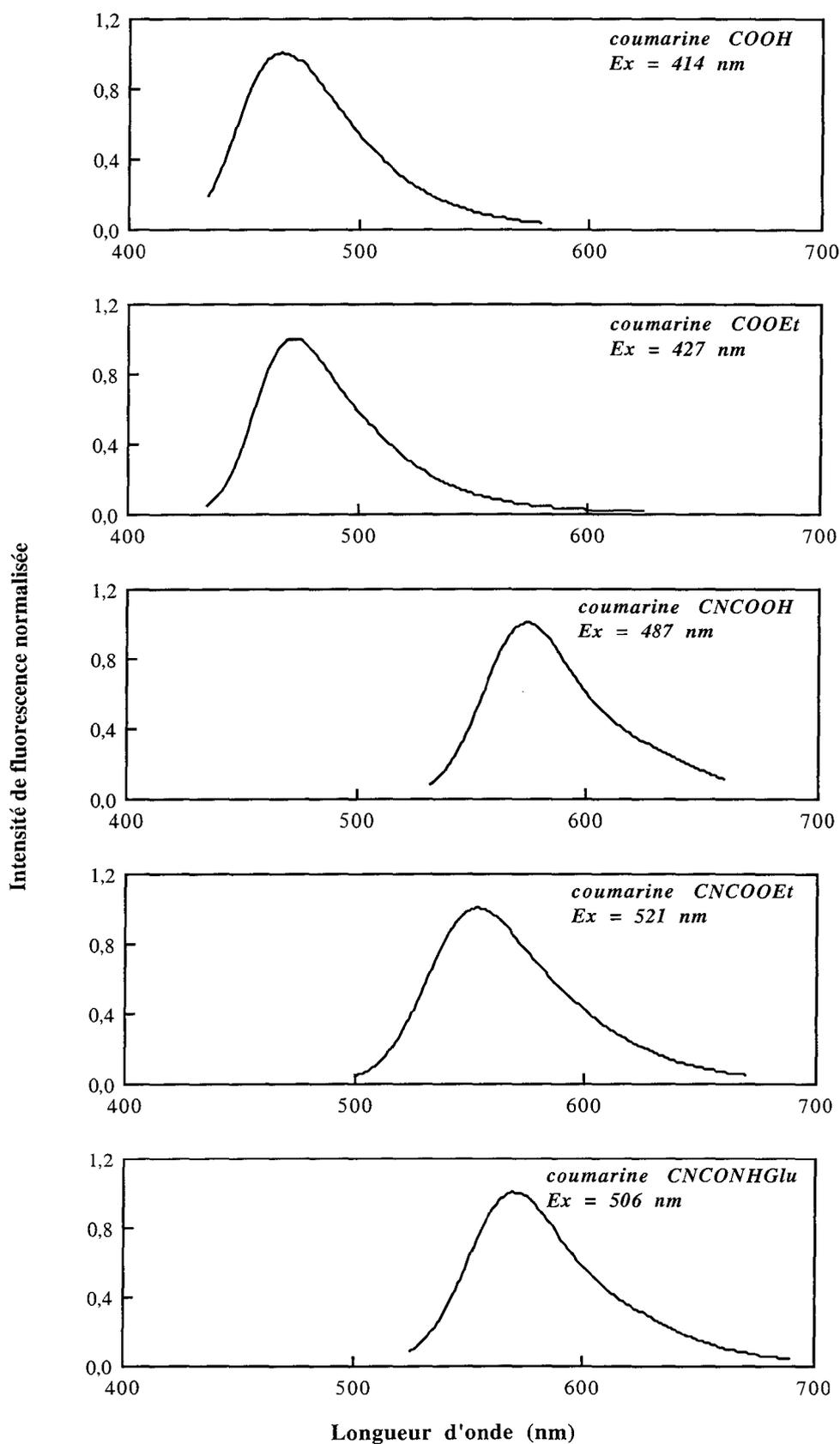


Figure (III.4).6

Spectres d'émission de fluorescence des différents rotors dans le glycérol.

C/ Récapitulatif des résultats de spectroscopie de fluorescence

Dans cette partie, nous présentons les caractéristiques photophysiques de tous les nouveaux rotors (tableau (III.4).2) en nous limitant aux maxima de fluorescence $\lambda_{f \max}$ et aux valeurs de rendements quantiques de fluorescence ϕ_f correspondant aux maxima d'absorption de la région bleu-verte du spectre visible.

Rotor	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	MeOH	Glycérol	Eau
	$E_T(30)$	33,9	38,1	51,9	55,4	57	63,1
COOEt*	$\lambda_{f \max}$	437	448	462	467	473	477
	ϕ_f	0,823	0,651	0,1	0,04	0,461	0,013
COOH*	$\lambda_{f \max}$	448	461	449	455	467	474
	ϕ_f	0,814	0,159	0,409	0,32	0,561	0,022
CNCOOEt**	$\lambda_{f \max}$	531	548	562	564	574	563
	ϕ_f	0,03	0,075	0,171	0,189	0,846	0,007
CNCOOH**	$\lambda_{f \max}$	533	534	528	541	554	555
	ϕ_f	0,009	0,032	0,083	0,068	0,678	0,042
CNCONHGlu**	$\lambda_{f \max}$	536	546	558	562	568	573
	ϕ_f	0,031	0,167	0,129	0,157	0,749	0,063
CNCONHGluAc**	$\lambda_{f \max}$	534	542	559	560	569	574
	ϕ_f	0,298	0,472	0,05	0,07	0,943	0,04

* Référence : solution de 4-(N,N-diméthylamino)benzylidène malonitrile dans le glycérol, 25°C, $\phi_f = 0,021$

** Référence : solution aqueuse de fluorescéine, 25°C, pH 10, $\phi_f = 0,81$

Tableau (III.4).2

Caractéristiques d'émission de fluorescence des rotors moléculaires
dérivés de coumarine à 25°C dans différents solvants
($\lambda_{f \max}$ en nm, $E_T(30)$ en kcal.mol⁻¹ à 25°C).

L'existence d'une transition LE (état localement excité) vers un état TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer) [Grabowski, 1983] est largement discutée dans la littérature pour expliquer les variations des rendements quantiques de fluorescence des 7-aminocoumarines en fonction du solvant. Dans ce modèle, deux états excités à transfert de charge sont possibles : un état LE plan ICT (transfert de charge intramoléculaire) et un état "twisté" TICT dont la désexcitation est essentiellement non radiative (figure (III.4).7). La barrière d'énergie d'activation entre l'état plan fluorescent et l'état "twisté" diminue lorsque la polarité du solvant augmente.

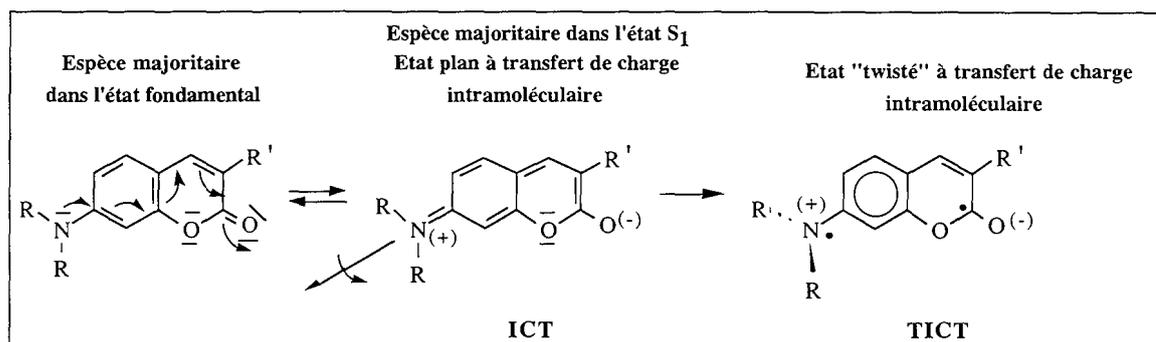


Figure (III.4).7

Formation d'un éventuel état twisté à transfert de charge intramoléculaire TICT.

Expérimentalement on observe, sauf dans le cas du glycérol où la rotation de la molécule est empêchée, une diminution des rendements quantiques ainsi qu'un déplacement des spectres de fluorescence vers de plus grandes longueurs d'onde lorsque la polarité du solvant augmente.

L'analyse du [tableau \(III.4\).2](#) permet de constater que dans un environnement de très forte polarité, tel que l'eau, les différents dérivés aminocoumarine présentent un rendement quantique de fluorescence très réduit. Cette réponse, en terme de rendement quantique de fluorescence, dans les solvants polaires, est fonction des substituants de la coumarine.

Ceci peut être attribué à la désactivation non radiative de ces composés suite à la formation d'un état hautement polaire TICT depuis l'état excité singulet S₁. Cet état étant souvent la cause d'un "quenching" intramoléculaire, il est important de contrôler la formation de cet état :

- soit en réduisant la force du groupement amino donneur,
- soit en réduisant la force du substituant attracteur,

de façon à ce que l'énergie de l'état TICT soit supérieure à l'énergie de l'état ICT, pour limiter la population de l'état TICT.

Parallèlement, on constate une très forte influence du glycérol, tant sur le déplacement bathochromique de l'émission de fluorescence à son maximum que sur le rendement quantique de fluorescence. Dans ce cas, la stabilisation de l'état excité ne se traduit plus par une forte réduction du rendement quantique de fluorescence comme dans le cas des solvants polaires, mais non visqueux. Cela s'explique par le fait que la viscosité du solvant empêche la formation de l'état twisté, c'est-à-dire le déclin de l'état ICT vers l'état TICT.

Par comparaison des [tableaux \(III.4\).1](#) et [\(III.4\).2](#), on constate que les spectres d'émission de fluorescence sont plus sensibles aux changements de polarité que les spectres d'absorption. Ainsi, on augmente le maximum d'émission de 30 nm lorsque l'on passe du toluène à l'eau.

Il nous a semblé intéressant de regrouper, pour chaque rotor et chaque solvant étudié, le déplacement de Stokes $\Delta\bar{\nu}$ (tableau (III.4).3) défini comme la différence entre les énergies des maxima d'absorption et de fluorescence.

Rotor	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	MeOH	Glycérol	Eau
COOEt	$\lambda_{f \text{ max}}$	437	448	462	467	473	477
	$\lambda_{a \text{ max}}$	409	407	420	417	427	428
	$\Delta\bar{\nu}$	1566	2248	2164	2567	2277	2400
COOH	$\lambda_{f \text{ max}}$	448	461	449	455	467	474
	$\lambda_{a \text{ max}}$	424	424	396	400	414	410
	$\Delta\bar{\nu}$	1263	1892	2980	3022	2741	3293
CNCOOEt	$\lambda_{f \text{ max}}$	531	548	562	564	574	563
	$\lambda_{a \text{ max}}$	499	498	505	503	521	510
	$\Delta\bar{\nu}$	1207	1832	2008	2150	1772	1845
CNCOOH	$\lambda_{f \text{ max}}$	533	534	528	541	554	555
	$\lambda_{a \text{ max}}$	500	443	454	460	487	478
	$\Delta\bar{\nu}$	1238	3846	3087	2975	2483	2902
CNCONHGlu	$\lambda_{f \text{ max}}$	541	546	558	562	570	573
	$\lambda_{a \text{ max}}$	476	468	476	474	506	494
	$\Delta\bar{\nu}$	2524	3052	3087	3303	2218	2790
CNCONHGluAc	$\lambda_{f \text{ max}}$	534	542	559	560	569	574
	$\lambda_{a \text{ max}}$	478	489	496	500	514	511
	$\Delta\bar{\nu}$	2194	1999	2272	2143	1881	2148

Tableau (III.4).3

Déplacements de Stokes des différents rotors coumarine dans les différents solvants

($\lambda_{f \text{ max}}$ en nm, $\lambda_{a \text{ max}}$ en nm, $\Delta\bar{\nu}$ en cm^{-1}).

On peut noter que le déplacement de Stokes des rotors glucidiques augmente par rapport aux autres composés, ce qui laisse supposer que $\Delta\bar{\nu}$ augmente avec la longueur de chaîne du groupement électroaccepteur. On constate également cette augmentation lorsque l'on passe du composé ester à son homologue acide.

De façon générale, cette augmentation du déplacement de Stokes est également constatée lorsque l'on passe à des solvants de plus forte polarité.

Tout cela caractérise une augmentation du moment dipolaire sous excitation, peut-être due à des interactions spécifiques de type liaisons hydrogène entre les molécules de soluté et les molécules de solvant, qui conduisent à des réactions de transfert de charge. Une cyclisation à travers des liaisons hydrogène intramoléculaires du substituant en position-3 est également une explication possible.

Tous ces changements, observés dans les propriétés photophysiques des différents composés, selon la nature du solvant, peuvent être expliqués en terme de processus de formation d'un état TICT. Ce mécanisme est restreint aux structures coumarine qui possèdent un groupement amino en position-7, libre de tourner, et alkylé, de façon à permettre la stabilisation de l'état TICT.

Pour une molécule ayant un substituant électrodonneur (groupe dialkylamino) et un groupement permettant le transfert d'électrons (hétérocycle), un état ICT avec un transfert partiel d'électron est initialement formé sous excitation électronique. Dans les milieux polaires, le groupe dialkylamino subit une rotation conduisant à une position perpendiculaire de l'orbitale donneur par rapport à l'orbital accepteur qui résulte en un transfert total d'électron, et donc à une désactivation de l'état ICT vers l'état TICT. Cette désactivation est interdite lorsque l'énergie de transition est faible et qu'elle ne permet pas un transfert de charge intramoléculaire. A titre d'exemple, un solvant polaire et protique (tel que l'eau) engendre un fort déclin de l'état ICT vers l'état TICT, probablement en raison des interactions dues à la formation de liaisons hydrogène avec les états ICT et TICT.

Enfin, dans notre cas, le groupement qui subit la rotation est identique pour tous les composés étudiés (groupement diéthylamino) ce qui signifie que tous les changements observés dans les propriétés photophysiques résultent de la différence de force des groupements attracteurs en position-3.

III.4.2. INFLUENCE DU MILIEU SUR LES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS CNCOOEt ET CNCONHGlu

Que ce soit pour les études de polarité ou de viscosité nous avons choisi de toujours comparer les rotors CNCOOEt et CNCONHGlu afin de mettre en évidence l'influence du groupement glucidique. Dans un premier temps, du fait de la sensibilité de nos coumarines à l'effet de solvant, une étude de l'effet de polarité sur les propriétés d'émission apparaît particulièrement adaptée pour approfondir notre compréhension des interactions soluté-solvant.

A/ Influence de la polarité du solvant

Depuis longtemps utilisé par les physico-chimistes pour décrire les interactions soluté-solvant, le concept de polarité de solvant a pour but de caractériser la capacité d'un liquide à dissoudre des espèces polaires ou polarisables. La polarité ne peut pas être exprimée au moyen d'un seul terme. Un paramètre macroscopique, c'est-à-dire moyenné sur un très grand nombre de molécules, ne suffit pas à décrire le pouvoir solvatant d'une espèce. Celui-ci dépend en effet d'une multitude d'interactions localisées entre le soluté et le solvant.

Pour décrire l'effet global de polarité d'un solvant, des voies semi-empiriques ont souvent été choisies en établissant des échelles de polarité à partir des effets de solvant sur les caractéristiques spectroscopiques d'un soluté. Ces échelles présentent l'avantage de refléter les interactions locales entre soluté et solvant et permettent donc de définir des paramètres exprimant mieux l'effet d'un solvant au niveau moléculaire.

L'étude des caractéristiques photophysiques des divers rotors nouvellement synthétisés a déjà mis en évidence l'effet de la polarité du solvant. Pour tous ces traceurs, cette augmentation se traduit par un déplacement solvatochromique des spectres d'absorption et d'émission. Suite à cette première conclusion, nous avons voulu réaliser une étude plus détaillée de la relation entre le déplacement de $\lambda_{f \max}$ et la polarité du solvant.

Il existe de nombreuses échelles de polarité permettant de conjuguer longueurs d'onde d'émission et polarité. Les plus usuelles sont :

- le paramètre Δf de Lippert et Mataga [Mataga, 1956],
- le paramètre Z de Kosower [Kosower, 1958],
- le paramètre $E_T(30)$ de Dimroth et Reichardt [Reichardt, 1979].

i/ Etude en fonction du paramètre de polarité $E_T(30)$

$$E_T(30) = \frac{hcN_a}{\lambda} = \frac{28\,590}{\lambda} \text{ (kcal / mol)}$$

h : constante de Planck ($h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s)

c : vitesse de la lumière ($c = 3 \cdot 10^8$ m/s)

N_a : nombre d'Avogadro ($N_a = 6,023 \cdot 10^{23}$)

λ : longueur d'onde correspondant à la transition et prise au maximum de la bande d'absorption

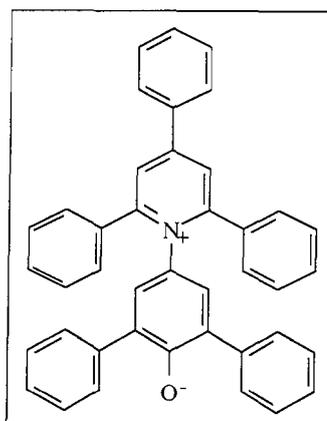


Figure (III.4).8

Colorant de Reichardt.

L'échelle la plus utilisée à l'heure actuelle est celle de Dimroth et Reichardt qui est fondée sur des effets de solvatochromie et traduit donc l'influence du solvant sur une bande d'absorption électronique d'une sonde moléculaire. Elle est définie à partir du déplacement hypsochrome de la bande de transfert de charge des bétaines A et B. Dans ce cas, le paramètre de polarité est simplement l'énergie de la transition électronique présentée par la bétaine ou colorant de Reichardt (figure (III.4).8) en solution :

	SOLVANTS	PARAMETRE E _T (30) (kcal/mol)
SOLVANTS APROTINIQUES	Toluène	33,9
	Diéthyl éther	34,5
	Acétate d'éthyle	38,1
	Chloroforme	39,1
	Dichlorométhane	40,7
	Acétonitrile	45,6
SOLVANTS PROTIQUES	2-Butanol	47,1
	2-Propanol	48,4
	Ethanol	51,9
	Méthanol	55,4
	Glycérol	57,0
	Eau	63,1

Tableau (III.4).4

Valeurs du paramètre E_T(30) des différents solvants considérés.

Ce paramètre E_T(30) (tableau (III.4).4) permet de différencier les solvants protiques et les solvants aprotiques, et donc de comparer l'influence de ces deux classes de solvants sur le traceur étudié. Expérimentalement on obtient une relation linéaire lorsque l'on trace les énergies d'émission en fonction du paramètre E_T(30) des solvants considérés. Les figures (III.4).9 et (III.4).10 présentent les résultats obtenus avec respectivement les rotors CNCOOEt et CNCONHGl.

Ces courbes permettent de mettre en évidence l'effet solvatochromique du solvant sur le rotor considéré, et de souligner l'importance des rotors moléculaires fluorescents comme sondes de polarité.

L'énergie d'émission diminue lorsque le paramètre E_T(30) augmente. Cependant, pour deux solvants de même polarité, on note une énergie d'émission plus grande pour les solvants protiques que pour les solvants aprotiques. Cela signifie que les solvants protiques ont une interaction spécifique avec la molécule considérée, à l'état excité, et que la relaxation du solvant est incomplète.

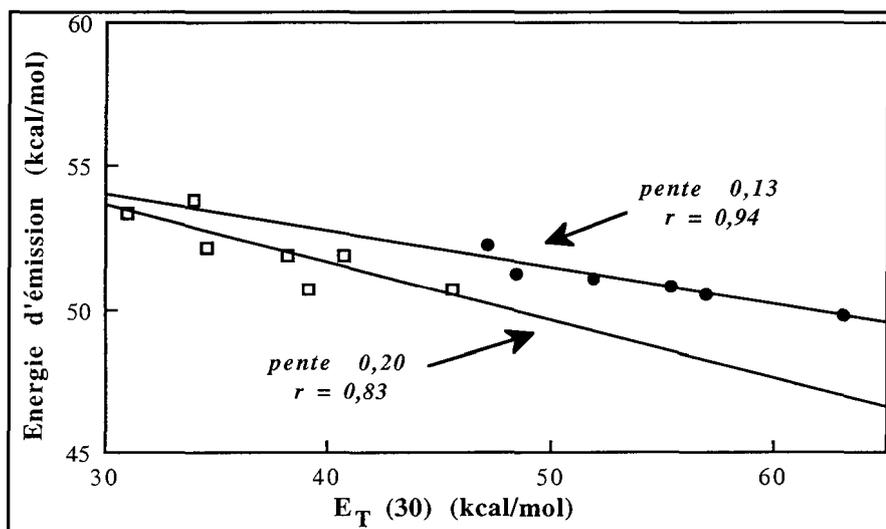


Figure (III.4).9

Tracé des énergies d'émission de fluorescence du rotor CNCOOEt à 25°C en fonction du paramètre de polarité pour les solvants aprotiques (□) et les solvants protiques (●).

Une pente importante est associée à une espèce ayant une forte variation d'énergie d'émission. Cela se traduit par la présence d'espèces moins conjuguées à l'état excité qui peuvent provenir d'un état S_1 perpendiculaire. La description de l'état perpendiculaire se réfère à l'idée que l'orbitale "p" de l'azote est perpendiculaire aux orbitales "p" qui forment le système " π " du noyau aromatique [Kosower, 1976].

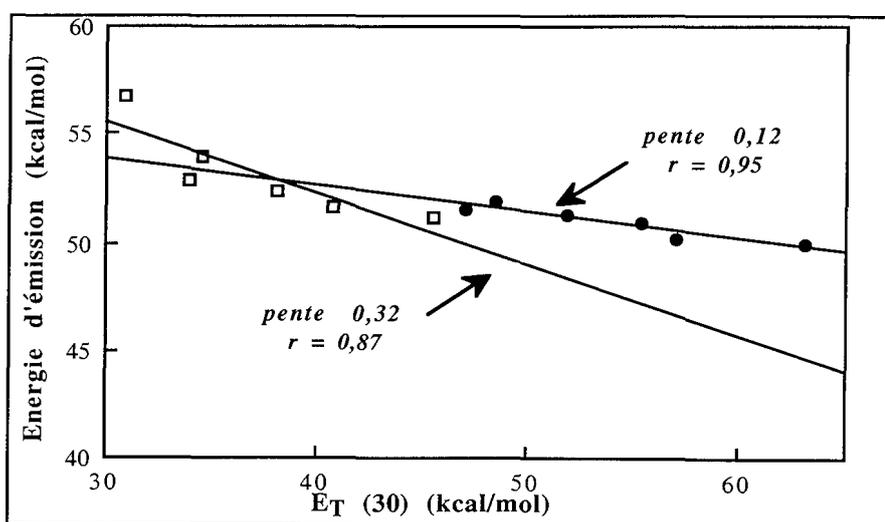


Figure (III.4).10

Tracé des énergies d'émission de fluorescence du rotor CNCONHGlu à 25°C en fonction du paramètre de polarité pour les solvants aprotiques (□) et les solvants protiques (●).

Dans le cas du rotor glucidique (figure (III.4).10), l'écart entre les pentes est beaucoup plus important. L'influence des solvants protiques est à peu près identique pour les deux rotors, tandis que les solvants aprotiques engendrent une plus grande réactivité du rotor CNCONHGlu que du rotor CNCOOEt. On constate également que les solvants aprotiques dévient de la linéarité, dans le cas des deux rotors, avec un effet plus marqué pour le rotor CNCONHGlu.

Enfin, pour les solvants protiques une dépendance linéaire est observée entre l'énergie d'émission et le paramètre $E_T(30)$ pour les deux traceurs. Cette bonne corrélation obtenue avec les deux sondes dans une série de solvants indique que les phénomènes observés sont principalement dus à des interactions solvant-soluté non spécifiques [Coosemans, 1979].

ii/ Etude en fonction du paramètre de Lippert et Mataga

La théorie de Lippert et Mataga [Mataga, 1956] décrit l'influence du solvant sur l'absorption et l'émission de la molécule de soluté. Elle repose sur un modèle simplifié du système soluté-solvant, basé sur la théorie de Onsager [Onsager, 1936]. Selon cette théorie, le solvant est considéré comme un milieu diélectrique continu, caractérisé par une constante diélectrique statique ϵ (fréquence nulle). Il entoure une cavité sphérique de rayon a , à l'intérieur de laquelle se trouve la molécule de soluté assimilée à un dipôle ponctuel. Ce dipôle ponctuel impose aux molécules de solvant une polarisation par induction et par orientation. Le soluté subit en retour, de la part du solvant, un champ électrique appelé champ de réaction.

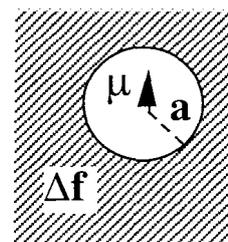
Ce modèle permet de relier le déplacement de Stokes à des grandeurs physiques caractéristiques du solvant et du soluté, et ne tient pas compte de l'existence de moments dipolaires locaux au sein de la molécule.

L'équation de Lippert (1) permet d'exprimer le déplacement de Stokes en fonction des moments dipolaires de la molécule de soluté à l'état excité (μ^*) et à l'état fondamental (μ), de la constante diélectrique statique (ϵ) et de l'indice de réfraction du milieu (n).

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2}{hC} (\bar{\mu}^* - \bar{\mu})^2 a^{-3} \left[\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] + \text{cte} \quad (1)$$

$\bar{\nu}_a$ et $\bar{\nu}_f$ sont les nombres d'onde des maxima d'absorption et de fluorescence, pouvant être exprimés par :

- à l'absorption : $\bar{\nu}_a = -\frac{2}{hC} \bar{\mu} \cdot (\bar{\mu}^* - \bar{\mu}) a^{-3} \Delta f + \text{cte}$
- à l'émission : $\bar{\nu}_f = -\frac{2}{hC} \bar{\mu}^* \cdot (\bar{\mu} - \bar{\mu}^*) a^{-3} \Delta f + \text{cte}$ avec :
- $\bar{\mu}$: moment dipolaire à l'état fondamental (Debye)
- $\bar{\mu}^*$: moment dipolaire à l'état excité (Debye)
- h : constante de Planck (J.s)
- c : vitesse de la lumière dans le milieu (m.s⁻¹)
- a : rayon de la cavité d'Onsager dans laquelle le soluté réside (Å)



Le paramètre de polarisabilité est calculé avec l'équation : $\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$ et comporte

deux termes représentant respectivement les polarisations électrostatique (constante diélectrique statique) et inductive (constante diélectrique à fréquence infinie n^2) dues au solvant.

Le rayon de la cavité d'Onsager est pris égal à la moitié de la longueur du dipôle formé par la molécule, et estimé à 5,4 Å (figure (III.4).11) dans notre cas (valeur déterminée par un logiciel de modélisation moléculaire : *INSIGHT II* - Version 97.0).

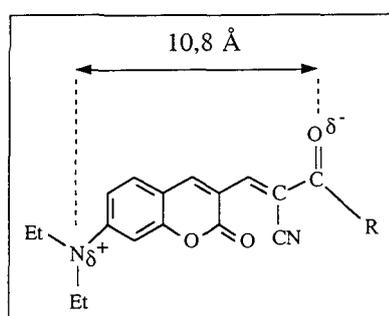


Figure (III.4).11

Estimation de la longueur du dipôle.

Ainsi, en traçant le déplacement de Stokes de chaque rotor en fonction de la polarisabilité du solvant considéré, on obtient une droite (figure (III.4).12) dont la pente correspond à $|\Delta\bar{\mu}|$. En l'absence d'interactions autres que celles de type dipôle-dipôle, la théorie de Lippert et Mataga prévoit une variation linéaire du déplacement de Stokes en fonction du paramètre de polarisabilité. Cette relation n'est valable que dans l'hypothèse où les moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité sont colinéaires.

L'analyse de la figure (III.4).12 indique une variation de moment dipolaire $|\Delta\bar{\mu}|$ de 6,5 Debye pour le rotor CNCOOEt et de 9,6 Debye pour le rotor CNCONHGl.

L'influence de la polarité sur le déplacement de Stokes traduit une augmentation du moment dipolaire de la sonde sous excitation, en d'autres termes $\mu^* > \mu$. Ce comportement peut être attribué à une redistribution de charges de l'état excité par rapport à l'état fondamental. Comme nous l'avons vu précédemment, les coumarines subissent en effet un transfert de charge dans leur premier état excité S_1 ayant comme conséquence une augmentation du moment dipolaire de cet état.

Globalement un comportement linéaire est observé pour des solvants non protiques qui induisent des interactions de type dipôle-dipôle avec les molécules de soluté. L'écart à la linéarité indique la présence d'interactions non prises en compte dans la théorie de Lippert-Mataga, notamment les liaisons spécifiques à courtes distances comme les liaisons hydrogène.

Le déplacement de Stokes dans l'eau est particulièrement important pour le rotor CNCONHGlU et s'explique par de forts déplacements vers le rouge en fluorescence et un déplacement vers le rouge négligeable en absorption.

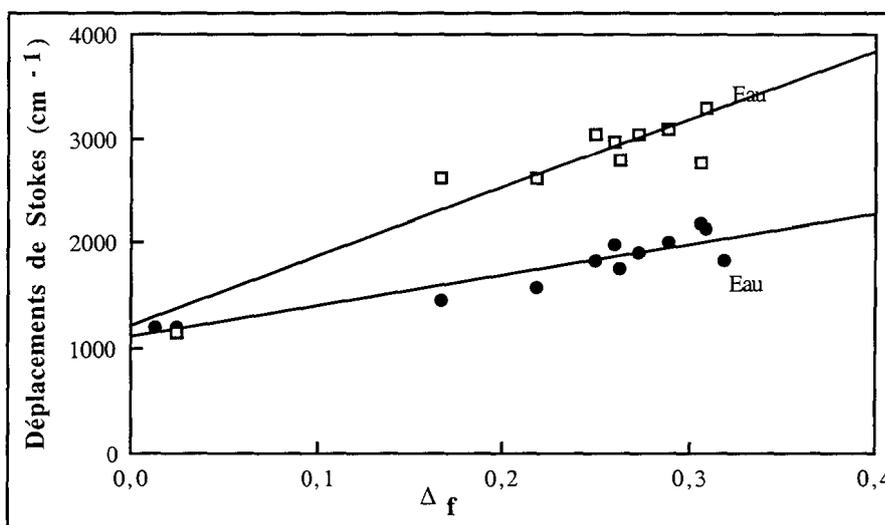


Figure (III.4).12

Tracé de Lippert pour différents solvants dans le cas des rotors CNCOOEt (●) et CNCONHGlU (◻).

B/ Influence de la viscosité du solvant

Dans cette partie, nous avons voulu mettre en évidence l'influence de la viscosité du milieu sur le comportement photophysique des rotors. Cependant, la variation de viscosité d'un milieu n'est pas aisée à réaliser sans changer d'autres paramètres qui pourraient eux-mêmes modifier les caractéristiques photophysiques. En effet, quel que soit le mode adopté pour faire varier la viscosité, il est accompagné d'une influence supplémentaire. A titre d'exemple :

- le changement de la viscosité peut être obtenu en combinant des mélanges isothermes de solvants. Dans ce cas on modifie, outre la viscosité, la nature du solvant en terme de polarité,
- le changement de viscosité d'un solvant peut également être obtenu par des modifications de pression, qui vont également entraîner des changements intrinsèques du fluorophore,
- on peut aussi travailler avec un même solvant à différentes températures, et dans ce cas les variations de température modifient également les propriétés du fluorophore.

C'est néanmoins ce dernier protocole que nous avons choisi d'exploiter.

i/ Détermination des énergies d'activation

Toute restriction dans la réorientation intramoléculaire résultant d'interactions entre le soluté et le solvant se traduit par une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

Ainsi, les réorientations moléculaires qui affectent le déclin de fluorescence via une rotation, sont généralement des processus induits par des changements de température qui suivent une loi de type Arrhénius :

$$k_{nr} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

Dans cette expression, E_a représente l'énergie d'activation apparente, c'est-à-dire la somme des barrières énergétiques visco- et thermodépendantes.

La constante k_{nr} des transitions non radiatives augmente donc avec la température, ce qui implique la diminution du rendement quantique de fluorescence avec l'augmentation de température. La voie principale de relaxation non radiative dans un solvant donné étant l'isomérisation photochimique, la diminution de température augmente donc la possibilité des transitions radiatives aux dépens des transitions non radiatives.

Le rendement quantique de fluorescence peut être exprimé en fonction des constantes de déclin radiatif (k_r) et non radiatifs (k_{nr}) conduisant à l'expression :

$$\frac{1}{\Phi_f} - 1 = \frac{A}{k_r} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

Ainsi, un changement dans la viscosité du solvant, dû à une variation de température, peut se traduire par une droite de pente négative (E_a/R) lorsque l'on trace $\ln((1/\Phi_f) - 1)$ en fonction de $1/T$ [Lukac, 1984]. On a ainsi accès à l'énergie d'activation pour la rotation du rotor dans le glycérol (figure (III.4).13).

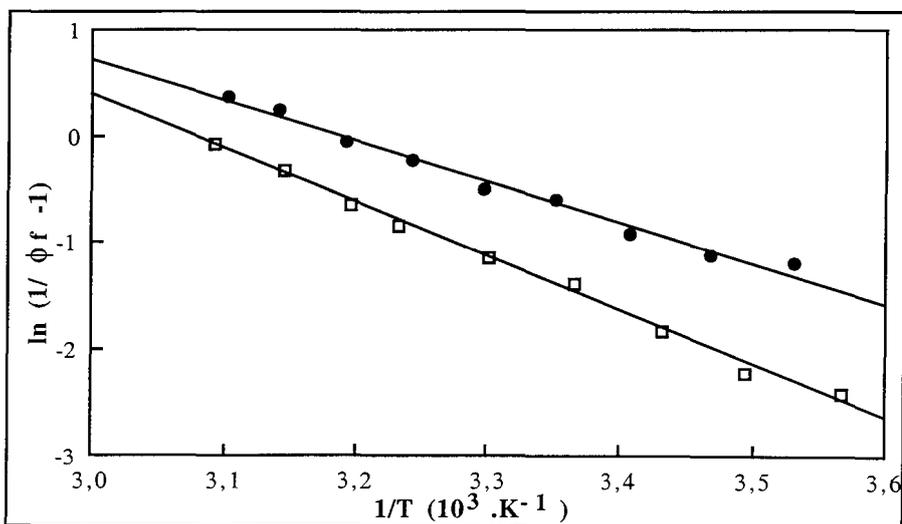


Figure (III.4).13

Tracé de $\ln((1/\Phi_f) - 1)$ en fonction de $1/T$ pour les rotors CNCOOEt (●) et CNCONHGlu (◻) dans le glycérol.

L'interprétation du graphique nous donne des valeurs d'énergie d'activation de 32 kJ/mol dans le cas du CNCOOEt et de 42 kJ/mol dans le cas du CNCONHGlu. Cette différence d'énergie d'activation provient d'un encombrement plus important dans le cas du rotor glucidique, or plus les interactions soluté-solvant sont grandes, plus la rotation est difficile, et plus la barrière d'énergie d'activation est élevée.

ii/ Mise en évidence de deux régimes de viscosité

On peut également mettre en évidence l'influence de la viscosité sur le milieu en traçant la viscosité dynamique du milieu (η/T) en fonction du rendement quantique de fluorescence ϕ_f . Dans le cas des viscosités moyennes ou élevées, on établit les relations [Loutfy, 1982]:

$$k_{nr} = k_{nr}^{\circ} \exp\left(-x \frac{V_o}{V_f}\right) \quad (1) \quad \text{ou encore} \quad \phi_f = a \left(\frac{\eta}{T}\right)^x \quad (2)$$

La figure (III.4).14 établit la dépendance du rendement quantique de fluorescence des deux traceurs avec le rapport (η/T).

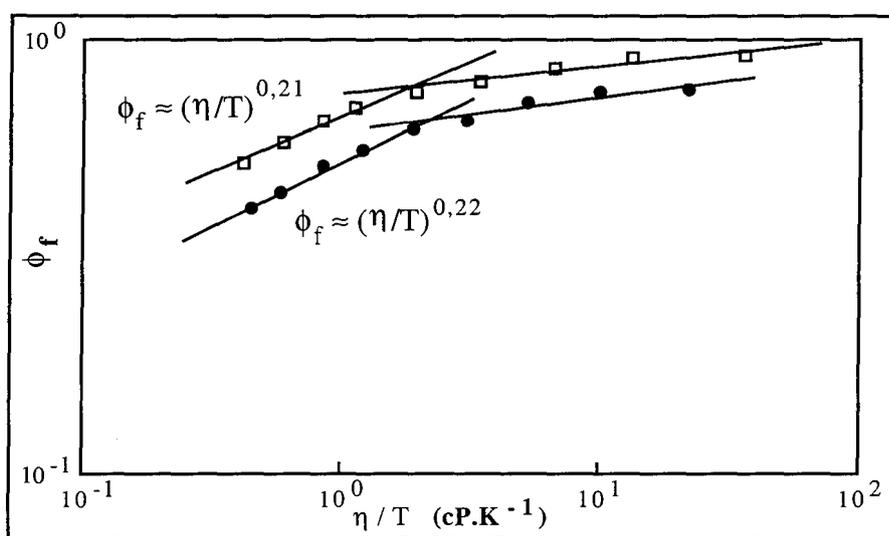


Figure (III.4).14

Tracé de (η/T) en fonction du rendement quantique de fluorescence pour les rotors CNCOOEt (●) et CNCONHGlu (◻) dans le glycérol.

Les courbes obtenues montrent que l'on peut déduire de la relation (2) les valeurs de $x = 0,2$ dans le glycérol. L'étude a été réalisée dans un solvant moins visqueux (l'éthanol), et des courbes similaires ont été obtenues, pour des valeurs en abscisses beaucoup plus faibles et une valeur de $x = 0,5$. Ceci est lié à la grande différence d'énergie d'activation due à la viscosité ou à des interactions spécifiques avec le solvant. Ces phénomènes ont lieu lorsque la relaxation du solvant devient trop lente, à un point tel que le volume libre devienne le facteur contrôlant le déclin de la molécule suite à une rotation.

Cela montre l'importance du volume libre du solvant sur le processus de relaxation de l'état excité S_1 .

Enfin, la figure (III.4).14 reflète deux régimes de viscosité, à faible et à plus forte viscosité, en accord avec des observations déjà faites par Loutfy et al., 1982.

C/ Influence de la température du milieu

L'interprétation des effets de la température sur l'émission de fluorescence est un phénomène compliqué et encore mal compris. Comme nous l'avons déjà précisé, une variation de température sur un solvant modifie également sa viscosité ; il est impossible d'étudier l'influence de l'un de ces facteurs sans tenir compte de l'autre.

Pour cette étude, nous avons travaillé à partir de solutions aqueuses et dans l'éthanol pour lesquelles les variations de viscosité entre 280 et 330 K sont respectivement de 1,35 à 0,62 mPa.s pour l'eau et de 1,46 à 0,66 mPa.s pour l'éthanol, variations qui sont de l'ordre de 50%, mais sur de très faibles valeurs comparées à celles du glycérol, par exemple, dont les valeurs de viscosité sont de 10 655 mPa.s à 280 K et de 92,8 mPa.s à 330 K, soit une variation de l'ordre de 99%. Ainsi, dans le cas du glycérol, une augmentation de température traduit majoritairement un effet de viscosité, alors que pour l'eau et l'éthanol elle traduit plus un effet de température.

Afin de mieux comprendre l'effet de la température sur l'état excité, les variations de l'intensité de fluorescence (I/I_0) en fonction de la température (280-330 K) des rotors CNCOOEt et CNCONHGlu ont été étudiées dans l'eau (figure (III.4).15) et dans l'éthanol (figure (III.4).16).

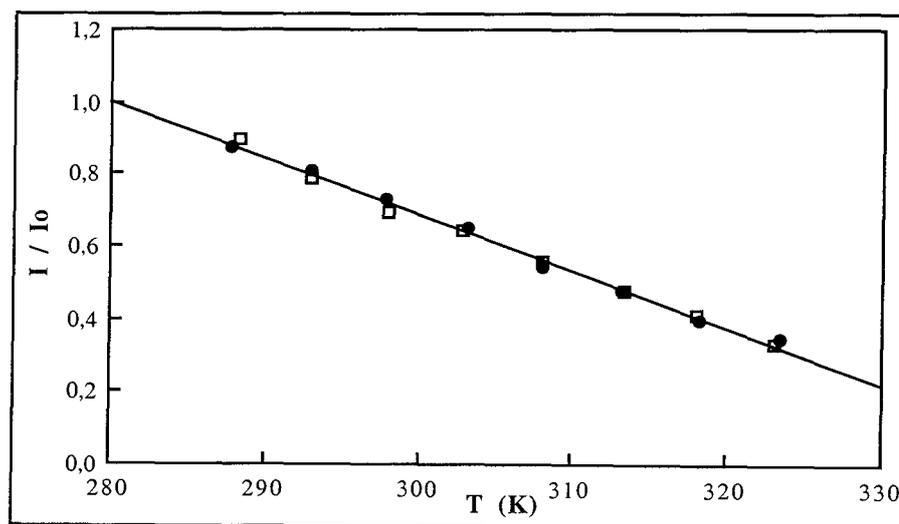


Figure (III.4).15

Influence de la température sur la variation de l'intensité de fluorescence pour des solutions aqueuses de CNCOOEt (●) et CNCONHGlu (◻).

L'analyse de la figure (III.4).15 montre qu'en milieu aqueux, les variations de l'intensité de fluorescence avec la température ne dépendent pas de la nature du substituant en position-3. En effet, dans le cas des deux rotors on trouve une variation identique du rapport I/I_0 .

L'influence de la température sur le déclin de fluorescence se fait probablement par l'intermédiaire d'un transfert de charge intramoléculaire. A haute température cet état à transfert de charge est probablement majoritaire ce qui explique la chute du rapport de fluorescence I/I_0 .

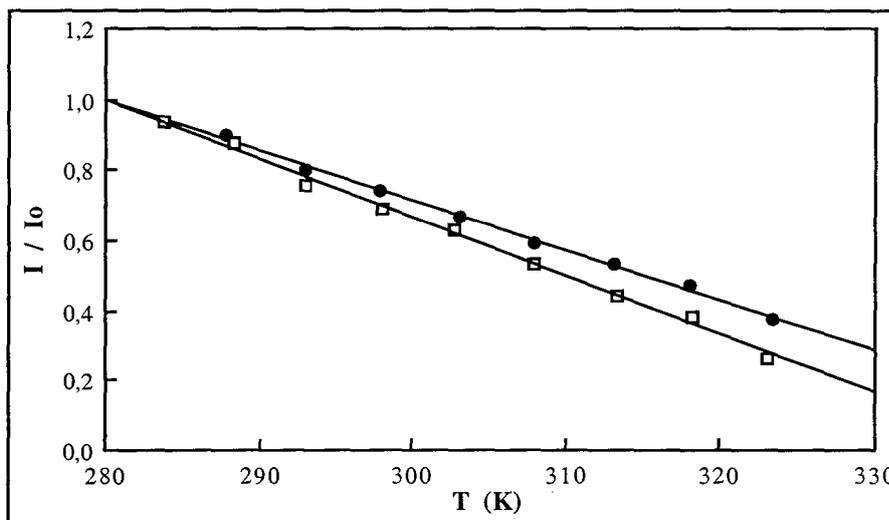


Figure (III.4).16

Influence de la température sur la variation de l'intensité de fluorescence pour des solutions dans l'éthanol de CNCOOEt (●) et CNCONHGlU (◻).

L'étude dans l'éthanol (figure (III.4).16), montre en revanche, un écart entre les deux droites. Il semble que le rotor glucidique subisse une influence de la température plus forte que le rotor CNCOOEt puisque son intensité de fluorescence chute plus rapidement. Il y a donc dans ce cas une influence du substituant en position-3 sur les variations d'intensité de fluorescence.

Ces résultats montrent que le déclin de l'intensité de fluorescence semble être dû à un mécanisme intramoléculaire qui dépend de la température, puisque le rapport I/I_0 décroît lorsque la température augmente. Un encombrement stérique qui empêche la rotation de la molécule et ne permet pas le passage à l'état twisté inhibe le déclin non radiatif : ce phénomène se traduit par un rapport I/I_0 qui ne varie pas, ou peu, avec la température, résultat mis en évidence par Giri en 1992.

Il semble néanmoins que l'influence de la température ne soit pas la contribution la plus importante pour le processus de déclin non radiatif.

III.5. ETUDE PHOTOPHYSIQUE DYNAMIQUE DES ROTORS COUMARINE CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc

III.5.1. DESCRIPTION DES RESULTATS

Les déclin de fluorescence des états excités des rotors CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc ont été mesurés en utilisant la technique de comptage monophotonique présentée dans la partie III.2.2.c. de ce chapitre. Cette étude a nécessité l'utilisation de solutions à $5 \cdot 10^{-6}$ M dans le toluène, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le glycérol. Après excitation de l'échantillon à une longueur d'onde de 515 nm (laser à argon ionisé), les déclin de fluorescence ont été enregistrés à des longueurs d'onde comprises entre 530 et 600 nm.

La forme des courbes expérimentales obtenue avant déconvolution de la fonction d'appareil suggère l'utilisation d'une fonction d'analyse bi-exponentielle (figure (III.5).1).

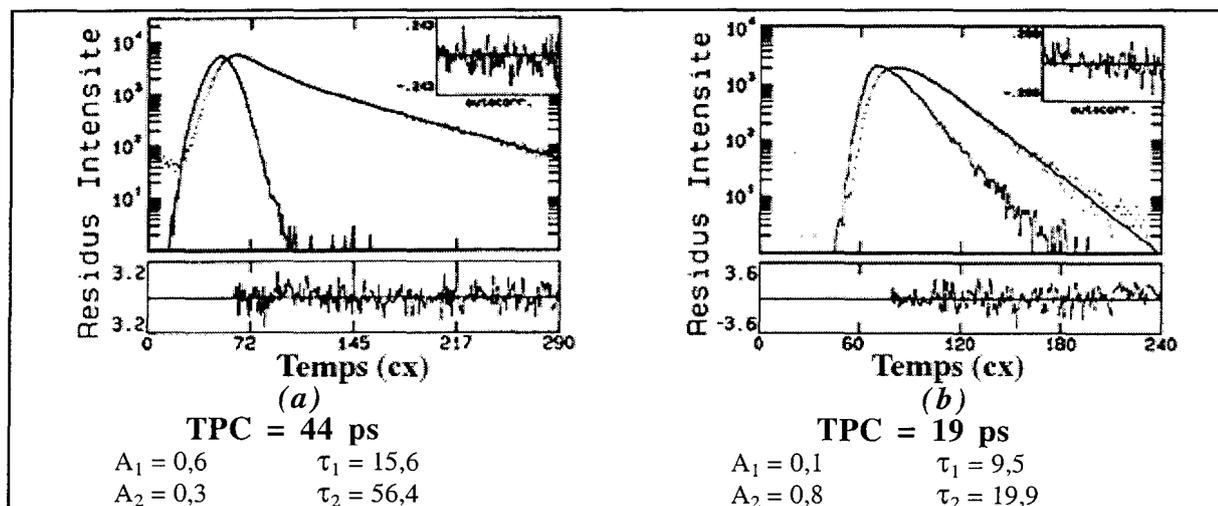


Figure (III.5).1

Déclin de fluorescence du rotor CNCONHGlu dans le glycérol (a) et dans le toluène (b).

A partir des valeurs des durées de vie et des rendements quantiques de fluorescence, nous avons déterminé les constantes de déclin radiatif (k_r) et non radiatif (k_{nr}) en utilisant les relations suivantes :

$$k_r = \frac{\phi_f}{\tau_1} \quad \text{et} \quad k_{nr} = \frac{(1 - \phi_f)}{\tau_1}$$

Nous nous sommes intéressés uniquement aux valeurs de k_r et de k_{nr} correspondant à la durée de vie la plus longue, car c'est probablement, comme nous pourrions le voir par la suite, la durée de vie qui correspond aux différents rotors considérés ; la durée de vie la plus courte étant probablement due à un conformère de nos molécules, prenant naissance à l'état excité.

Les résultats du tableau (III.5).1 montrent que la constante de déclin non radiatif est sensible à la nature du substituant en position-3 et à la polarité du solvant. Dans le modèle de désactivation non radiative par un état "twisté" TICT, suggéré dans la littérature, la polarité du solvant joue un rôle essentiel ; en effet, un tel état plus polaire est mieux stabilisé par un solvant de plus grande polarité. Mais le tableau (III.5).1 montre clairement que les valeurs des constantes de désactivation non radiative des différentes coumarines n'augmentent pas systématiquement avec la polarité du solvant.

Rotor	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	Glycérol
CNCOOEt	τ_1	0,31	0,3	0,6	2,3
	$k_r \times 10^{-8}$	0,97	2,5	2,85	2,81
	$k_{nr} \times 10^{-8}$	31,3	30,8	13,8	1,54
	τ_2	0,15	0,1	0,2	0,6
CNCONHGlu	τ_1	0,6	2	0,8	2,6
	$k_r \times 10^{-8}$	0,52	0,84	1,61	3,07
	$k_{nr} \times 10^{-8}$	16,2	4,17	10,9	0,77
	τ_2	0,16	0,42	0,1	1
CNCONHGluAc	τ_1	0,38	1,2	1,8	2,6
	$k_r \times 10^{-8}$	7,84	3,93	0,28	3,63
	$k_{nr} \times 10^{-8}$	18,5	4,4	5,28	0,22
	τ_2	0,07	0,6	0,75	0,9

Tableau (III.5).1

Détermination des durées de vie des états excités
des différentes coumarines ($\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$)
(τ_1 et τ_2 en ns ; k_r et k_{nr} en s^{-1}).

De plus, une désactivation non radiative mettant en jeu la rotation du groupement amino est sûrement empêchée par les forces de friction dues à la viscosité du solvant utilisé puisque l'on constate, dans le cas du glycérol, des valeurs de k_r toujours supérieures à celles de k_{nr} .

Les fluctuations observées au niveau de la constante de désactivation non radiative ne peuvent pas être interprétées dans le modèle d'un état TICT. Un autre mécanisme de désactivation non radiative proposé dans la littérature [Lopez-Arbeloa, 1992] est le modèle ULM ("Umbrella-Like Motion"), décrit dans le chapitre I de ce mémoire. Afin d'expliquer la variation de k_{nr} dans les différents solvants, notamment les alcools et l'eau, la prise en compte d'interactions spécifiques comme les liaisons hydrogène apparaît nécessaire.

Ainsi, les liaisons hydrogène au niveau du groupement carbonyle pourraient favoriser le transfert de charge intramoléculaire (du groupement amino vers le groupement carbonyle) et augmenter la probabilité de désactivation non radiative lorsque le pouvoir donneur de proton du solvant augmente.

Enfin, les valeurs de k_{nr} du rotor CNCOOEt sont toujours supérieures à celles des rotors glucidiques. Ces derniers ont donc un état ICT majoritaire par rapport au rotor CNCOOEt. La présence du groupement glucosamine (seule différence notable entre les deux composés) n'est pas favorable à une relaxation de l'état ICT vers l'état TICT.

III.5.2 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Les résultats du tableau (III.5).1 montrent une particularité de ces traceurs : la présence d'une deuxième durée de vie, nettement plus faible que la première, mais parfois en proportion non négligeable. Il est difficile d'attribuer cette deuxième durée de vie à un état TICT fluorescent, puisque tous les résultats obtenus jusqu'à présent démontraient le contraire. De plus, cette deuxième durée de vie est présente également dans des solvants moins polaires comme l'acétate d'éthyle, alors qu'un état TICT fluorescent est favorisé dans des solvants de forte polarité.

Pour tenter de comprendre le comportement de ces deux durées de vie, nous avons étudié l'influence de la température sur les durées de vies des états excités des différentes coumarines. Cette étude a été réalisée dans le glycérol et le toluène, solvants ayant des propriétés de polarité très différentes.

A/ Etude dans le glycérol

Dans le glycérol, les trois coumarines considérées possèdent une durée de vie longue (τ_1) de l'ordre de 2,3 ns et une durée de vie courte (τ_2) de l'ordre de 400 ps, proche des limites de détection de l'appareil.

La figure (III.5).2 présente les variations des déclin de fluorescence des différentes coumarines pour des températures comprises entre 290 et 330 K.

L'analyse de la figure montre clairement que la durée de vie la plus élevée diminue lorsque la température augmente, tandis que la durée de vie la plus faible reste quasiment stationnaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux durées de vie provenaient de deux espèces différentes, la plus courte étant probablement due à un conformère de la molécule qui se forme à l'état excité. L'une de ces espèces ayant le comportement d'un rotor moléculaire fluorescent (puisque sensible aux variations de température), l'autre ayant probablement une structure ne subissant plus l'effet de rotation du groupement amino ce qui pourrait expliquer le fait qu'il n'y ait pas de variation de τ_2 avec la température.

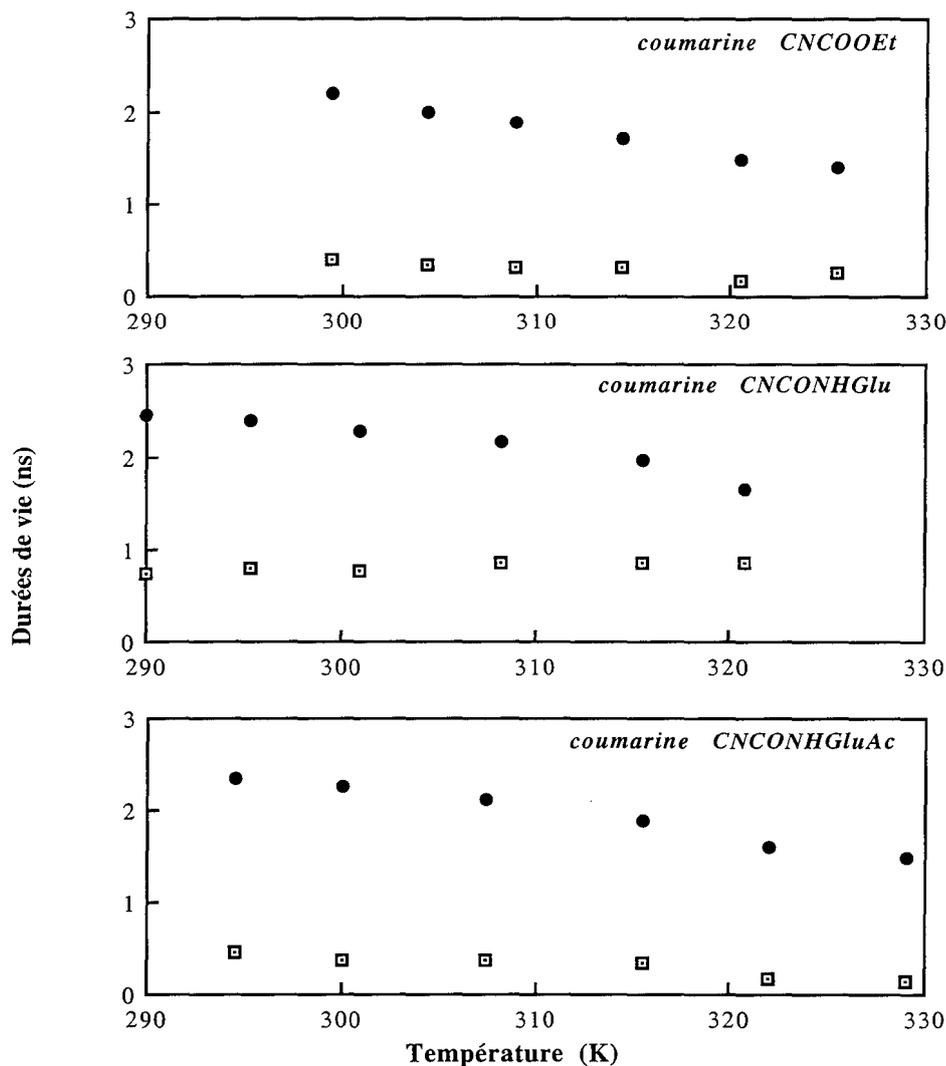


Figure (III.5).2

Variation des durées de vie τ_1 (•) et τ_2 (◻) des différentes coumarines en solution dans le glycérol en fonction de la température ($\lambda_{ex} = 515$ nm et $\lambda_{em} = 560$ nm).

B/ Etude dans le toluène

Dans le toluène, cet effet est beaucoup moins marqué simplement par le fait que les deux durées de vie sont très faibles. En effet, la durée de vie τ_1 la plus élevée est de l'ordre de 300 ps, la plus faible τ_2 serait de 100 ps, valeur qui se situe à la limite de détection de l'appareil.

Dans le cas du toluène, il est donc difficile de suivre l'évolution de ces deux durées de vie, on peut simplement constater que la durée de vie la plus élevée (τ_1) diminue également lorsque la température augmente.

III.5.3 INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EMISSION

A/ Etude dans le glycérol

Le second phénomène que nous avons constaté est l'évolution de ces deux durées de vie en fonction de la longueur d'onde à laquelle les déclinés de fluorescence sont enregistrés.

Ce comportement a également été constaté par Jones II et al., 1980^a, sur des coumarines substituées en position-7 par un groupement dialkylamino et en position-4 par un groupement -CH₃ ou -CF₃. A 500 nm, ils obtenaient une double durée de vie (3 ns et 600 ps) tandis qu'à 600 nm l'émission était mono exponentielle, et seule la durée de vie la plus longue subsistait.

Nous avons alors étudié la variation des durées de vies τ_1 et τ_2 en fonction des longueurs d'onde d'émission pour une plage allant de 530 à 600 nm. Cela nous a permis de calculer le poids respectif de chaque durée de vie (tableau (III.5).2) et de reconstituer les spectres d'émission correspondant à chaque durée de vie (figure (III.5).3), dans l'hypothèse où ces deux durées de vie sont caractéristiques de deux espèces différentes.

λ (nm)	POIDS DE τ_1			POIDS DE τ_2		
	rotor 1	rotor 2	rotor 3	rotor 1	rotor 2	rotor 3
530	63%	65%	60%	37%	35%	40%
540	71%	74%	67%	29%	26%	33%
550	79%	81%	77%	21%	19%	23%
560	87%	89%	87%	13%	11%	13%
580	95%	98%	99,8%	5%	2%	0,2%
600	97%	99,8%	100%	3%	0,2%	0%

Tableau (III.5).2

Détermination des poids associés aux durées de vie des états excités des différentes coumarines ($\lambda_{ex} = 515$ nm ; $\lambda_{em} =$ variable)

rotor 1 : CNCOOEt, rotor 2 : CNCONHGlu, rotor 3 : CNCONHGluAc

Poids de τ_1 : $A_1\tau_1/(A_1\tau_1 + A_2\tau_2)$; Poids de τ_2 : $A_2\tau_2/(A_1\tau_1 + A_2\tau_2)$.

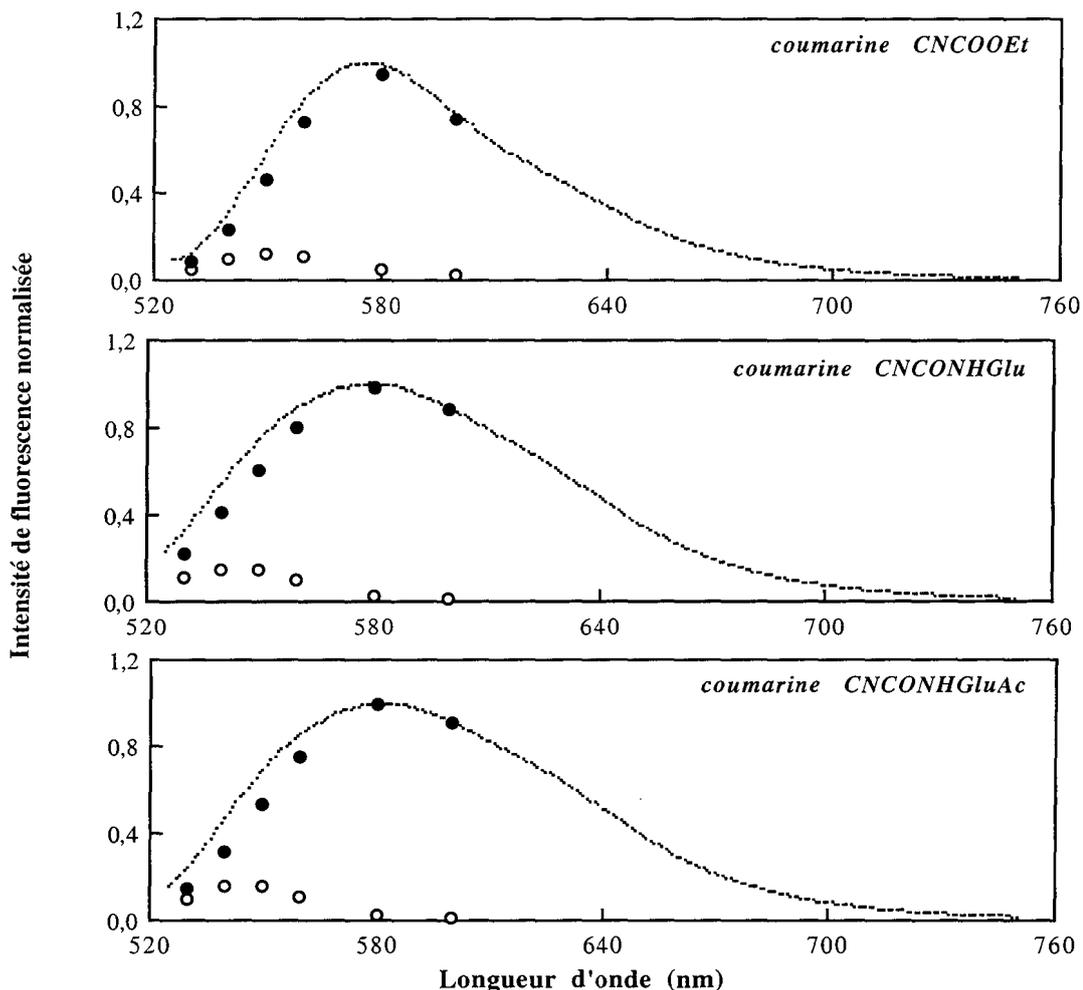


Figure (III.5).3

Spectres de fluorescence des différentes coumarines en solution dans le glycérol (○) et spectres reconstitués à partir des différents poids des durées de vie τ_1 (●) et τ_2 (○)

L'analyse de la [figure \(III.5\).3](#) montre clairement que la durée de vie la plus faible disparaît au fur et à mesure que les longueurs d'onde d'observation augmentent, tandis que la durée de vie la plus élevée atteint son poids maximal autour de 580 nm.

B/ Etude dans le toluène

Une étude analogue a été réalisée dans le toluène. Dans ce cas, le phénomène est beaucoup moins explicite puisque, comme nous l'avons déjà signalé, nous exploitons des valeurs très faibles, à la limite de détection de l'appareil.

III.5.4. CONCLUSION

L'étude des déclin de fluorescence en fonction de la polarité des solvants a révélé la présence de deux durées de vie, quelles que soient les conditions d'étude, mais dans certains cas cette deuxième durée de vie est très faible, à la limite de détection de l'appareil. On ne peut pas conclure, de manière générale, à une augmentation ou à une diminution de ces durées de vie en fonction de la polarité du solvant, ce qui suggère pour chacune une voie de désactivation non radiative encore mal comprise à ce jour.

Ces deux durées de vie ne semblent pas provenir du même composé puisqu'elles ne subissent pas la même influence de la température. La durée de vie la plus longue diminue nettement avec une augmentation de température, tandis que la plus courte ne fluctue pratiquement pas. Nous avons alors émis l'hypothèse que la durée de vie τ_2 correspond à une géométrie de la molécule qui ne subit pas de relaxation d'un état ICT vers un état TICT.

Enfin, en suivant le déclin de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission nous avons constaté que la durée de vie la plus faible disparaît vers les grandes longueurs d'onde.

Toutes ces constatations nous ont donc confortés dans notre hypothèse de formation d'un conformère de nos molécules n'existant qu'à l'état excité.

III.6. COMPARAISON DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES ROTORS GLUCIDIQUES DE TYPE COUMARINE ET DES ROTORS GLUCIDIQUES DES TYPES BENZYLIDENE ET CINNAMYLIDENE

Nous avons voulu comparer les différents rotors moléculaires glucidiques synthétisés au DCPR-GRAPP. Ces rotors sont d'intérêt pour des applications biologiques :

- si leurs longueurs d'onde d'absorption sont au-delà de celles des constituants membranaires ($\lambda > 450$ nm) pour éviter la fluorescence des marqueurs intrinsèques naturellement présents dans le milieu biologique, tels que les résidus tryptophane des protéines ou le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide),
- et si leurs rendements quantiques de fluorescence sont suffisamment élevés, de façon à pouvoir introduire le traceur en quantité infime pour ne pas perturber le milieu biologique.

La figure (III.6).1 représente les différents composés qui vont faire l'objet de cette comparaison.

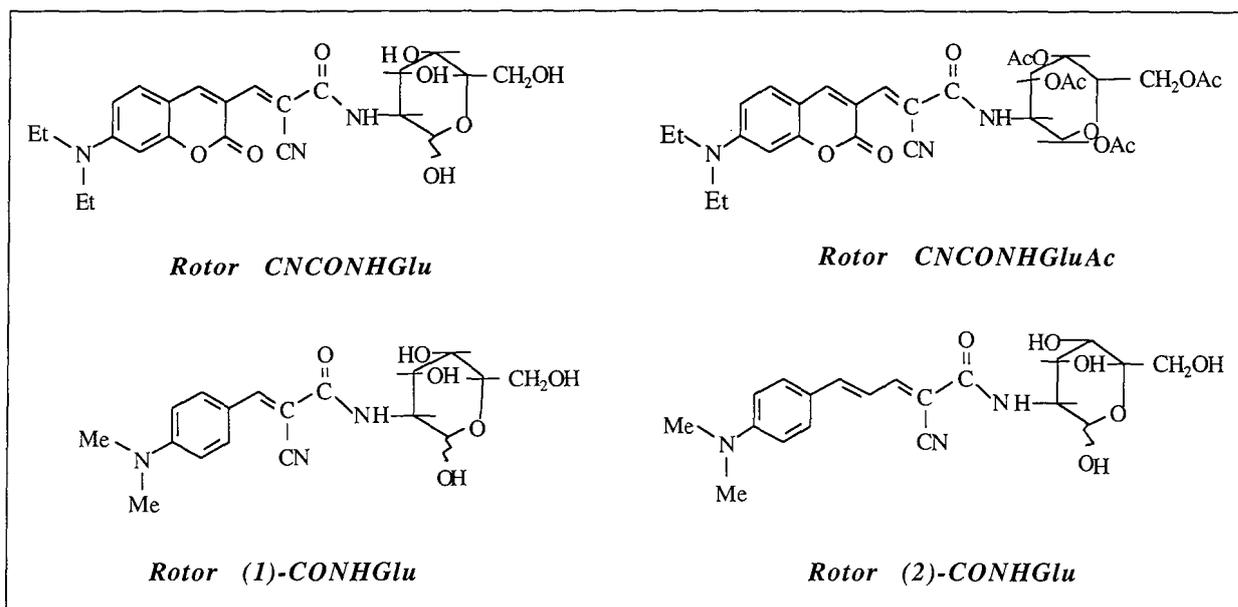


Figure (III.6).1

Structure des différents rotors glucidiques.

III.6.1. COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES D'ABSORPTION

Le tableau (III.6).1 regroupe les longueurs d'onde d'absorption UV-Visible des différents rotors glucidiques dans des solvants de polarité croissante.

Les résultats permettent de mettre en évidence le déplacement bathochrome des longueurs d'onde d'absorption avec l'augmentation de la polarité des solvants, avec un effet plus marqué pour les rotors coumariniques que pour les dérivés benzylidène et cinnamylidène.

On peut également constater une augmentation plus importante des longueurs d'onde d'absorption lorsque la double liaison assurant la conjugaison est incluse dans un hétérocycle. Par exemple, pour un même solvant, les longueurs d'onde d'absorption des rotors glucidiques dépassent de 20 à 40 nm celles du rotor (2)-CONHGlu. Enfin, les longueurs d'onde d'absorption des dérivés coumariniques semblent plus adaptées pour l'étude de systèmes biologiques puisqu'elles sont largement au-dessus de 450 nm ; ce sont également ces composés qui pourront être employés pour des observations par microscopie optique en champ proche.

Rotor	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	MeOH	Glycérol	Eau
	$E_T(30)$	33,9	38,1	51,9	55,4	57	63,1
CNCONHGlu	$\lambda_a \text{ max}$	476	468	476	474	506	494
CNCONHGluAc	$\lambda_a \text{ max}$	478	489	496	500	514	511
(1)-CONHGlu	$\lambda_a \text{ max}$	412	406	410	411	421	422
(2)-CONHGlu	$\lambda_a \text{ max}$	450	441	450	451	471	457

Tableau (III.6).1

Caractéristiques d'absorption UV-Visible des rotors moléculaires glucidiques, dans divers solvants de polarité croissante, à 25°C.
($E_T(30)$ en kcal/mol ; $\lambda_a \text{ max}$ en nm).

III.6.2 COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES D'EMISSION DE FLUORESCENCE

Le tableau (III.6).2 regroupe les longueurs d'onde d'émission des quatre rotors glucidiques dans des solvants de polarité croissante ainsi que les rendements quantiques de fluorescence associés.

Rotor	Solvant	Toluène	AcOEt	EtOH	MeOH	Glycérol	Eau
	$E_T(30)$	33,9	38,1	51,9	55,4	57	63,1
	η	0,55	0,441	1,074	0,547	954	0,894
CNCONHGlu	$\lambda_f \text{ max}$	536	546	558	562	568	573
	Φ_f	0,031	0,167	0,129	0,157	0,749	0,063
CNCONHGluAc	$\lambda_f \text{ max}$	534	542	559	560	569	574
	Φ_f	0,298	0,472	0,05	0,07	0,943	0,04
(1)-CONHGlu	$\lambda_f \text{ max}$	458	466	471	475	487	492
	Φ_f	0,002	0,0025	0,0020	0,0018	0,076	0,0012
(2)-CONHGlu	$\lambda_f \text{ max}$	540	556	575	581	589	592
	Φ_f	0,005	0,018	0,033	0,033	0,344	0,015

Tableau (III.6).2

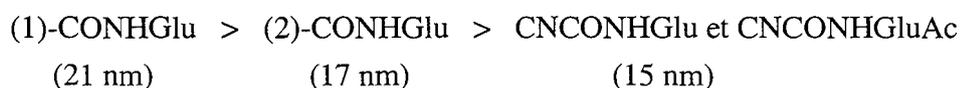
Caractéristiques d'émission de fluorescence des rotors moléculaires glucidiques, dans divers solvants de polarité croissante, à 25°C
($E_T(30)$ en kcal/mol ; η en mPa.s ; $\lambda_f \text{ max}$ en nm).

Les rotors moléculaires fluorescents des types "benzylidène", (1)-CONHGlu, et "cinnamylidène", (2)-CONHGlu, qui ne présentent qu'une seule bande d'émission de fluorescence, ont des domaines d'excitation et d'émission de fluorescence qui se déplacent vers le rouge lorsque le nombre de doubles liaisons augmente.

Les rotors CNCONHGlu et CNCONHGluAc ont des longueurs d'onde d'émission proches de celles du rotor (2)-CONHGlu, mais le déplacement bathochrome est moins important que dans le cas du dérivé cinnamylidène. Ainsi on note une augmentation de 50 nm dans le cas du dérivé cinnamylidène, pour 40 nm dans le cas du dérivé coumarine, lorsque l'on passe du toluène à l'eau.

Enfin, on relève une différence notable entre les rendements quantiques de fluorescence des quatre composés : les rotors coumarine ont des rendements élevés dans la plupart des solvants considérés. La présence de deux doubles liaisons, pour le rotor (2)-CONHGlu, entraîne une augmentation des rendements quantiques de fluorescence, pour un même milieu, par comparaison au rotor (1)-CONHGlu qui ne possède qu'une seule double liaison.

Il est également intéressant de comparer les variations de $\lambda_{f \max}$ avec la polarité exprimée par le paramètre $E_T(30)$ pour chaque type de structure. Si l'on compare ces valeurs dans le cas de deux solvants protiques, mais de polarités différentes (éthanol et eau) l'ordre est le suivant :



Cet ordre peut être expliqué si on considère la structure chimique des différents rotors : ils possèdent le même groupe amido-D-glucosamine et un groupement 4-(N,N-dialkylamino)phényle similaire. Les rotors coumarine diffèrent des deux autres composés par la présence de l'hétérocycle tandis que les rotors (1)-CONHGlu et (2)-CONHGlu se différencient par le nombre de doubles liaisons. On peut donc supposer que la longueur de la conjugaison entre le groupement électrodonneur et le groupement électroaccepteur est à l'origine de cette différence d'influence de la polarité du solvant.

III.7. CONCLUSION

L'étude photophysique réalisée avait pour but de déterminer les principales caractéristiques photophysiques des nouveaux rotors synthétisés.

Nous étions partis avec l'idée d'obtenir des sondes fluorescentes d'intérêt biologique pour des applications de marquage de cellules vivantes, mais également pour des observations par microscopie optique en champ proche. Afin de disposer d'un traceur répondant à ces deux conditions, nous nous étions fixés de synthétiser *un nouveau rotor moléculaire fluorescent*, dont les longueurs d'onde d'absorption, dans des milieux rigides, seraient voisines de 490 nm.

Au vu des résultats, cette condition a été remplie et cette analyse des propriétés photophysiques est donc un point de départ pour diverses études dans des milieux de compositions variées.

En ce qui concerne les effets de solvant, la variation de longueur d'onde au maximum d'émission de fluorescence permet de mettre en évidence une modification de l'environnement en terme de polarité. Pour l'aspect viscosité, si les augmentations de l'efficacité de l'émission de fluorescence rendent bien compte de l'accroissement de la rigidité de l'environnement local du traceur, il n'est pas pour autant si facile de déterminer de manière absolue les valeurs de viscosité locale, et ce pour au moins deux raisons :

- la première est due au fait que la plupart du temps, il faut connaître avec exactitude la concentration de la sonde pour pouvoir effectuer des mesures de rendements quantiques de fluorescence,
- et la deuxième se réfère aux résultats liés à l'influence de la viscosité ; ces études ont souligné l'existence de deux domaines de viscosité et conduisent à des observations qui diffèrent selon les milieux de référence choisis.

Les phénomènes observés, tant du point de vue polarité que viscosité, peuvent être interprétés en terme d'encombrement soluté-solvant. En effet, les deux groupements éthyle portés par l'atome d'azote, perturbent certainement la cage du solvant et empêchent le processus de relaxation des molécules de solvant. Par contre, dans l'eau, la déviation du maximum d'émission peut être interprétée en fonction de la taille de la molécule de solvant, si petite qu'elle peut adapter sa structure plus facilement autour de la sonde [Coosemans, 1979].

L'étude des déclins de fluorescence des différentes coumarines a mis en évidence deux durées de vie, caractérisant probablement l'existence d'un conformère de nos molécules, à l'état excité. L'écart entre les valeurs de durées de vie selon que l'on considère des solvants aprotiques ou protiques montre que la désactivation non radiative est intimement liée à la structure moléculaire des dérivés 7-aminocoumarine.

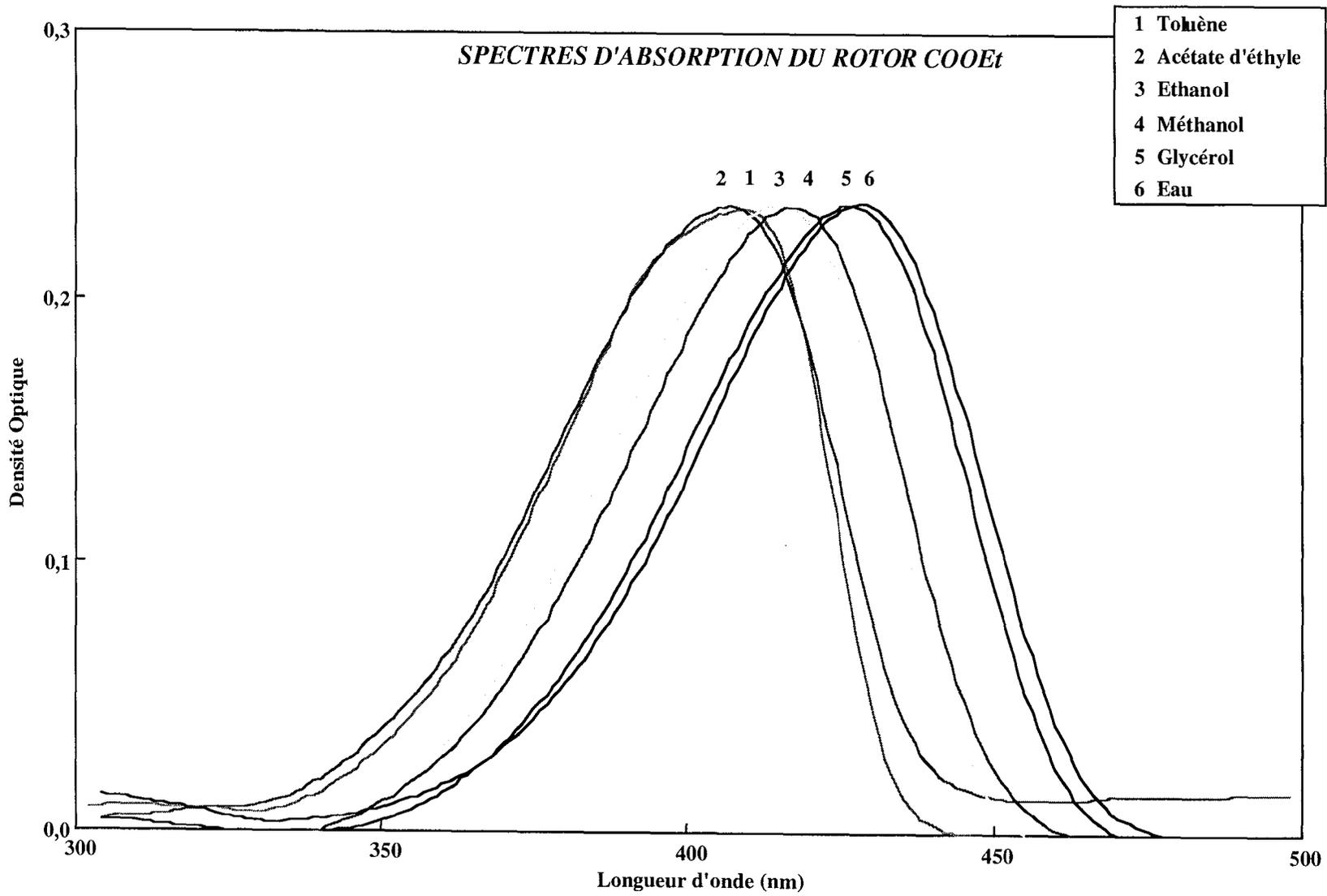
Plusieurs hypothèses sont évoquées dans la littérature, pour expliquer l'évolution du rendement quantique et de la durée de vie de fluorescence des différentes coumarines en fonction du solvant. Certaines observations expérimentales sont en faveur de l'existence d'un état TICT, d'autres sont en faveur du modèle ULM. Les grands déplacements de Stokes, les faibles rendements quantiques et durées de vie de fluorescence dans des solvants dont la polarité est grande sont autant d'éléments caractérisant la présence de tels états. Par ailleurs, en 1990 Yip et al. ont précisé le rôle des états singulets excités mis en jeu dans le processus de désactivation de l'état singulet excité S_1 de différentes 7-aminocoumarines.

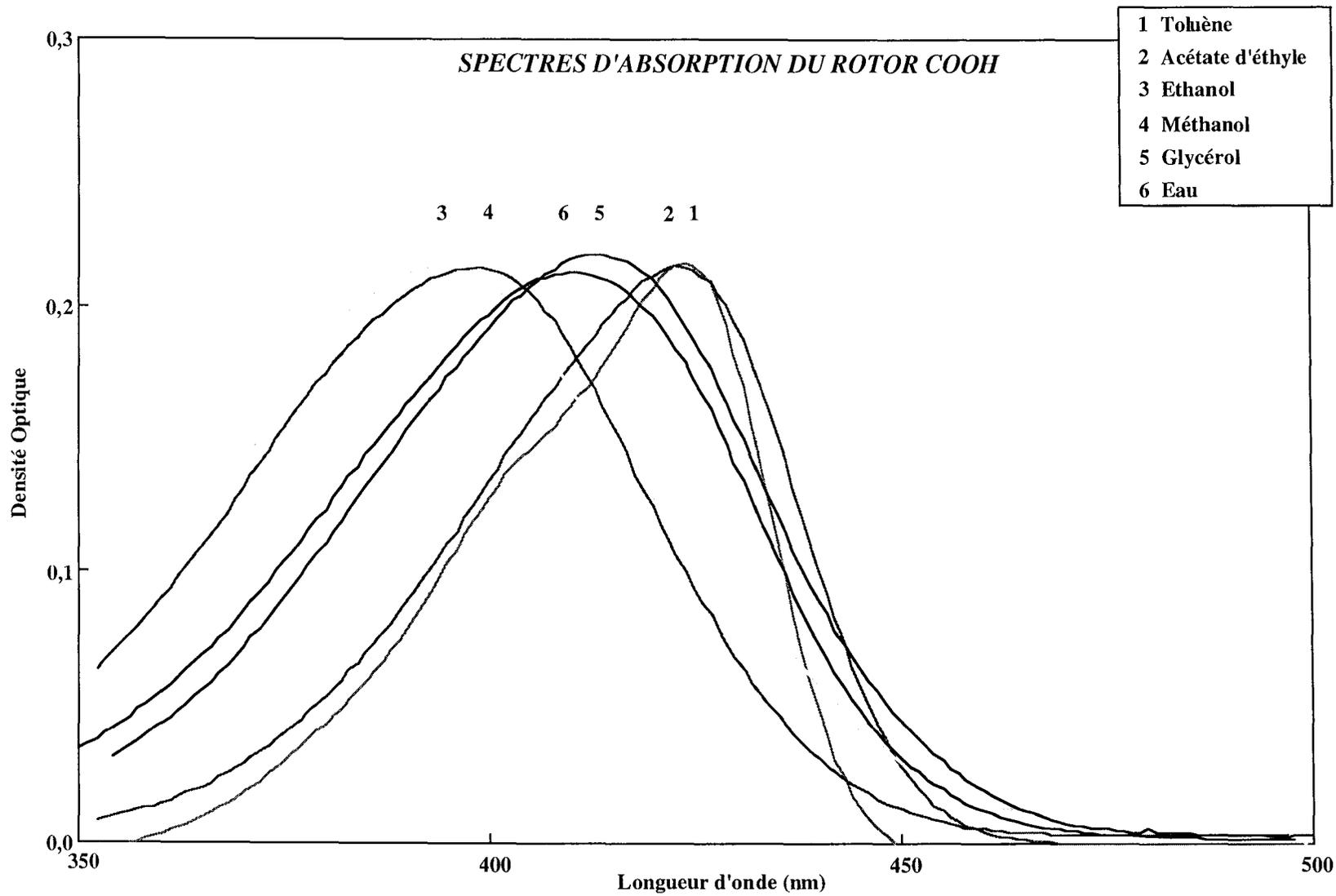
Néanmoins, si ces phénomènes restent encore difficilement expliquables, ils n'empêchent pas d'utiliser ces rotors moléculaires fluorescents comme sondes de cohésion et comme marqueurs fluorescents dans les applications qui seront décrites dans la suite de ce travail.

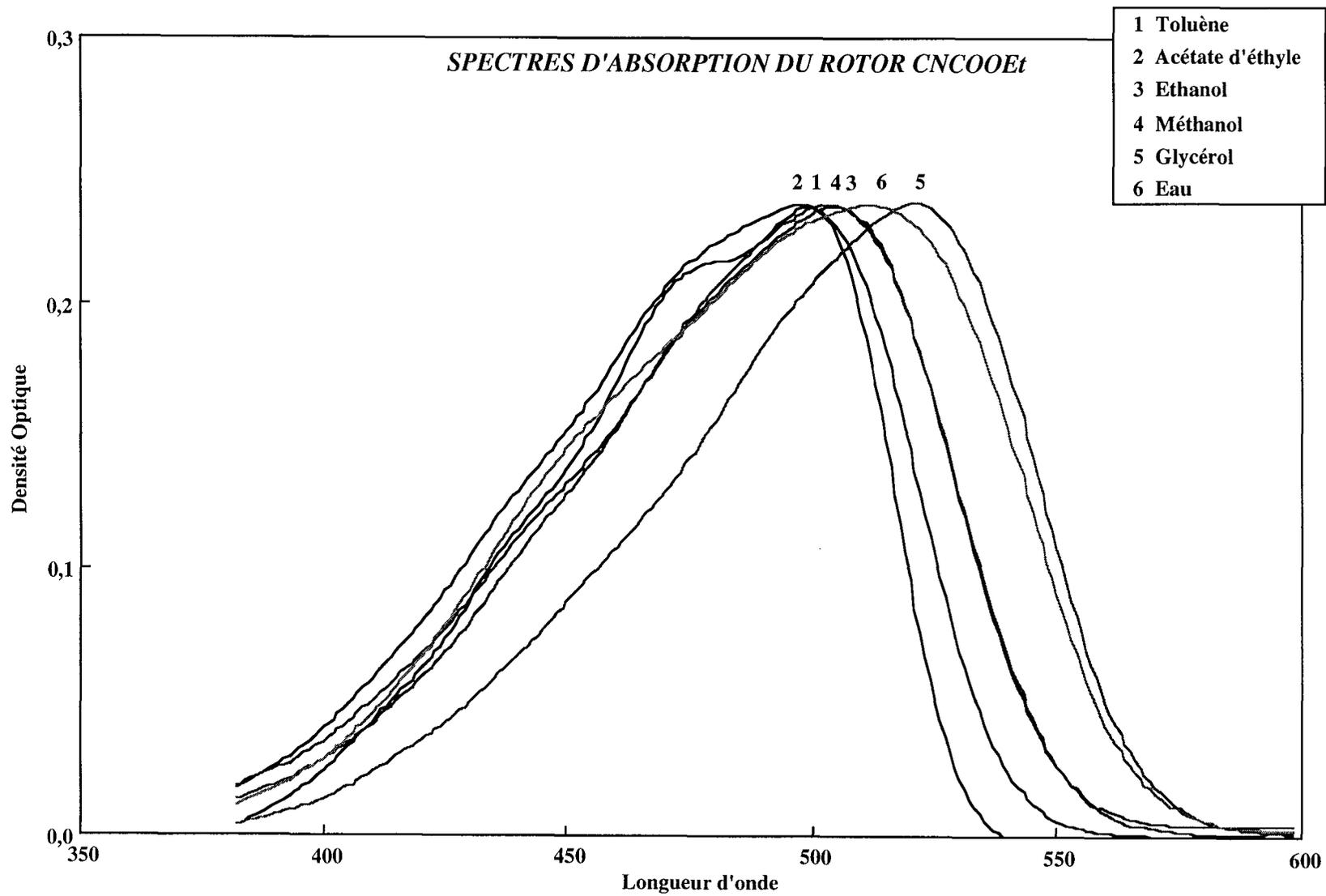
ANNEXES DU CHAPITRE III

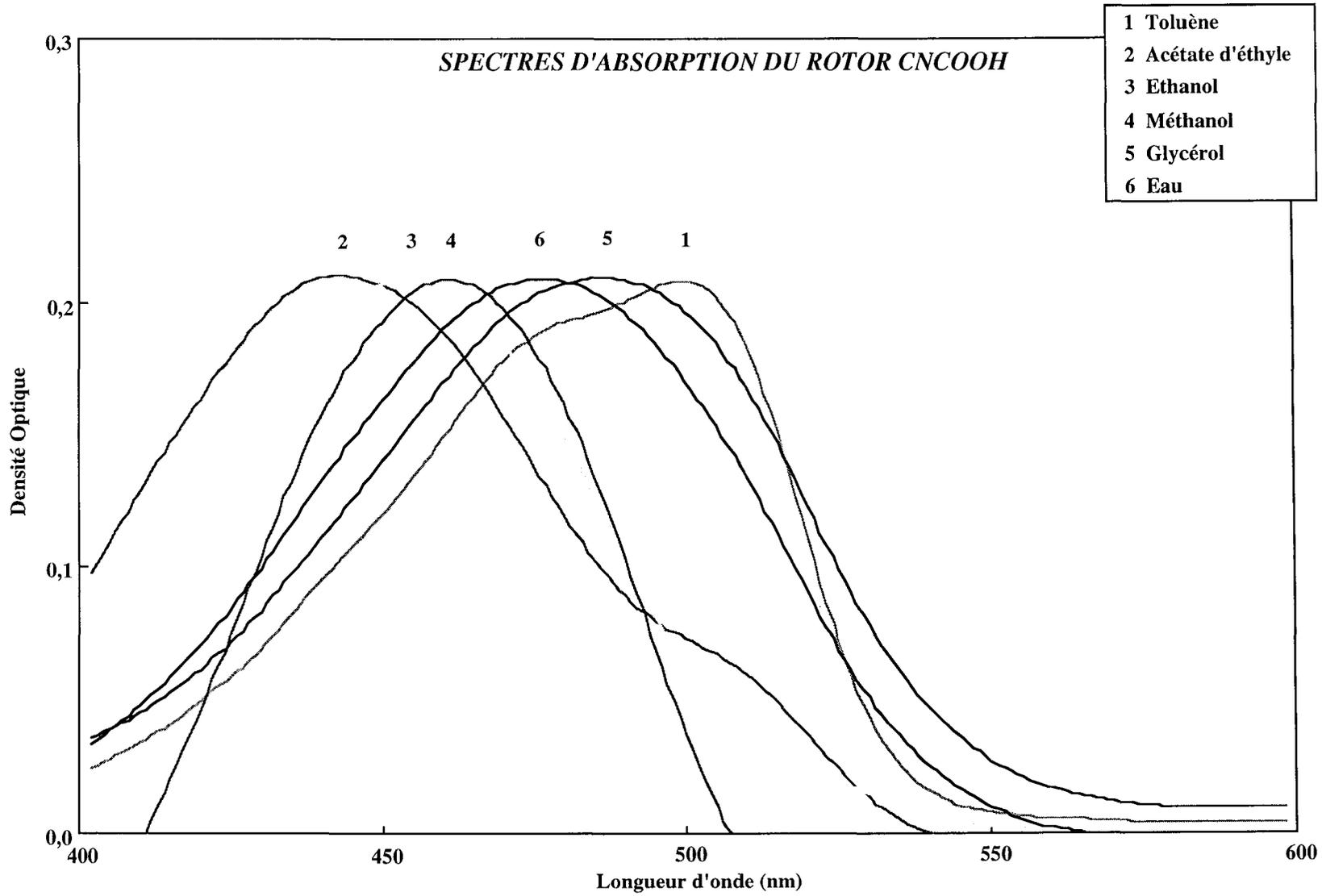
***Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des rotors coumarine
dans différents solvants***

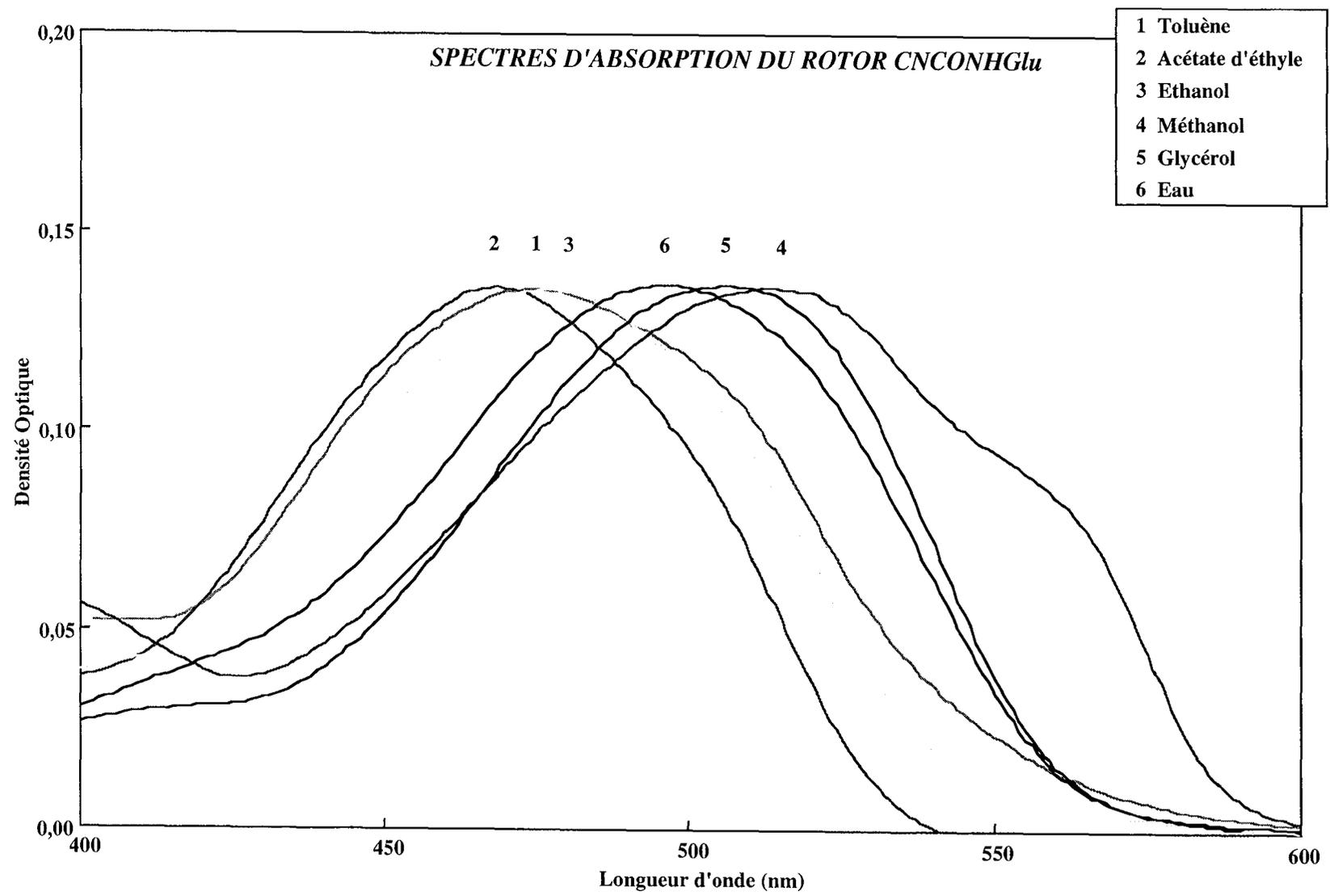
ANNEXE I :
Spectres d'absorption des rotors coumarine dans différents solvants

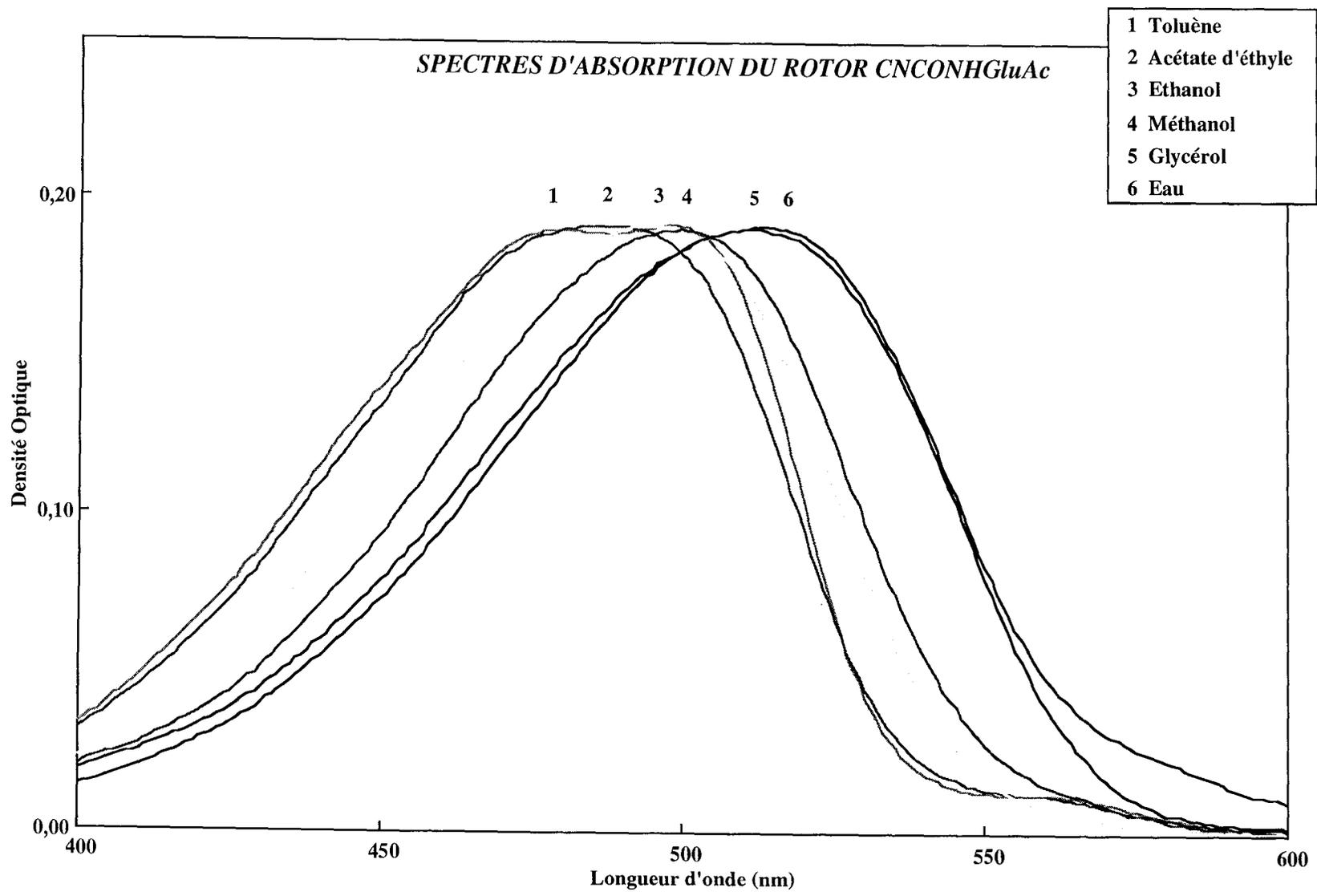






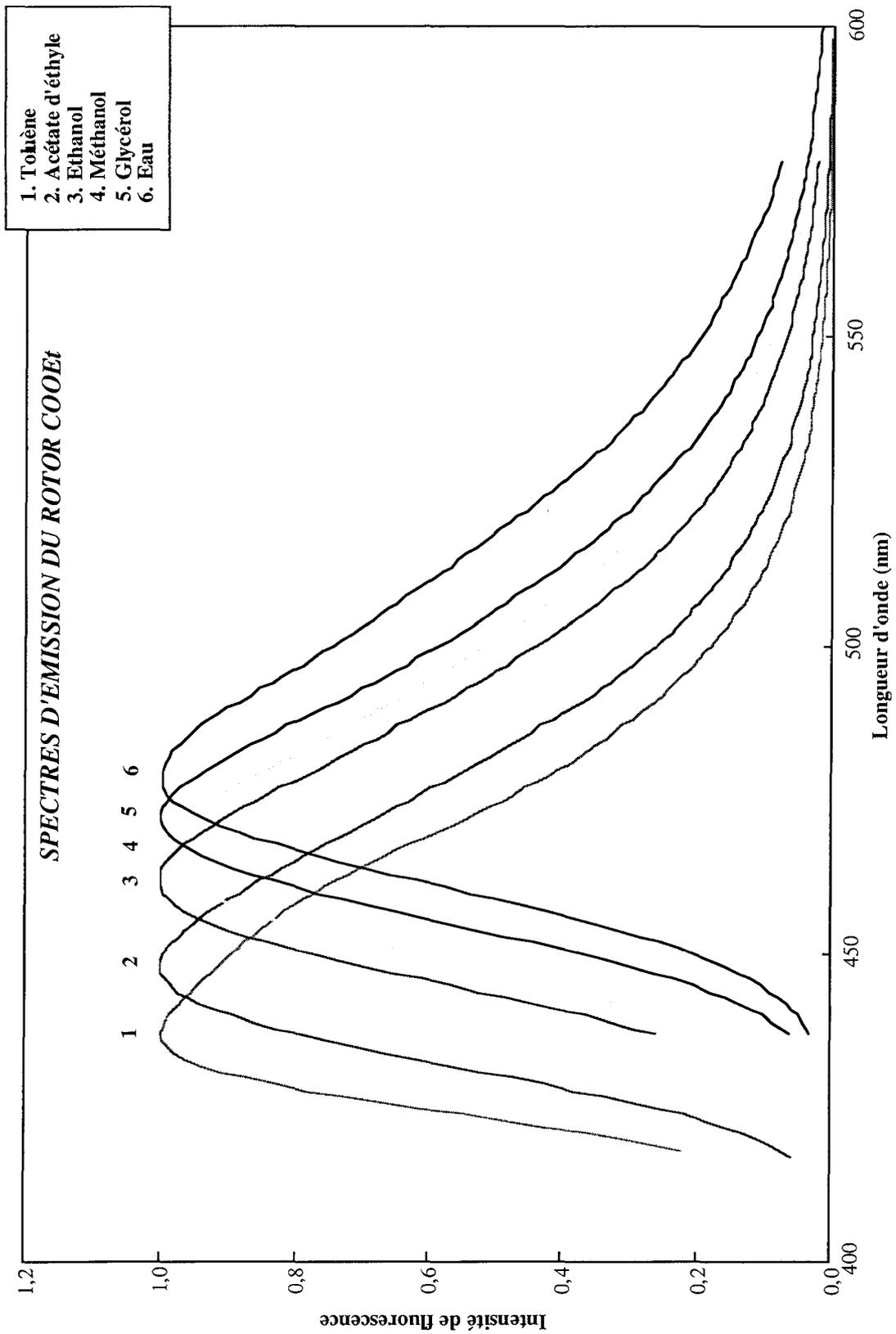


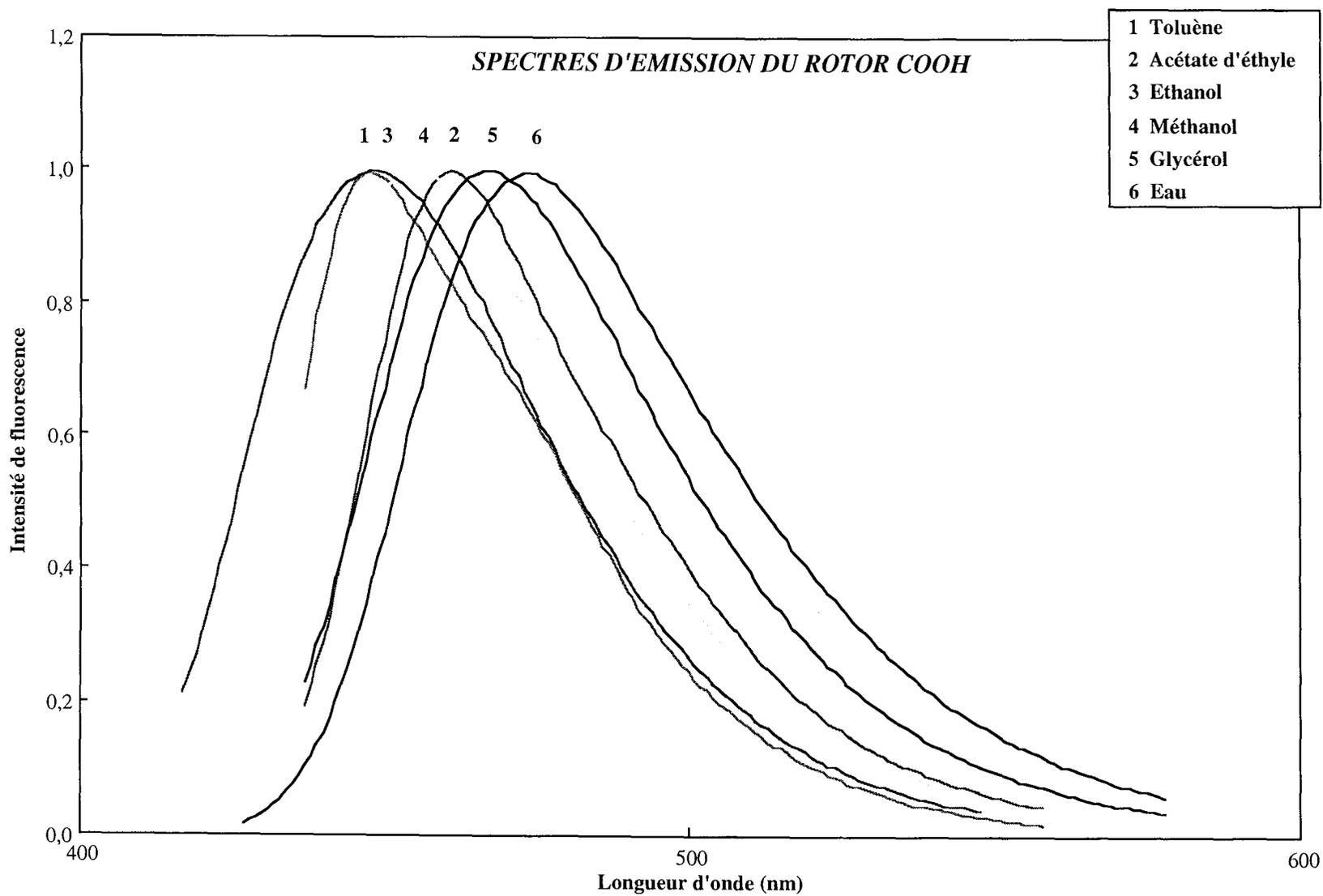


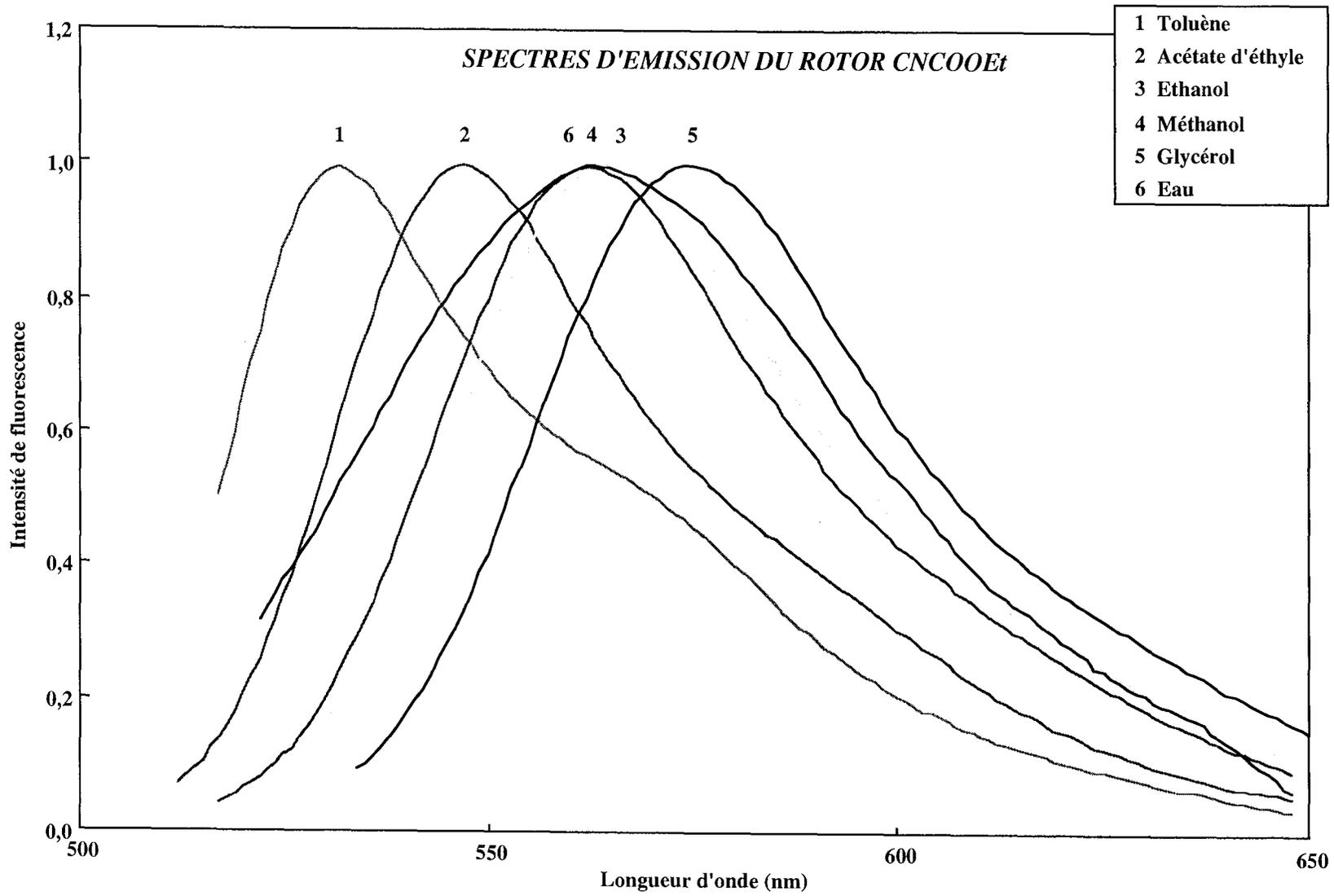


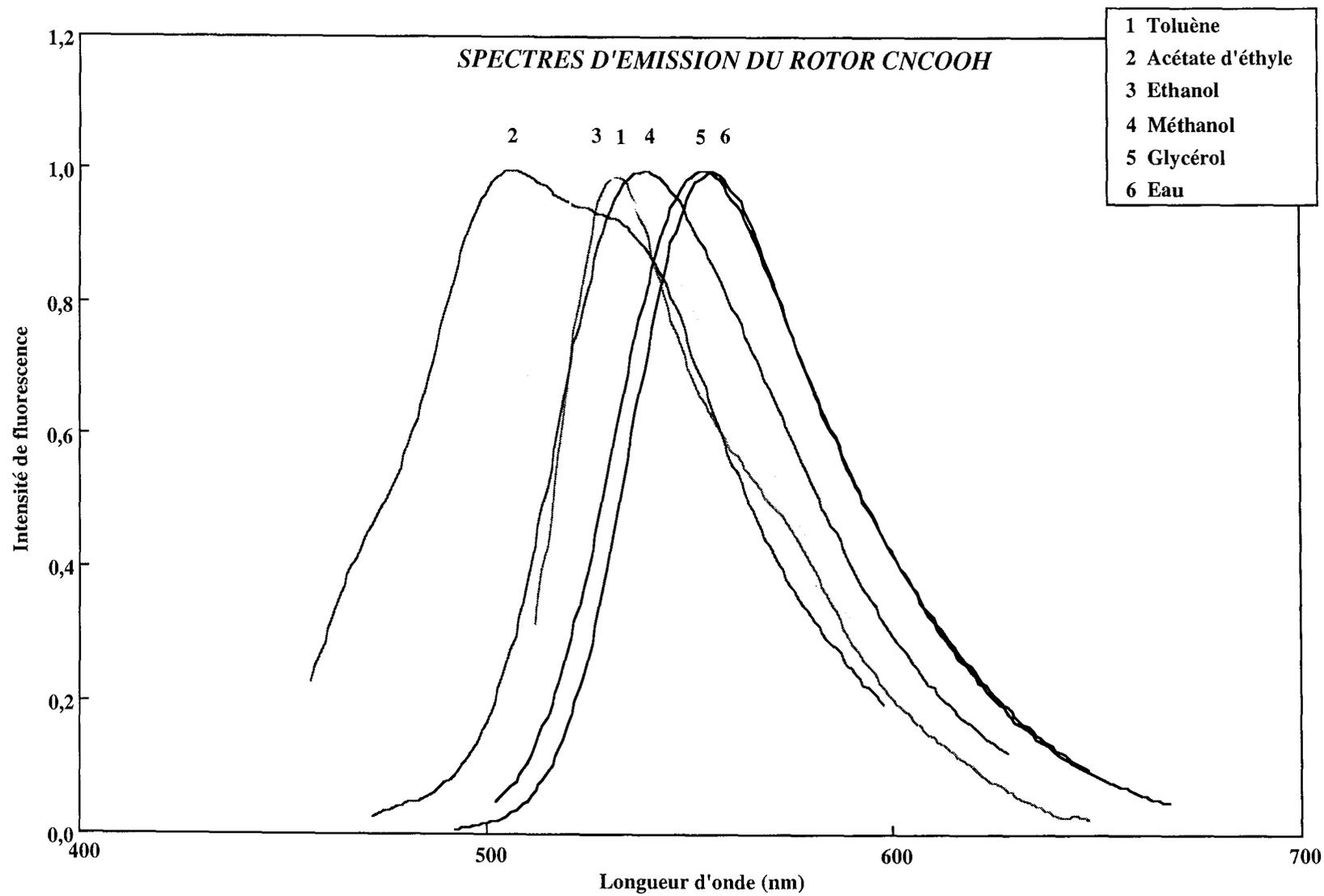
ANNEXE 2 :

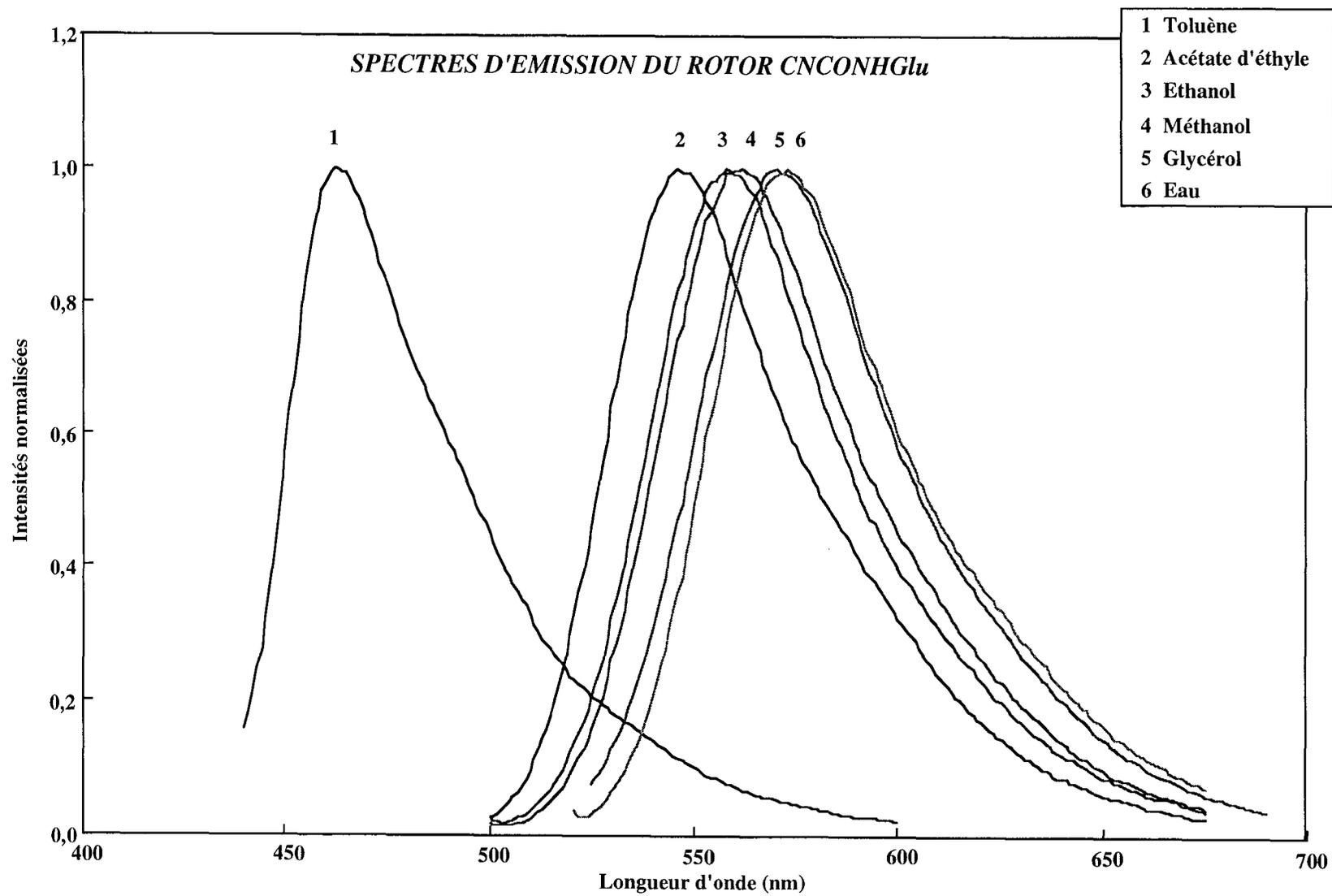
Spectres d'émission de fluorescence des rotors coumarine dans différents solvants (spectres normalisés)

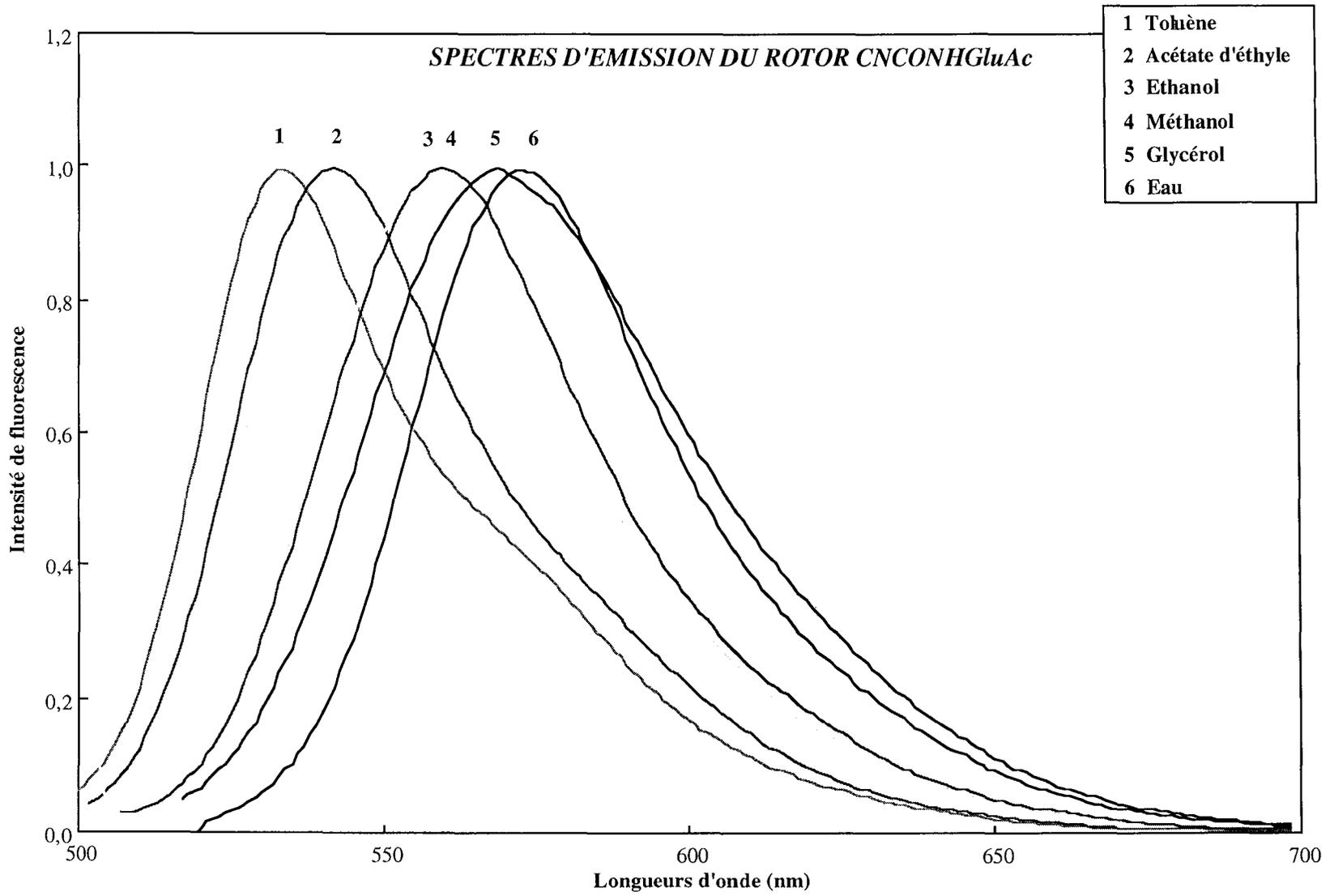












CHAPITRE IV

**APPLICATION DES SONDAS FLUORESCENTES
A DES MILIEUX BIOLOGIQUES**

IV.1. INTRODUCTION	131
IV.2. UTILISATION DES SONDES FLUORESCENTES POUR L'ETUDE DE SYSTEMES MOLECULAIRES ORGANISES DE TYPE LIPOSOMES	132
IV.2.1. STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES.....	132
<i>A/ Structure</i>	132
<i>B/ Dynamique des constituants de la membrane</i>	134
IV.2.2. RAPPELS SUR LES LIPOSOMES	136
<i>A/ Définition</i>	136
<i>B/ Classification</i>	137
<i>i/ Liposomes multilamellaires (MLV)</i>	137
<i>ii/ Liposomes unilamellaires de petite taille (SUV)</i>	137
<i>iii/ Liposomes unilamellaires de grande taille (LUV)</i>	138
<i>C/ Détection de la transition ordre-désordre</i>	138
IV.2.3. UTILISATION DE LA FLUORESCENCE POUR L'ETUDE DE MEMBRANES BIOLOGIQUES	139
<i>A/ Méthodes d'investigation par fluorescence</i>	139
<i>B/ Nature des traceurs et choix d'un marqueur</i>	140
IV.2.4. ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES DE LIPOSOMES DE DPPC A L'AIDE DE ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS	142
<i>A/ Présentation des différents rotors</i>	142
<i>B/ Matériels et méthodes</i>	143
<i>i/ Matériels</i>	143
i.1/ Produits.....	143
i.2/ Sondes fluorescentes.....	144
i.3/ Tampon phosphate (PBS), pH 7,4.....	145
<i>ii/ Méthodes</i>	145
ii.1/ Etude des microviscosités des membranes phospholipidiques	145
ii.2/ Préparation des liposomes	146
<i>C/ Résultats et discussion</i>	147
<i>i/ Cinétique d'incorporation des rotors dans des SUV de DPPC</i>	147
<i>ii/ Détermination de la température de transition de phase T_M dans des SUV de DPPC</i>	149
IV.2.5. CONCLUSION.....	152

IV.3. INCORPORATION DES SONDÉS FLUORESCENTES DANS DES CELLULES ENDOTHELIALES	153
IV.3.1. STRUCTURE ET RÔLE DES CELLULES ENDOTHELIALES	153
<i>A/ Structure d'une cellule eucaryote</i>	153
<i>B/ L'endothélium et les vaisseaux sanguins</i>	153
<i>C/ Les cellules endothéliales</i>	155
IV.3.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES POUR L'ÉTUDE IN VITRO D'UNE MONOCOUCHE DE CELLULES ENDOTHELIALES.....	156
<i>A/ Matériels</i>	156
<i>i/ Produits</i>	156
<i>ii/ Supports de cultures in vitro</i>	156
<i>iii/ Imagerie par microscopie optique 3D</i>	156
<i>B/ Méthodes</i>	157
<i>i/ Cultures cellulaires sur lamelles</i>	157
<i>ii/ Viabilité cellulaire</i>	158
IV.3.3. INCORPORATION DES SONDÉS FLUORESCENTES.....	158
<i>A/ Etude de différents rotors ayant un cycle fortement hydrophile</i>	158
<i>i/ Cas du rotor glucidique cinnamylidène</i>	158
<i>ii/ Cas du rotor inositol cinnamylidène</i>	159
<i>iii/ Cas du rotor glucidique coumarine</i>	160
<i>B/ Etude de différents rotors ayant un cycle glucosamine tétra O-acétylée</i>	160
<i>i/ Cas du rotor glucidique cinnamylidène acétylé</i>	160
<i>ii/ Cas du rotor glucidique coumarine acétylé</i>	161
<i>C/ Etude détaillée du rotor glucidique coumarine acétylé : CNCONHGluAc</i>	162
<i>i/ Influence de la concentration en sonde</i>	162
<i>ii/ Stabilité au cours du temps</i>	163
<i>iii/ Localisation du traceur fluorescent</i>	163
<i>iii.1/ Contrôle d'un marquage membranaire</i>	164
<i>iii.2/ Contrôle d'un marquage protéique</i>	165
<i>iii.3/ Contrôle d'un marquage mitochondrial</i>	166
<i>iii.4/ Contrôle d'un marquage réticulaire</i>	167
<i>D/ Etude du rotor coumarine ester : CNCOOEt</i>	167
<i>E/ Tests de toxicité</i>	168
IV.3.4. CONCLUSION	170
IV.4. CONCLUSION	171
ANNEXE	173

IV.1. INTRODUCTION

Une part important de notre travail a été d'étudier les propriétés photophysiques des rotors moléculaires fluorescents nouvellement synthétisés, en fonction de leur environnement immédiat. La suite de ce travail va consister à suivre la localisation et l'évolution de ces traceurs dans des systèmes biologiques simples ou complexes tels que les cellules endothéliales.

Au préalable, nous avons d'abord voulu montrer leur intérêt pour l'étude de systèmes moléculaires organisés de type liposomes, en ce sens que ces systèmes représentent des modèles de milieux biologiques. De plus, ces travaux complètent des résultats précédemment acquis au GRAPP [Adibnejad, 1996 ; Berroy, 1997 ; Jungen, 1996].

Dans un deuxième temps, et dans le cadre de recherches se situant à l'interface physique-chimie-biologie et en relation avec nos partenaires de la Faculté de Médecine*, nous avons étudié l'incorporation et la localisation de ces traceurs à l'intérieur de cellules vivantes par diverses techniques de microscopie, et notamment une technique très récente de microscopie 3D. Pour comparer l'influence de la structure de base du rotor sur les phénomènes d'incorporation, nous avons également testé d'autres types de sondes synthétisées au GRAPP [Adibnejad, 1996 ; Berroy, 1997].

Dans l'objectif d'exploiter les différentes possibilités offertes par les rotors moléculaires fluorescents qui traduisent des effets de polarité et de viscosité, nous avons entrepris de caractériser le comportement de ces nouvelles sondes au sein de divers milieux biologiques.

* Laboratoire d'Angiohématologie - Hémorhéologie, LEMTA - UMR 7563 CNRS-INPL-UHP, Faculté de Médecine, Pr. J.F. STOLTZ

IV.2. UTILISATION DES SONDES FLUORESCENTES POUR L'ETUDE DE SYSTEMES MOLECULAIRES ORGANISES DE TYPE LIPOSOMES

IV.2.1. STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

A/ Structure

Les membranes biologiques sont des structures omniprésentes, délimitant les cellules et les organites intracellulaires (mitochondries, noyau, chloroplastes, lysosomes, etc.). Le rôle premier de ces membranes est de permettre des compartimentations. C'est ainsi que la membrane cytoplasmique, qui sépare les milieux intracellulaire et extracellulaire, permet le maintien de compositions différentes entre le cytosol et le milieu externe.

La fonction de compartimentation est dévolue aux lipides membranaires, l'un des deux constituants principaux des membranes. Ces lipides, sont des molécules amphiphiles qui possèdent des parties polaire et apolaire distinctes. Il existe différentes classes de lipides membranaires, dont les formules sont répertoriées dans le tableau (IV.2).1.

En milieu aqueux, les lipides s'organisent le plus souvent en bicouche, partie apolaire au centre où l'eau n'a pas accès, partie polaire en contact avec le milieu aqueux de part et d'autre de la bicouche. La structure se referme sur elle-même, formant une vésicule close séparant un compartiment interne aqueux du milieu aqueux externe, ce qui est le propre d'une membrane biologique (figure (IV.2).1).

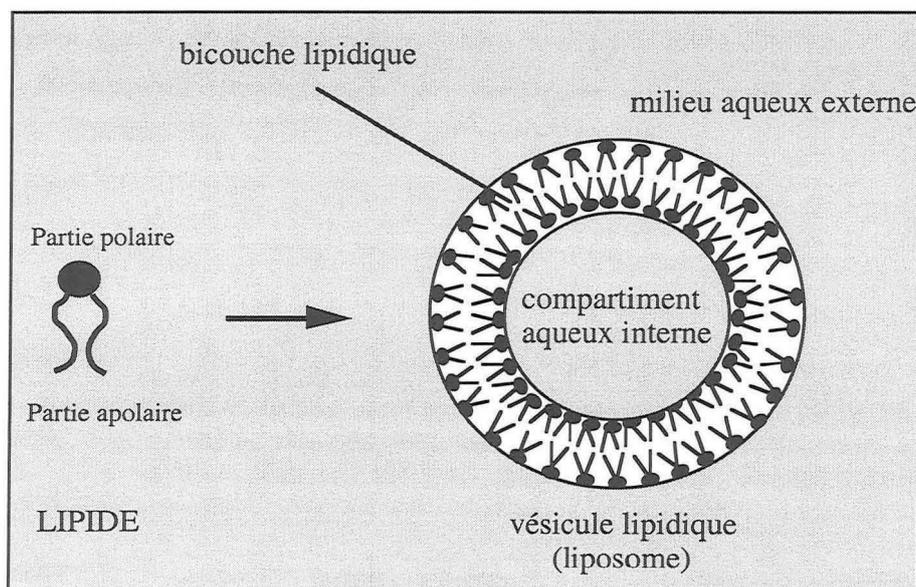


Figure (IV.2).1

Organisation des lipides en bicouche
formant une vésicule close délimitant un intérieur aqueux.

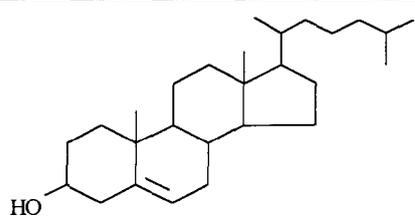
LIPIDES	NOM	FORMULE
Phosphoglycérides	Diacylphosphoglycéride	$ \begin{array}{c} \text{~~~~~CO-O-CH}_2 \\ \\ \text{~~~~~CO-O-CH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-O-P-O-X} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} $
	Plasmalogène	$ \begin{array}{c} \text{~~~~~O-CH}_2 \\ \\ \text{~~~~~CO-O-CH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-O-P-O-X} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} $
Diacylglycérides		$ \begin{array}{c} \text{~~~~~CO-O-CH}_2 \\ \\ \text{~~~~~CO-O-CH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-O-sucre} \end{array} $
Sphingolipides	Céramide	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CH=CH-CH(OH)-CH-CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{~~~~~CO-NH} \end{array} $
	Sphingophospholipide	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CH=CH-CH(OH)-CH-CH}_2\text{-O-P-O-X} \\ \\ \text{~~~~~CO-NH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} $
	Sphingoglycolipide	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CH=CH-CH(OH)-CH-CH}_2\text{-O-oligosaccharide} \\ \\ \text{~~~~~CO-NH} \end{array} $
Stérols	Cholestérol	

Tableau (IV.2).1

Formules générales des principaux lipides membranaires [Shechter, 1990].

Si une compartimentation est la condition *sine qua non* de l'existence d'une cellule ou d'un organe, il n'en demeure pas moins que ceux-ci ne sont pas des entités autonomes. Leur survie et leur fonctionnement nécessitent des échanges continuels de matière, d'énergie et d'informations, de part et d'autre de la membrane qui les délimite.

Ces échanges sont possibles grâce à la présence de protéines, seconds constituants majeurs des membranes. Les protéines membranaires se classent en deux catégories :

- les protéines extrinsèques en contact avec le milieu aqueux,
- les protéines intrinsèques qui sont des protéines parfois transmembranaires, dont la chaîne est accessible des deux côtés de la membrane. C'est cette classe de protéines qui permet le transport de matière, les couplages énergétiques et le transfert d'informations.

Les interactions lipide-lipide et lipide-protéine sont de nature hydrophobe au centre de la membrane et polaire aux interfaces. Elles se font et se défont continuellement. De ce fait la membrane a un caractère dynamique, les lipides et les protéines étant animés de mouvements divers, conférant à la membrane une certaine fluidité [Shechter, 1990].

B/ Dynamique des constituants de la membrane

Les différents constituants d'une membrane biologique, s'ils sont confinés dans un espace défini par la membrane, n'en sont pas moins animés de mouvements divers (figure (IV.2).2).

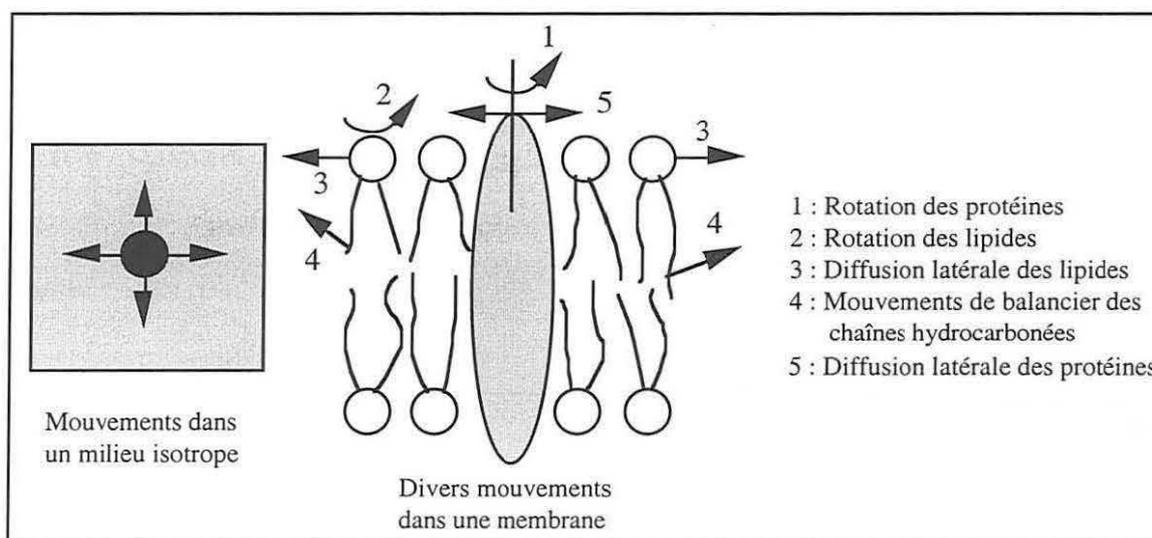


Figure (IV.2).2

Les divers mouvements des constituants membranaires [Shechter, 1990].

Les mouvements des lipides sont soit locaux (à l'échelle moléculaire), soit globaux (déplacements de l'ensemble de la molécule lipidique dans la membrane). Les mouvements locaux sont des rotations de la molécule ou des oscillations des chaînes hydrocarbonées, qui traduisent une viscosité locale liée à l'ordre moléculaire au sein de la membrane. Les mouvements de déplacement sont :

- soit des passages des molécules d'une face à l'autre de la bicouche (diffusion transversale ou "flip flop"),
- soit des déplacements latéraux (diffusion latérale).

Ce dernier phénomène traduit en grande partie la notion de fluidité membranaire [André, 1983 ; Leterrier, 1989]. Les notions de viscosité locale et de fluidité, qui peuvent être mises en évidence par des marqueurs de fluorescence, sont à relier à des mécanismes biologiques.

Les protéines sont animées de mouvements correspondant à des diffusions latérales et rotationnelles. Ces mouvements confèrent donc à la membrane une certaine fluidité. Dans des conditions normales, la fluidité des membranes correspondrait à une viscosité de l'ordre de 10^{-1} N.s.m⁻² (celle de l'eau est de 10^{-3} N.s.m⁻²). Une membrane est donc cent fois moins fluide que l'eau, ceci étant, la fluidité d'une membrane dépend de la température et augmente avec celle-ci.

Dans le cas de biomembranes entièrement composées de lipides, à température suffisamment basse, dans des conditions où l'agitation thermique est faible, toutes les chaînes des lipides membranaires ont une configuration tout-trans. Dans une organisation en bicouche lipidique, les chaînes sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum. On parle d'une conformation ordonnée des chaînes. L'orientation des chaînes peut être soit perpendiculaire au plan de la bicouche (conformation 1), soit inclinée par rapport à ce plan (conformation 2) (figure (IV.2).3).

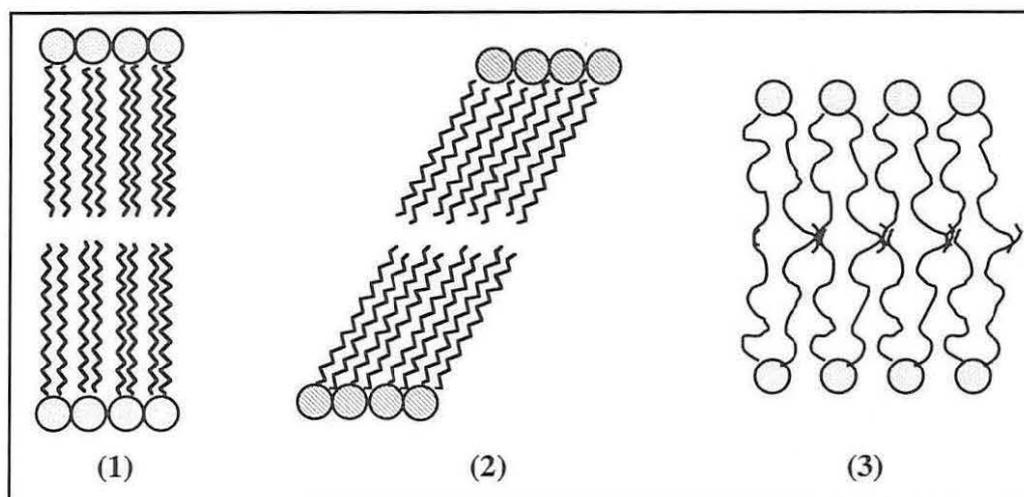


Figure (IV.2).3

Les différentes conformations des chaînes hydrocarbonées des lipides dans une bicouche [Shechter, 1990].

Une élévation de température entraîne une mobilité accrue autour des liaisons C-C. Au-delà d'une température donnée on observe une transition, les chaînes passant d'une conformation ordonnée à une conformation désordonnée (conformation 3). Dans cette conformation, les chaînes oscillent autour d'une orientation moyenne perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus étirées au maximum ; en conséquence, par rapport à une situation où la conformation est de type (1), l'épaisseur de la double couche lipidique diminue. Le contact entre les chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Au cours de la transition, il y a une expansion latérale des lipides dans la membrane et la surface occupée à l'interface est plus importante.

IV.2.2. RAPPELS SUR LES LIPOSOMES

A/ Définition

Les liposomes, qui résultent de l'auto-assemblage de phospholipides, correspondent à une structure dispersée dans l'eau de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée pour l'essentiel par une double couche de molécules de phospholipides et par une cavité centrale contenant une phase aqueuse (figure (IV.2).4).

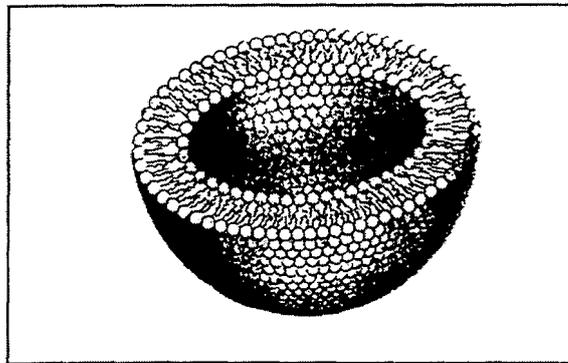


Figure (IV.2).4

Architecture moléculaire d'un liposome [Bretscher, 1985].

Les liposomes peuvent ainsi contenir et véhiculer des substances actives, aussi bien lipophiles (solubilisées dans la bicouche) qu'hydrophiles (contenues dans le cœur aqueux) [Lasic, 1989 ; Machy, 1987].

Ces possibilités ont fait naître dans le milieu de la recherche un grand intérêt vis-à-vis des liposomes ; [Lasic, 1998] et surtout de leurs éventuelles applications dans des domaines aussi variés que l'industrie pharmaceutique pour laquelle la principale utilisation est la vectorisation de principes actifs [Maurer, 1998 ; Zeisig, 1998 ; Gabizon, 1998] qui permet la modification de la biodisponibilité et le ciblage des médicaments, la catalyse de réactions enzymatiques ou chimiques, la médecine avec les possibilités offertes par l'encapsulation d'agents de diagnostics ou encore le génie génétique pour lequel les liposomes sont de bons candidats pour le transfert de gènes sans oublier l'industrie cosmétique qui a provoqué leur introduction au niveau du grand public [Gabrijelcic, 1990 ; Puisieux, 1985 ; Shew, 1985].

Les liposomes ont fait aussi l'objet d'un très grand nombre d'études, car ils ont servi de modèle pour l'étude de la structure membranaire, de sa perméabilité et des interactions lipides-drogues.

B/ Classification

Les liposomes peuvent être classés selon leur nature en trois types :

i/ Liposomes multilamellaires (MLV)

Les liposomes multilamellaires (MLV pour "multilamellar vesicles") sont caractérisés par la présence de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, séparées les unes des autres par des couches aqueuses (figure (IV.2).5). Ils sont obtenus simplement par addition des phospholipides à l'eau et par agitation au-dessus de leur température de transition. Leur diamètre varie de 400 à 3 500 nm suivant le nombre de bicouches [Shechter, 1990].

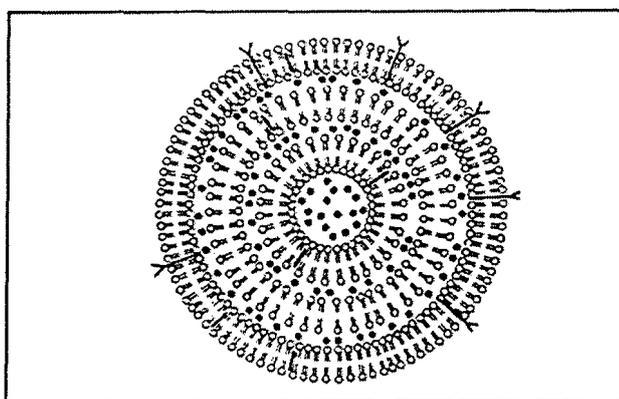


Figure (IV.2).5

Schéma représentatif d'un liposome multilamellaire.

ii/ Liposomes unilamellaires de petite taille (SUV)

Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV pour "small unilamellar vesicles"), correspondent à la structure de la figure (IV.2).6.

Ils sont constitués d'une seule bicouche lipidique dont le diamètre varie de 25 à 50 nm, et sont obtenus à partir des liposomes multilamellaires par divers traitements (ultrasons, méthode au cholate, etc.) [Shechter, 1990].

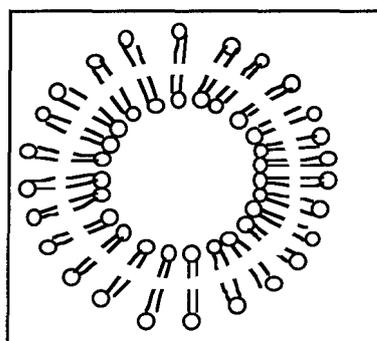


Figure (IV.2).6

Schéma représentatif d'un liposome unilamellaire.

iii/ *Liposomes unilamellaires de grande taille (LUV)*

Ils correspondent à des vésicules unilamellaires de grande taille (LUV pour "large unilamellar vesicles"), qui contiennent un seul compartiment aqueux de grande taille et de diamètre variant de 200 à 1 000 nm. Ils sont obtenus par diverses méthodes (méthode à l'éther, à l'alcool, fusion par le calcium, etc.) [Shechter, 1990].

Dans tous les cas énoncés, les liposomes n'apparaissent que si la proportion d'eau est importante et que si la température est suffisante pour que les chaînes d'acides gras du phospholipide soient à l'état liquide. Les vésicules de phospholipides sont donc préparées à des températures supérieures à la température de transition de phases, température à laquelle la perméabilité des systèmes bicouches augmente.

C/ Détection de la transition ordre-désordre

L'état physique de la bicouche phospholipidique représente une importante propriété des liposomes. Pour une température spécifique, température de transition T_M , le phospholipide subit un changement d'état où l'on observe le passage de l'état de gel (aspect rigide ordonné) à l'état de cristal-liquide (aspect fluide désordonné). Cette transition correspond essentiellement à la fusion des chaînes aliphatiques des acides gras qui sont ordonnées en conformations totalement trans dans la phase gel ($T < T_M$) et qui deviennent désordonnées avec des conformations gauches dans la phase cristal liquide ($T > T_M$) [Shechter, 1990].

La température de transition T_M est caractéristique d'un phospholipide donné ; elle varie avec la longueur et le taux d'insaturations des chaînes, la nature et la charge des groupes polaires à l'interface, les conditions d'environnement : pH, force ionique, pression et interactions avec d'autres molécules (autres phospholipides, protéines, médicaments, anesthésiques, etc.).

La figure (IV.2).7 donne une représentation schématique des deux états principaux d'une bicouche de phospholipides.

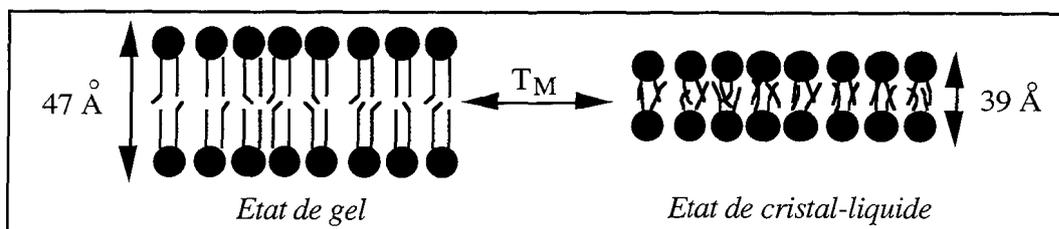


Figure (IV.2).7

Représentation de la transition de phases gel/cristal-liquide dans des liposomes (les grandeurs indiquées correspondent au DPPC).

Il faut ajouter que certains lipides purs, organisés en liposomes multilamellaires, présentent une phase de pré-transition (à une température $T_P < T_M$) qui précède la transition principale, résultant de la fusion des seules chaînes hydrocarbonées, les groupements polaires restant rigidement organisés [Dufour, 1981 ; Huang, 1982].

IV.2.3. UTILISATION DE LA FLUORESCENCE POUR L'ETUDE DE MEMBRANES BIOLOGIQUES

Le passage de la conformation tout-trans à la conformation désordonnée correspond à une transition conformationnelle. Dans le cas d'une suspension d'un lipide pur en solution aqueuse, cette transition dépend de la nature de la partie polaire, et pour un lipide donné, de la nature des chaînes hydrocarbonées. Il existe un parallélisme entre température de fusion des acides gras formant les chaînes hydrocarbonées des lipides et température de transition de ces lipides.

Nous avons mentionné que le passage de l'état ordonné à l'état désordonné s'accompagnait d'une expansion latérale des lipides. D'une manière générale, tout ce qui s'oppose à cette expansion s'oppose à cette transition et celle-ci se fera à une température d'autant plus élevée. Les interactions hydrophobes qui s'opposent à l'expansion augmentent avec la longueur des chaînes : en conséquence, les températures de transition des lipides seront d'autant plus élevées que les chaînes seront longues.

Les méthodes spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la résonance paramagnétique électronique (RPE), la diffraction des rayons X ainsi que la fluorescence, sont d'un intérêt majeur dans l'étude des membranes et particulièrement dans l'approche de l'organisation et de la dynamique des constituants membranaires [Shechter, 1990].

Ces différentes techniques spectroscopiques et notamment la fluorescence nécessitent souvent l'utilisation de traceurs moléculaires, qui peuvent s'incorporer dans le système membranaire et qui permettent de détecter les variations structurales et dynamiques de cet environnement.

L'étude de ces variations est intéressante pour comprendre plusieurs propriétés physico-chimiques des membranes qui peuvent être corrélées à des fonctions biologiques. Ainsi, la fluidité membranaire a une influence sur la perméabilité et donc sur tous les phénomènes de transport passif. Elle a également une incidence sur l'efficacité de fonctionnement de nombreux enzymes et transporteurs membranaires.

A/ Méthodes d'investigation par fluorescence

Les différentes méthodes utilisant la fluorescence s'appuient sur les phénomènes fondamentaux liés aux états électroniques excités. Chacune de ces méthodes a été adaptée à l'observation d'une propriété ou d'un type d'interaction au niveau de la bicouche membranaire. Un certain nombre de sondes fluorescentes extrinsèques sont utilisées pour l'étude des bicouches lipidiques, chacune d'entre elles reflétant une partie différente du système organisé.

Cette diversité permet d'obtenir un maximum d'informations sur les phénomènes mis en jeu.

Selon le traceur utilisé, on étudiera [Leterrier, 1989] :

- un phénomène de diffusion rotationnelle (polarisation de fluorescence avec le DPH par exemple),
- un phénomène de diffusion latérale sur quelques dizaines d'angströms (excimères inter- ou intramoléculaires avec le pyrène ou les dipyrénylalcane respectivement) ou de l'ordre du micromètre (photoblanchiment),
- une variation des caractéristiques spectroscopiques d'une molécule fluorescente qui est sensible à l'encombrement de son environnement, à la viscosité et à la polarité du milieu (rotor moléculaire fluorescent).

B/ Nature des traceurs et choix d'un marqueur

Les différentes techniques citées se basent sur l'utilisation de marqueurs fluorescents qui sont soit intrinsèques, et donc naturellement présents dans le milieu biologique, tels que les résidus tryptophane des protéines ou le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), soit extrinsèques, et il s'agit alors de traceurs moléculaires qu'il faut introduire dans le milieu à étudier. Dans ce cas, l'orientation et la localisation du fluorophore sont d'une grande importance pour l'interprétation des observations expérimentales. La distribution du fluorophore dans les organisations lipidiques peut être en partie prévisible à partir de sa structure (figure (IV.2).8).

Les traceurs utilisés dans l'investigation des membranes sont soit hydrophobes, soit amphiphiles. Pour l'élaboration de nouveaux traceurs fluorescents, on cherche à copier les modèles cellulaires : c'est ainsi que les traceurs au départ hydrophiles ont été greffés sur des acides gras, puis associés à des phospholipides.

Des traceurs hydrophobes ont été employés dans un premier temps et sont en particulier :

- le pyrène qui est un composé fortement hydrophobe. Le spectre d'émission du monomère traduit la polarité de l'environnement. Il forme des excimères intermoléculaires (même à de faibles concentrations, car sa durée de vie de fluorescence est relativement élevée : > 100 ns) qui caractérisent la viscosité du milieu,
- le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), également non polaire, et qui est le dérivé le plus utilisé en polarisation de fluorescence [Borenstain, 1993]. Le DPH est caractérisé par une émission à rendement quantique élevé en milieu hydrophobe et faible en milieu aqueux. L'anisotropie de fluorescence permet d'accéder à la fluidité de la membrane.

Cependant, l'orientation dans la bicouche de ce type de sondes est mal définie, et elles subissent une incorporation progressive au sein de la membrane. Ces molécules se distribuent ensuite dans tous les compartiments lipidiques de la cellule et donc aucune localisation précise n'est envisageable [Borenstain, 1993 ; Grunberger, 1982 ; Kuhry, 1983].

Malheureusement leur spécificité membranaire n'est pas totale et on finit par les retrouver dans le feuillet interne de la membrane.

Des dérivés fluorescents de phospholipides principalement dérivés de phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines sont également employés dans l'étude de systèmes organisés. Il semblerait qu'ils soient moins sujets à être transférés vers le feuillet interne des membranes. On peut cependant craindre avec ces dérivés qu'ils subissent des coupures enzymatiques dues à l'action de lipases, rendant ainsi leur mobilité aux fluorophores [Miccoli, 1993 ; Morgan , 1982].

Dans le choix d'une sonde membranaire, il y a toujours plusieurs facteurs à considérer, qui sont pour les principaux :

- la sensibilité des caractéristiques spectroscopiques de la sonde aux fluctuations de l'environnement membranaire,
- la facilité d'incorporation de la sonde spécifiquement au niveau de la membrane,
- la connaissance de la localisation et de l'orientation des marqueurs dans la bicouche membranaire,
- les perturbations causées dans l'organisation du milieu biologique par l'introduction d'une molécule étrangère,
- la stabilité de la sonde dans la membrane biologique.

Dans la pratique, aucune sonde ne répond à ces exigences et leur utilisation repose sur un compromis avec parfois des corrections apportées aux mesures expérimentales, ce qui explique la continuité dans la synthèse de nouvelles sondes.

IV.2.4. ETUDE DES PROPRIETES PHYSIQUES DE LIPOSOMES DE DPPC A L'AIDE DE ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

A/ Présentation des différents rotors

Un petit nombre de rotors procure des informations sur la microviscosité et les propriétés diélectriques locales des membranes et un certain nombre de rotors moléculaires fluorescents permettent d'obtenir des informations sur la constante diélectrique, la microviscosité et le comportement de phase des bicouches phospholipidiques.

La figure (IV.2).9 présente différents rotors condensés sur une fonction glucidique déjà étudiés ou en cours d'étude au DCPR-GRAPP. La plupart de ces sondes ont été utilisées pour des études dans des structures de type liposomes, qui sont considérées comme des structures modèles des membranes biologiques.

Ces molécules, synthétisées dans le but d'avoir des sondes fluorescentes capables de faire des reconnaissances privilégiées dans des membranes biologiques, ont donc d'abord été utilisées pour déterminer la température de transition de divers lipides.

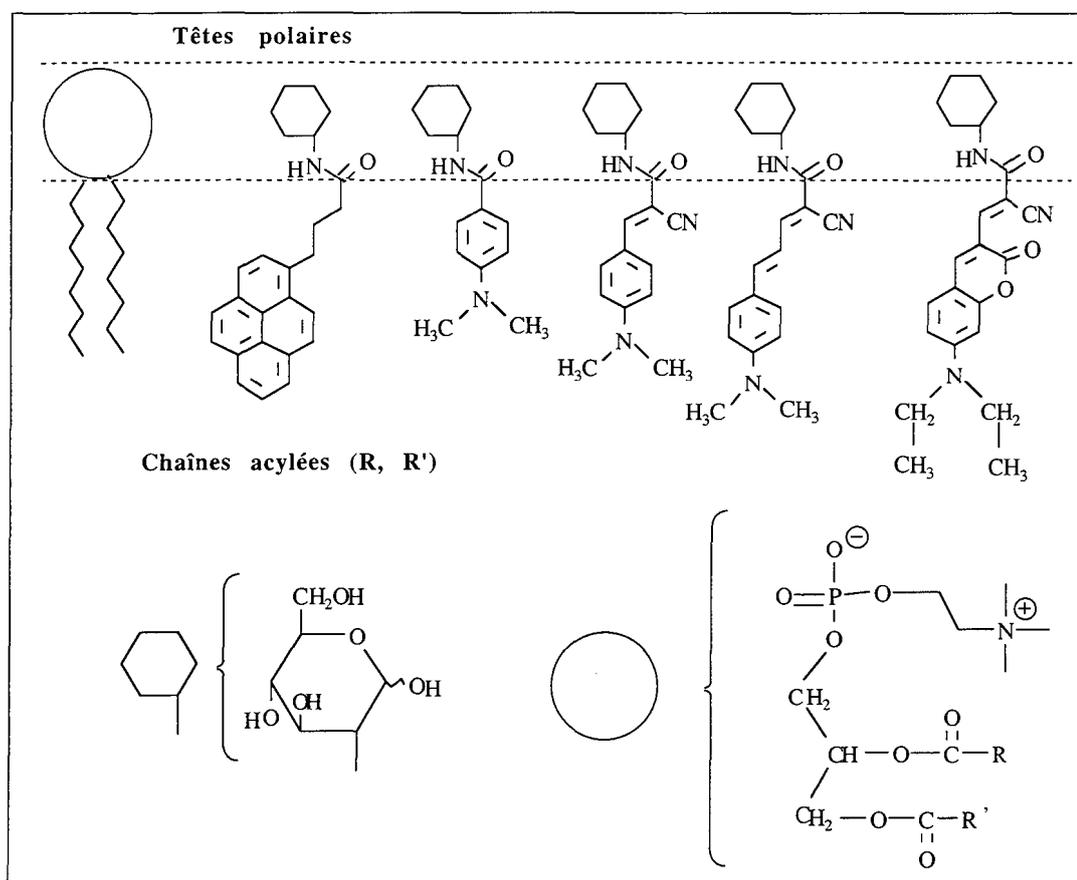


Figure (IV.2).9

Diagramme schématique illustrant les localisations des rotors moléculaires fluorescents dans une bicouche phospholipidique.

B/ Matériels et méthodes

i/ Matériels

i.1/ Produits

Le modèle lipidique que nous avons étudié est composé de molécules de DPPC (DL- α -dipalmitoylphosphatidylcholine : [figure \(IV.2\).10](#)) qui appartient à la catégorie des phosphoglycérides saturés. Le DPPC résulte d'une estérification des groupes hydroxyle en position 1 et 2 du glycérol par l'acide palmitique et d'une estérification du groupement hydroxyle en position-3 par un dérivé de l'acide phosphorique.

Les produits utilisés sont :

- du chloroforme (Fluka, réf. 25670)
- du DL- α - Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (Sigma, réf. P 5911) $M = 734$ g/mol
 $T_M = 41,7^\circ\text{C}$ [Borenstain, 1993]

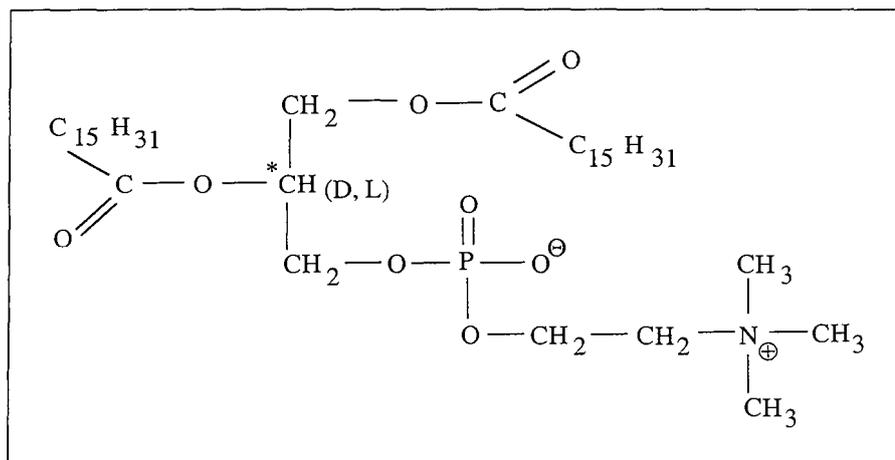


Figure (IV.2).10

Représentation du DPPC : DL- α -dipalmitoylphosphatidylcholine.

i.2/ Sondes fluorescentes

LES DÉRIVÉS COUMARINE

Rotor CNCONHGlu $M = 473$ g/mol (figure (IV.2).11a)

Rotor CNCONHGluAc $M = 641$ g/mol (figure (IV.2).11b)

Rotor CNCOOEt $M = 340$ g/mol (figure (IV.2).11c)

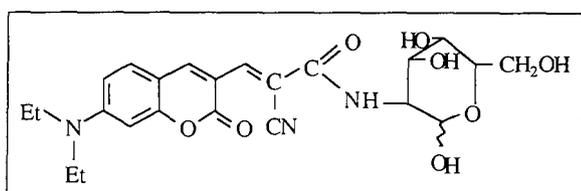


Figure (IV.2).11a

Rotor CNCONHGlu.

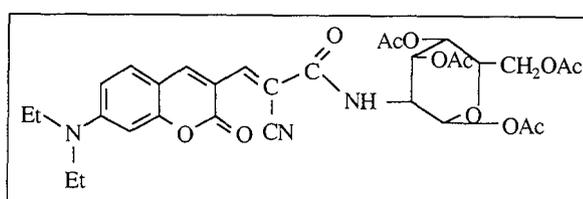


Figure (IV.2).11b

Rotor CNCONHGluAc.

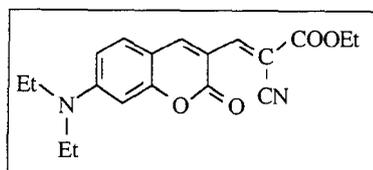


Figure (IV.2).11c

Rotor CNCOOEt.

AUTRES SONDES DE COMPARAISON

Rotor (2)-CONHGlu	M = 403 g/mol	(figure (IV.2).11d)
Rotor (2)-CNCONHGluAc	M = 459 g/mol	(figure (IV.2).11e)
Rotor inositol	M = 404 g/mol	(figure (IV.2).11f)

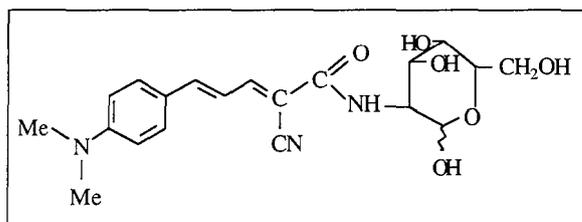


Figure (IV.2).11d
Rotor (2)-CONHGlu.

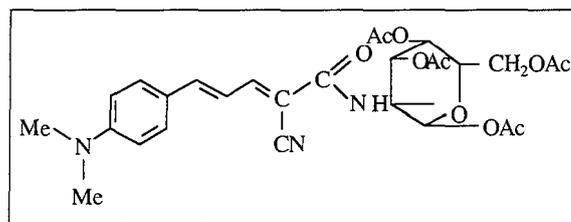


Figure (IV.2).11e
Rotor (2)-CONHGluAc.

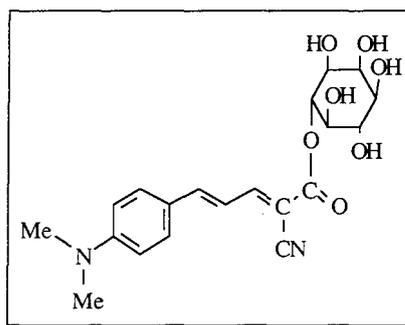


Figure (IV.2).11f
Rotor inositol.

i.3/ Tampon phosphate (PBS), pH 7,4

Le tampon PBS (pH 7,4), est préparé à partir de 40,5 mL d'une solution 0,2 M de Na_2HPO_4 et de 9,5 mL d'une solution 0,2 M de NaH_2PO_4 , le tout dilué à 100 mL.

ii/ Méthodes

Les méthodes d'absorption UV-Visible et de fluorescence ont déjà été décrites dans le chapitre III, § III.2.2.

ii.1/ Etude des microviscosités des membranes phospholipidiques

Le rendement quantique de fluorescence Φ_f dépend de la liberté des rotations internes, responsables de la désactivation non radiative des rotors moléculaires et augmente donc avec l'augmentation de viscosité [Lukac, 1984].

L'interconversion du premier état singulet vers l'état fondamental est la principale voie de désactivation en compétition avec le processus non radiatif et peut être exprimée sous la forme d'une équation d'Arrhénius :

$$\frac{1}{\Phi_f} - 1 = \frac{A}{k_f} e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)}$$

relation dans laquelle k_f représente la constante de vitesse de la transition radiative et E_a l'énergie d'activation correspondant à la rotation autour de la double liaison.

De même que pour les variations de viscosité du solvant, les transitions de phase thermo-induites des bicouches phospholipidiques affectent la mobilité des chaînes et ont donc une influence sur l'émission de fluorescence qui se traduit par une discontinuité dans le tracé d'Arrhénius. Cette discontinuité n'est pas due à une variation des propriétés physiques du milieu entourant les liposomes avec la température car la forme du spectre d'émission et la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence ne sont pas affectées par la variation de température.

ii.2/ Préparation des liposomes

La méthode de préparation consiste à solubiliser les phospholipides (8,3 mg de DPPC : quantité calculée pour obtenir une concentration finale de 10^{-3} M) dans 10 mL de chloroforme et à évaporer le solvant sous vide. Au film mince, opaque et uniforme obtenu sur les parois de verre est ensuite ajoutée dans une quantité adéquate de tampon PBS (10 mL). Par agitation et chauffage à une température supérieure à la température de transition du phospholipide considéré, on obtient une suspension trouble composée de liposomes multilamellaires.

Le traitement aux ultrasons (VibraCell 72408, Bioblock) de cette suspension est effectué pendant 3 min, avec une interruption toutes les 30 secondes afin d'éviter une augmentation de la température de la suspension (la formation des SUV est suivie par la mesure de la densité optique du mélange). Ce traitement conduit à une suspension limpide de liposomes unilamellaires de petite taille. Les rotors moléculaires fluorescents (solution mère à 10^{-3} M dans l'éthanol) sont ajoutés aux préparations pour obtenir une concentration théorique finale de $5 \cdot 10^{-6}$ M (la proportion finale d'éthanol est de 5%, v/v).

Nous pouvons noter que la concentration en sonde glucidique utilisée est faible du fait que son rendement quantique de fluorescence est élevé. L'introduction de la sonde en faible concentration dans les lipides permet d'éviter toute perturbation macroscopique significative au sein de la membrane.

C/ Résultats et discussion

Dans une première série d'expériences, l'incorporation des différents rotors glucidiques dans les liposomes de DPPC a été étudiée à 27 et 47°C, qui sont des températures situées en deçà et au-delà de la température de transition des phospholipides [Borenstain, 1993].

Dans une deuxième série d'expériences, chaque rotor a été testé pour déterminer la température de transition de phases du DPPC, et corrélérer ces valeurs à celles décrites dans la littérature.

i/ Cinétique d'incorporation des rotors dans des SUV de DPPC

Les cinétiques d'incorporation sont réalisées sur une durée de 15 minutes en fixant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des monochromateurs. Ces cinétiques permettent de déterminer le temps d'incorporation de la sonde dans les liposomes de DPPC. Cela se traduit par une intensité de fluorescence qui augmente progressivement après l'incorporation du traceur. Ces graphes permettent également de déterminer si la localisation du traceur est stable ou non au cours du temps.

Les figures (IV.2).12, 13 et 14 représentent les cinétiques d'incorporation des différents rotors en-dessous (27°C) et au-dessus (47°C) de la température de transition de phases du DPPC.

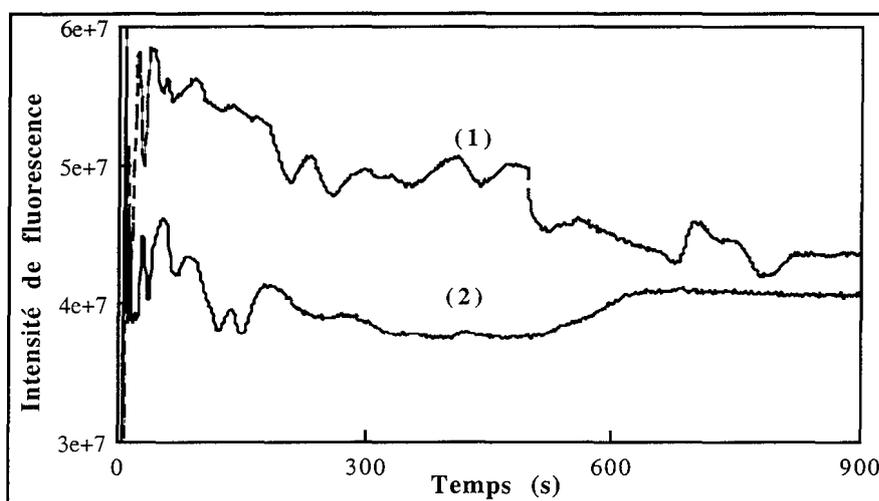


Figure (IV.2).12

Cinétique d'incorporation du rotor CNCOOEt ($5 \cdot 10^{-6}$ M)
dans les liposomes de DPPC à 27°C (1) et 47°C (2) sur une durée de 15 min.
($\lambda_{ex} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 558$ nm).

Lorsque la sonde est incorporée dans des liposomes de DPPC qui sont à une température au-delà de la température de transition de phase (courbes 2) l'intensité de fluorescence chute par rapport à celle d'une conformation ordonnée. Cette remarque va tout à fait dans le sens des observations déjà faites lors de l'étude en milieu visqueux (Chapitre III, § III.4.4) : le traceur se trouve en milieu fluide, libre de toute rotation, d'où une dissipation d'énergie et une diminution de l'intensité de fluorescence.

Les courbes montrent une différence d'intensité de fluorescence importante entre les différentes sondes. L'intensité de fluorescence observée avec le rotor CNCOOEt (figure (IV.2).12) oscille autour de $5 \cdot 10^7$ cps, tandis que celles des sondes glucidiques ont des valeurs maximales (à faible température) qui se situent autour de $2 \cdot 10^7$ cps et $2 \cdot 10^8$ cps pour respectivement le CNCONHGlu (figure (IV.2).13) et le CNCONHGluAc (figure (IV.2).14). Ces différences d'intensité reflètent le comportement de ces différents rotors en milieux visqueux.

Dans le cas du rotor CNCOOEt (figure (IV.2).12), les courbes correspondant aux deux températures fluctuent, et ne semblent pas se stabiliser au cours du temps. L'intensité de fluorescence à 27°C semble même chuter pendant la durée de l'enregistrement, tandis qu'à 47°C la courbe montre un profil stable. Faut-il en conclure que la sonde ne reste pas localisée à l'intérieur de la bicouche de phospholipides ?

Le dérivé coumarine CNCOOEt est un groupement polaire dont la spécificité membranaire n'est pas totale. Ce traceur a une structure qui peut laisser supposer qu'il reste localisé au niveau des têtes polaires des phospholipides, ce qui explique peut-être les fluctuations observées sur les courbes de cinétique d'incorporation. On peut également penser que lorsque la température augmente, le CNCOOEt se déplace vers l'extérieur de la membrane, ce qui pourrait s'expliquer dans la mesure où le CNCOOEt ne possède pas de groupement spécifique lui permettant de se positionner le long des chaînes hydrocarbonées.

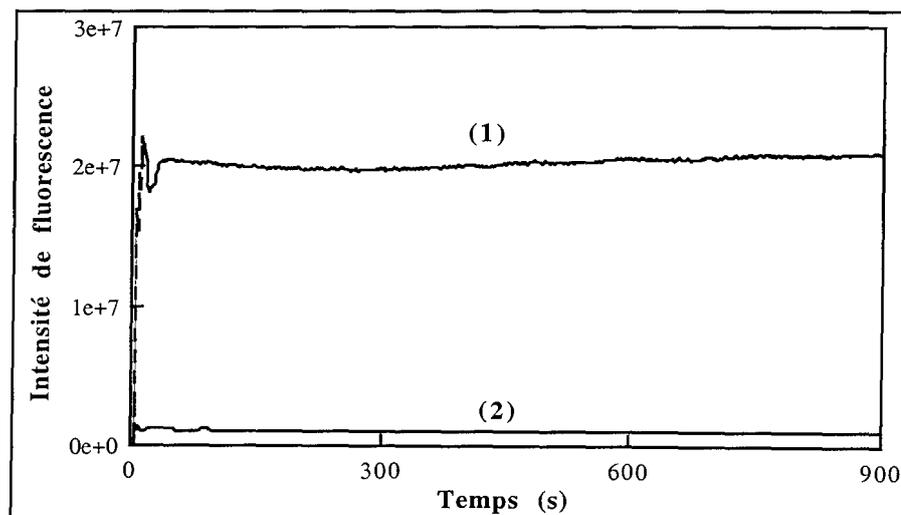


Figure (IV.2).13

Cinétique d'incorporation du rotor CNCONHGlu ($5 \cdot 10^{-6}$ M)
dans les liposomes de DPPC à 27°C (1) et 47°C (2) sur une durée de 15 min.
($\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 572 \text{ nm}$).

La cinétique d'incorporation du rotor CNCONHGlu (figure (IV.2).13), montre deux courbes qui visiblement sont beaucoup plus stables au cours du temps. A faible température (courbe 1), on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence au cours des premières minutes, puis une

stabilisation. Les liposomes sont dans la phase gel (structure ordonnée et rigide) et la sonde requiert une vingtaine de secondes pour pénétrer dans la structure organisée.

A température élevée la courbe (2) indique une intensité de fluorescence faible mais constante ($1e+6$) qui traduit une incorporation plus rapide à 47°C en raison de la grande perméabilité des liposomes qui sont alors en phase désordonnée.

La cinétique d'incorporation du rotor CNCONHGluAc (figure (IV.2).14) présente deux courbes dont l'intensité de fluorescence diminue au cours du temps, mais qui ne présentent pas autant de fluctuations que pour le rotor CNCOOEt. On peut dans ce cas penser à une instabilité de la sonde peut-être due à un photoblanchiment.

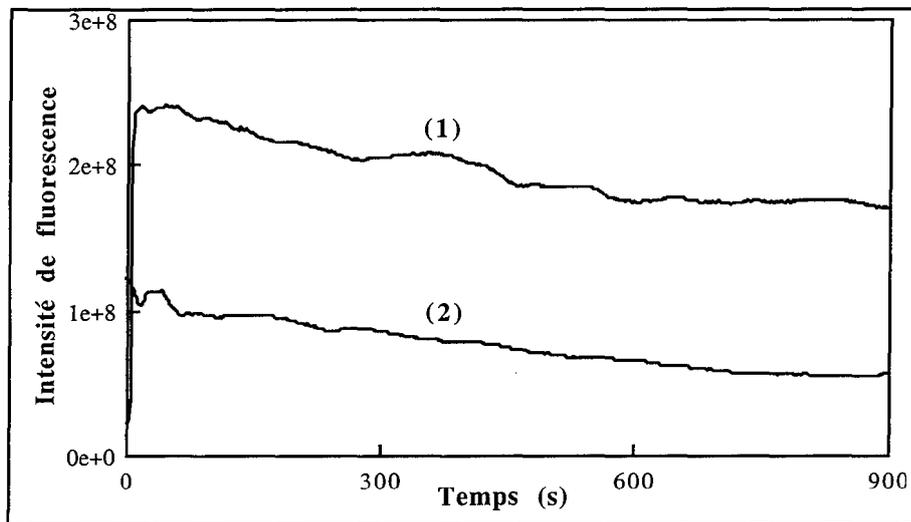


Figure (IV.2).14

Cinétique d'incorporation du rotor CNCONHGluAc (5.10^{-6} M) dans les liposomes de DPPC à 27°C (1) et 47°C (2) sur une durée de 15 min. ($\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 565$ nm).

ii/ Détermination de la température de transition de phases T_M dans des SUV de DPPC

La figure (IV.2).15 représente le comportement thermotropique des SUV de DPPC en utilisant comme traceurs de cohésion les rotors CNCOOEt et CNCONHGlu.

Autour de la température de transition, qui correspond à une modification de la structure moléculaire des vésicules, un changement de pente est attendu dans le tracé de type Arrhénius.

La valeur théorique de la température de transition de phases du DPPC est donnée à $41,7^{\circ}\text{C}$ [Borenstain, 1993]. Cette valeur est proche de celle déterminée expérimentalement avec le rotor CNCONHGlu ($T_M = 41,9^{\circ}\text{C}$), qui possède donc une bonne sensibilité vis-à-vis des propriétés de structure des liposomes.

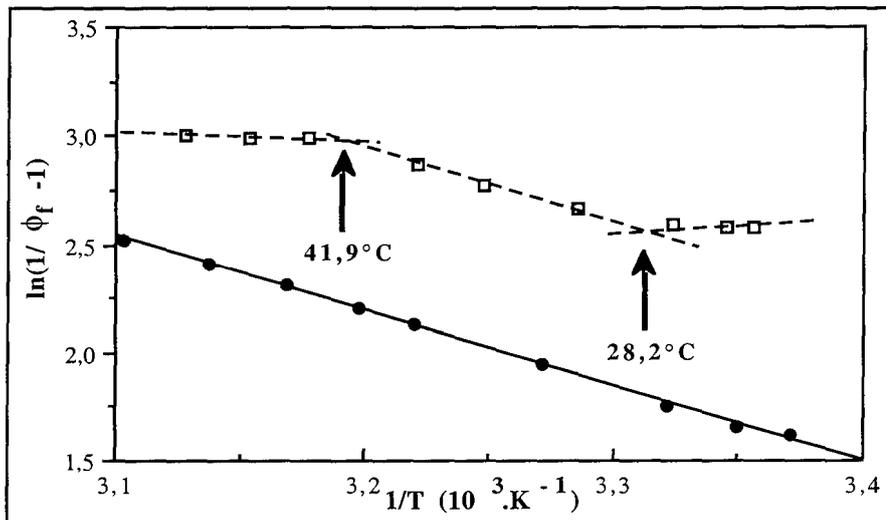


Figure (IV.2).15

Variation du rendement quantique de fluorescence en fonction de la température des rotors CNCOOEt (●) et CNCONHGlu (□), inclus dans des vésicules de DPPC.

Dans le cas du rotor CNCOOEt, la courbe ne montre aucun changement de pente, comme si le traceur était insensible aux changements structuraux subis par les vésicules de DPPC. Là encore, on en revient à la question soulevée au regard des cinétiques d'incorporation : la sonde pénètre-t-elle à l'intérieur de la bicouche de phospholipides ?

Si ce n'est pas le cas, cela signifie que la sonde reste à l'extérieur des vésicules, c'est-à-dire dans le tampon, et donc, que les variations du rendement quantique de fluorescence de la sonde dans le tampon, ou dans les SUV de DPPC, sont identiques.

Nous avons donc tracé le graphe de la figure (IV.2).16 qui présente les variations du rendement quantique de fluorescence en fonction de la température du rotor CNCOOEt en solution dans du tampon PBS et théoriquement inclus dans des SUV de DPPC.

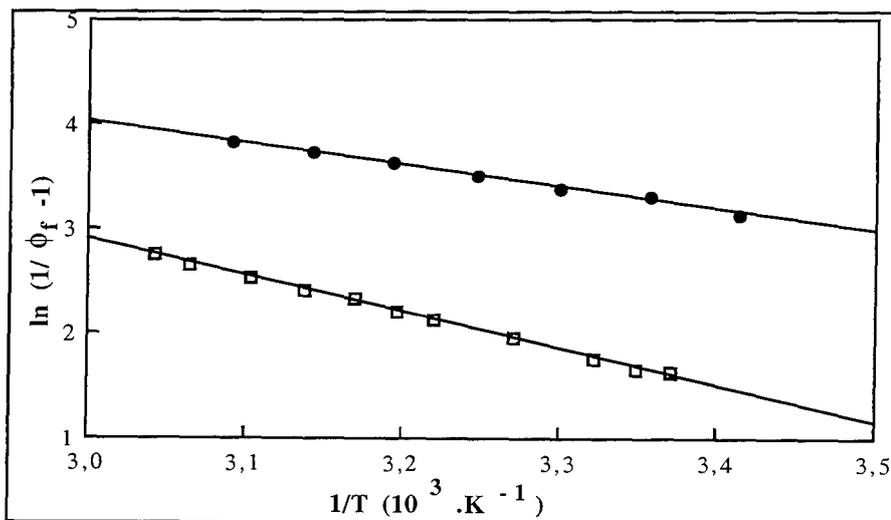


Figure (IV.2).16

Variation du rendement quantique de fluorescence en fonction de la température du rotor CNCOOEt en solution dans du tampon PBS (●) et dans des SUV de DPPC (□)

Comme on peut l'observer, bien que les deux courbes aient deux pentes différentes (correspondant à des énergies d'activation différentes : 18 kJ.mol^{-1} dans l'eau et 29 kJ.mol^{-1} dans le DPPC) elles conservent un profil similaire. Il est donc possible d'expliquer le comportement du rotor CNCOOEt au regard des vésicules de DPPC par rapport à sa structure qui ne lui permet pas de se localiser dans les vésicules de DPPC.

Nous avons ensuite voulu comparer les résultats pour les deux sondes glucidiques. La figure (IV.2).17 présente les variations de $\ln(1/\phi_f - 1)$ en fonction de $1/T$ pour le traceur CNCONHGluAc.

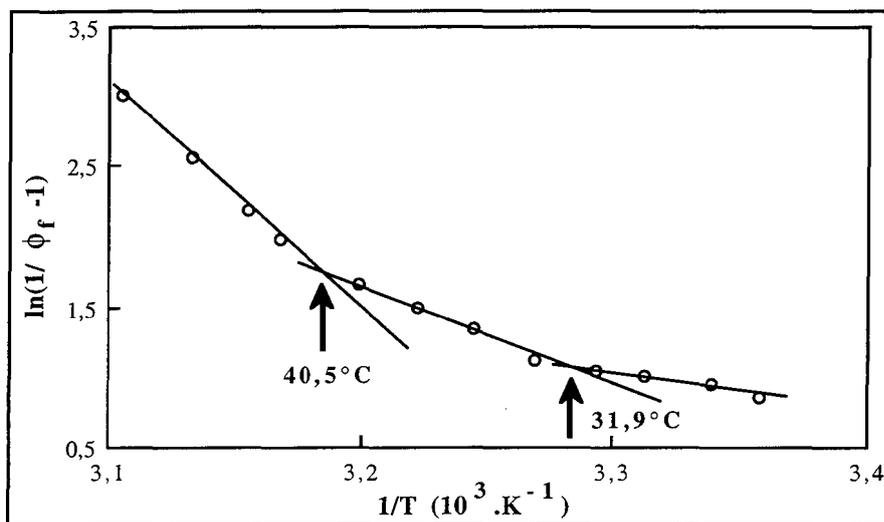


Figure (IV.2).17

Variation du rendement quantique de fluorescence en fonction de la température du rotor CNCONHGluAc incorporé dans des vésicules de DPPC.

Le dérivé acétylé présente des valeurs d'intensité de fluorescence beaucoup plus élevées que le dérivé hydroxylé ce qui correspond également à une différence de rendement quantique de fluorescence entre les deux composés.

De plus, les intensités de fluorescence du rotor CNCONHGluAc (figure (IV.2).17) varient sur une échelle trois fois plus importante que celles du rotor CNCONHGlu (figure (IV.2).15). Il est donc clair que le composé acétylé, d'ailleurs moins polaire que le composé CNCONHGlu, est beaucoup plus sensible aux changements conformationnels des liposomes lors d'une augmentation de température. Cette sensibilité du traceur vis-à-vis du changement de conformation de la bicouche de phospholipide est le signe que le traceur est bien incorporé au niveau des chaînes d'acides gras du DPPC car sinon l'émission de fluorescence serait indépendante de la température [Epanand, 1996].

IV.2.5. CONCLUSION

Les expériences réalisées avec le rotor glucidique CNCONHGlu montrent sa capacité à suivre le comportement des liposomes au regard de la température. Des résultats opposés ont été trouvés avec le rotor CNCOOEt qui ne comporte pas le cycle glucosamine.

Parallèlement, des études ont été menées avec le rotor glucidique acétylé, en raison de son caractère moins polaire que son homologue hydroxylé. Il apparaît que le dérivé acétylé s'incorpore beaucoup mieux au sein des membranes de liposomes. De plus, par son rendement quantique de fluorescence élevé dans les milieux rigides, cette sonde constitue un marqueur certainement plus attractif pour étudier des systèmes cellulaires intacts.

Suite à ces résultats, et pour pouvoir progresser vers des applications d'intérêt biologique, nous avons incorporé ces trois rotors de type coumarine, CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc dans des systèmes biologiques complexes : des cellules endothéliales intactes. L'objectif de cette étude étant de déterminer la localisation de ces sondes au sein de ces systèmes biologiques, nous avons réalisé différents marquages avec nos sondes d'une part, et des sondes de localisation connue d'autre part, et comparé les résultats grâce à une technique de microscopie de fluorescence 3D. Ce sont ces résultats que nous présentons dans la suite de ce chapitre.

IV.3. INCORPORATION DES SONDES FLUORESCENTES DANS DES CELLULES ENDOTHELIALES

IV.3.1. STRUCTURE ET ROLE DES CELLULES ENDOTHELIALES

A/ Structure d'une cellule eucaryote

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par des membranes internes qui entourent le noyau, les mitochondries et (dans la cellule végétale) les chloroplastes (figure (IV.3).1).

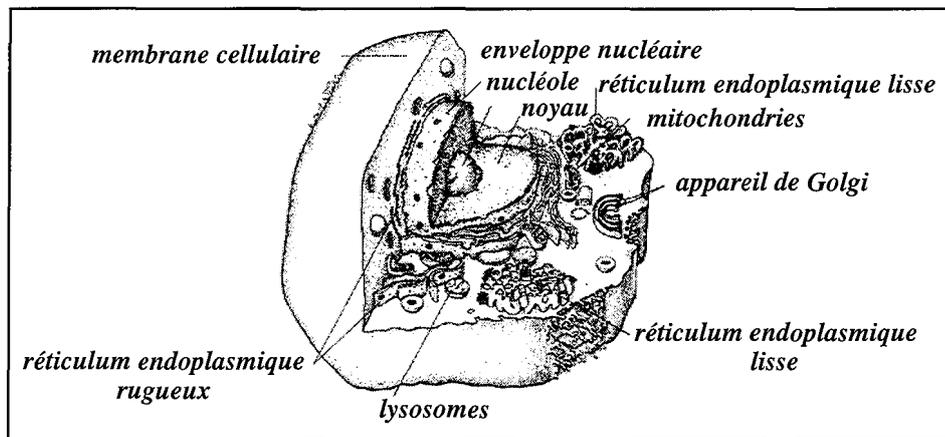


Figure (IV.3).1

Schéma d'une cellule eucaryote.

Elles forment un compartiment labyrinthisme appelé réticulum endoplasmique, où sont synthétisés aussi bien les lipides et les protéines des membranes cellulaires que le matériel destiné à être exporté hors de la cellule. Elles forment aussi des empilements de sacs aplatis constituant l'appareil de Golgi, qui est aussi impliqué dans le transport de diverses molécules organiques. Des membranes entourent les lysosomes qui contiennent des réserves d'enzymes destinées à la digestion intracellulaire et les empêchent ainsi d'attaquer les protéines et les acides nucléiques de la cellule elle-même. Toutes ces structures entourées d'une membrane correspondent à des compartiments internes distincts à l'intérieur du cytoplasme. Dans une cellule animale type, ces compartiments occupent près de la moitié du volume cellulaire total. Le compartiment restant du cytoplasme, qui inclut tout ce qui n'est pas organites entourés d'une membrane, est habituellement appelé cytosol.

B/ L'endothélium et les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins les plus gros sont les artères et les veines, qui ont une paroi résistante et épaisse de tissu conjonctif et de muscle lisse (figures (IV.3).2a et 2b).

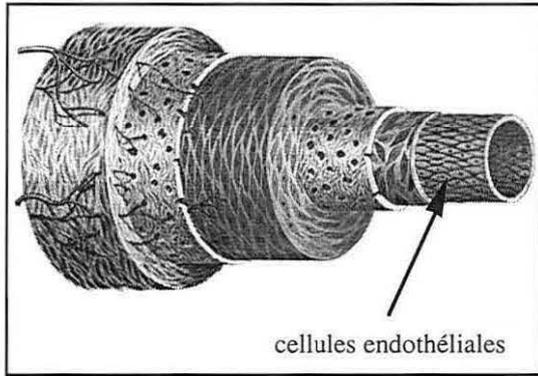


Figure (IV.3).2a

Coupe transversale d'une artère
[Akkerman,1986].

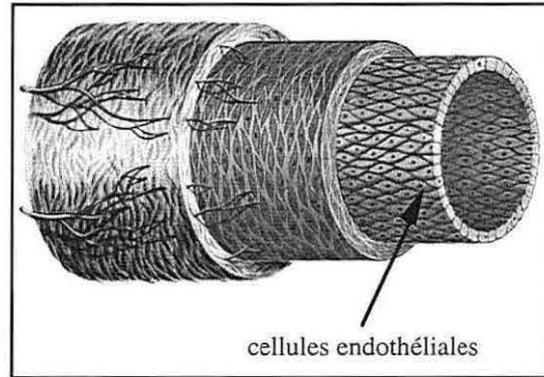


Figure (IV.3).2b

Coupe transversale d'une veine
[Akkerman,1986].

Les cellules endothéliales tapissent la paroi des vaisseaux (forme pavimenteuse) et assurent les échanges entre le sang et la paroi. Séparées des couches environnantes extérieures par une lame basale, sur laquelle adhèrent les cellules endothéliales, on trouve en dessous de ce compartiment nommé intima, la média, dans laquelle les cellules musculaires lisses sont présentes avec de nombreuses protéines (figure (IV.3).3).

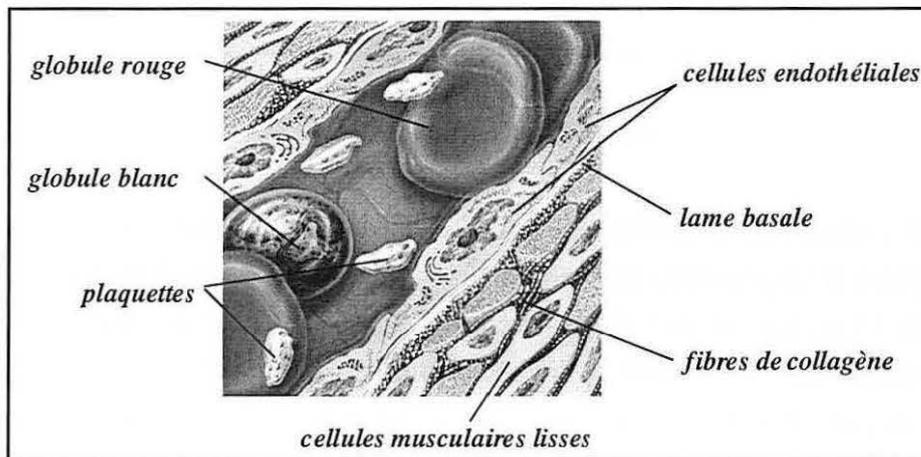


Figure (IV.3).3

Représentation schématique d'un vaisseau sanguin [Akkerman, 1986].

Les cellules musculaires lisses sont les éléments cellulaires responsables, dans la paroi vasculaire, de la relaxation et de la contraction des artères. L'épaisseur du tissu conjonctif dans la paroi varie selon le diamètre et la fonction du vaisseau, mais la couche endothéliale est toujours présente [Alberts, 1986].

C/ Les cellules endothéliales

Par opposition avec des cellules gliales ou des fibroblastes qui ont des comportements mal coordonnés, les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins ont une capacité remarquable à ajuster leur nombre et leur distribution aux exigences locales. Tous les tissus dépendent d'un apport sanguin (pour la régulation de l'oxygénation) et celui-ci dépend des cellules endothéliales. Elles forment un système de support naturel et adaptable qui se ramifie dans toutes les régions de l'organisme. S'il n'y avait pas les cellules endothéliales pour développer et remodeler le réseau vasculaire, la réparation du tissu serait impossible. Les cellules endothéliales tapissent donc entièrement le système vasculaire, du cœur jusqu'au plus petit des capillaires, et elles contrôlent les échanges entre le sang et les tissus.

D'un bout à l'autre du système vasculaire adulte, les cellules endothéliales gardent la capacité de se diviser et de se déplacer. Si par exemple, une partie de la paroi de l'aorte est endommagée et dénudée de ses cellules endothéliales, de nouvelles cellules se forment dans l'endothélium qui entoure la zone mise à nu, et migrent pour couvrir la surface exposée. Dans les vaisseaux normaux, la proportion de cellules endothéliales est particulièrement élevée aux points de branchement des artères où la turbulence et l'usure des cellules endothéliales qui en résulte semblent stimuler le renouvellement cellulaire.

Les cellules endothéliales n'ont pas seulement un rôle de réparation de la paroi des vaisseaux sanguins existants, elles contribuent aussi à en créer de nouveaux. Elles doivent faire cela chez l'embryon pour aller de pair avec la croissance de l'organisme, dans des tissus adultes normaux tels que l'os ou la paroi de l'utérus qui sont soumis à des cycles répétés de remodelage et de reconstruction ou dans la réparation de tissu endommagé.

Elles ont également un rôle déterminant dans le contrôle de l'hémodynamique à travers leurs activités métaboliques (contrôle de l'homéostasie, tonus vasculaire, fluidité et coagulabilité du sang, adhésion cellulaire...), et leurs propriétés peuvent être altérées ou modifiées dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, hypertension, inflammation, maladies métaboliques...). Il faut retenir le double déterminisme dans le rôle des cellules endothéliales qui ont une action antitrombotique et anticoagulante et c'est en raison de leur rôle fondamental en biologie vasculaire que notre choix s'est porté sur ce type cellulaire particulier.

IV.3.2. MATERIELS ET METHODES POUR L'ETUDE IN VITRO D'UNE MONOCOUCHE DE CELLULES ENDOTHELIALES

A/ Matériels

i/ Produits

Les produits utilisés sont :

- cellules endothéliales : lignée humaine établie (ECV 304),
- milieu de culture liquide : M 199 (Gibco, réf. 22340-020), contenant de la glutamine
- antibiotiques : pénicilline (5000 IU/mL)-streptomycine (5000 UG/mL) (Gibco, réf. 10070),
- antifongique : fungizone (250 µg/mL) (Gibco, réf. 15290),
- un système tampon NaHCO₃/CO₂. Hépès 1M (Gibco, réf. 15630),
- 10% v/v de sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher, réf. P30-1801),
- trypsine 0,25% (Life Technologie, réf. 250 500 14)

ii/ Supports de cultures in vitro

Les matériels utilisés comme supports de culture sont :

- des boîtes de culture (25 ou 75 cm³, Costar),
- des boîtes de Pétri (60/15 mm, Greiner),
- des lamelles couvre-objet rectangulaires (Prolabo, réf. 05 642.307).

iii/ Imagerie par microscopie optique 3D

Pour toutes les analyses de microscopie optique 3D, les cellules sont observées à même les lamelles et dans du PBS (température et atmosphère ambiante).

La microscopie optique à trois dimensions a été réalisée à partir d'un microscope photonique inversé à fluorescence IX-70 Olympus, équipé du système CELLscan™ fourni par Scanalytics (Boston, USA). Ce système permet l'acquisition et la restitution d'images numérisées en trois dimensions à partir d'une série de plans x et y, capturés avec une caméra CCD 512 x 512 pixels. Un module piézo-électrique adapté sur l'objectif ou un asservissement de la platine permettent un déplacement sur l'axe z. Les coupes horizontales, pouvant être obtenues tous les 0,25 µm, servent à reconstituer une vue tridimensionnelle en réalité virtuelle. CELLscan™ est un appareillage d'acquisition et de déflouement d'images spécialement développé pour observer des échantillons marqués avec des molécules fluorescentes à partir d'un microscope photonique droit ou inversé. La grande sensibilité des caméras CCD et l'élimination du flou par l'EPR (annexe du chapitre IV) permettent des observations avec des sondes fluorescentes très peu concentrées, pour un vaste éventail de longueurs d'onde ; les longueurs d'onde d'excitation (UV-Visible) et d'émission de fluorescence étant sélectionnées en fonction des sondes spécifiques des éléments cellulaires.

La très grande vitesse de calcul des processeurs d'images vectorielles permet d'utiliser des algorithmes complexes pour éliminer le flou des images créé par la lumière parasite provenant des plans défocalisés. Les images "déflouées" sont plus nettes et mieux contrastées.

Contrairement à la technique confocale qui restitue l'image d'un plan en sélectionnant la lumière émise par les points situés sur le plan focal, la technique de déflouage utilisée sur le CELLscan™ (EPR), permet de prendre en compte la totalité de la lumière provenant de tous les plans, en réassignant chaque photon sur son plan d'origine. L'algorithme de déflouage tient compte des propriétés physiques du microscope pour la modélisation du parcours de la lumière issue du point d'un plan à travers tous les plans. Les étapes nécessaires à l'obtention d'une image 3D déflouée sont décrites en annexe de ce chapitre.

B/ Méthodes

i/ Cultures cellulaires sur lamelles

L'examen morphologique au microscope optique de cellules endothéliales à confluence met en évidence l'aspect en "pavés de chaussée" caractéristique des cellules endothéliales (figure (IV.3).4).

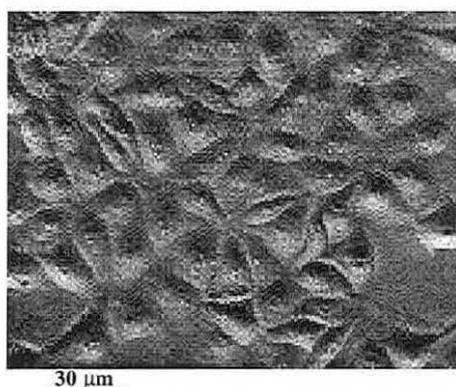


Figure (IV.3).4

Monocouche de cellules endothéliales ECV 304
adhérentes et à confluence (objectif x 20, exposition : 0,3 s).

Les cellules endothéliales sont cultivées dans du milieu de culture complétement par la pénicilline-streptomycine, le fungizone et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). L'atmosphère est humidifiée et maintenue à 5% en CO₂, à 37°C et le milieu est renouvelé toutes les 48h.

Entretien : les cellules à confluence sont ensuite décollées par une solution de trypsine 0,25%. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope. Après un lavage dans du milieu de culture contenant 10% de SVF pour stopper l'action de la trypsine, les cellules sont réensemencées. Le milieu est renouvelé toutes les 48h. Les cellules forment une monocouche confluyente en 3 ou 4 jours, et pour les différentes expérimentations, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de verre à la concentration désirée, 72h avant l'étude.

ii/ Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test d'exclusion au bleu trypan et les cellules ne permettant pas l'entrée du colorant sont considérées comme vivantes.

Pour cela, on utilise une solution de bleu trypan (1 volume d'une solution NaCl à 4,25% et 4 volumes de la solution de bleu trypan à 0,2%), additionnée à un volume de suspension cellulaire.

IV.3.3. INCORPORATION DES SONDES FLUORESCENTES

Jusqu'à présent, les travaux menés dans notre équipe concernant les applications biologiques, touchaient uniquement le domaine des systèmes moléculaires organisés modèles, qui malgré leur similitude avec les membranes biologiques, ne présentent pas la même complexité.

Cette recherche sur les cellules endothéliales a eu pour principal objectif l'étude du comportement de nos trois sondes de type coumarine au contact d'un environnement biologique vivant. Parallèlement, pour montrer l'importance de la structure d'un traceur fluorescent pour en faire un marqueur d'intérêt biologique, nous avons suivi l'incorporation de différents rotors glucidiques ou inositols, ayant un fort caractère amphiphile, synthétisés au sein de notre équipe. Du point de vue méthodologique, le marquage des cellules a été suivi de plusieurs lavages pour éliminer le traceur du surnageant, dans la mesure où les rotors présentent pour la plupart un rendement quantique de fluorescence non négligeable en milieu aqueux.

A/ Etude de différents rotors ayant un cycle fortement hydrophile

i/ Cas du rotor glucidique cinnamylidène

La première étude qui avait été entreprise au sein de liposomes de DPPC, concernait le dérivé glucidique cinnamylidène (2)-CONHGlu (figure (IV.2).11d) synthétisé au DCPR-GRAPP [Carré, 1998]. L'intérêt était de synthétiser des sondes membranaires en fixant une partie fortement hydrophile (la glucosamine) sur une partie hydrophobe de façon à localiser la partie hydrophile au niveau des têtes polaires des phospholipides et à orienter la chaîne hydrophobe le long des chaînes hydrocarbonées. La fonction glucidique a été choisie comme molécule d'ancrage en raison de la présence des glucides associés aux lipides, à la surface externe de la membrane plasmique.

Cette sonde a donc été incorporée au sein de cellules endothéliales, à une concentration de 10^{-4} M, en choisissant un temps d'incubation de 4 min. L'image de fluorescence a été réalisée après avoir lavé la lamelle plusieurs fois avec du tampon PBS de façon à éliminer le traceur non incorporé, et en utilisant un temps d'exposition de 1 s.

Il a été impossible de différencier l'intensité de fluorescence de la cellule à celle du bruit de fond et nous en avons conclu que la sonde ne s'incorpore pas, et ne présente aucune affinité avec les différents constituants cellulaires.

ii/ Cas du rotor inositol cinnamylidène

Parmi les métabolismes cellulaires, qui interviennent dès que la cellule subit un stress, celui du calcium est primordial. De même, pour les cellules endothéliales soumises aux contraintes mécaniques du flux sanguin, il a été mis en évidence, entre autres, une augmentation importante du calcium Ca^{2+} intracellulaire, et parallèlement une synthèse accrue de phosphatidylinositol localisé dans la membrane et exclusivement dans les microdomaines caractérisant les pompes ioniques et les récepteurs membranaires [Nollert, 1989].

La synthèse du rotor inositol cinnamylidène (figure (IV.2).11f) a été menée dans l'objectif de suivre le comportement dynamique de la membrane plasmique au voisinage immédiat de ces microdomaines [Berroy, 1997].

L'incorporation de cette sonde au sein de cellules endothéliales (concentration 10^{-4} M, incubation 15 min), et son observation par microscopie de fluorescence (figure (IV.3).5) nous a permis de comparer le rôle du groupement inositol par rapport au groupement glucosamine.

L'image de fluorescence obtenue n'apporte aucune information, et il a été impossible de déflouer cette image en raison du bruit de fond important.

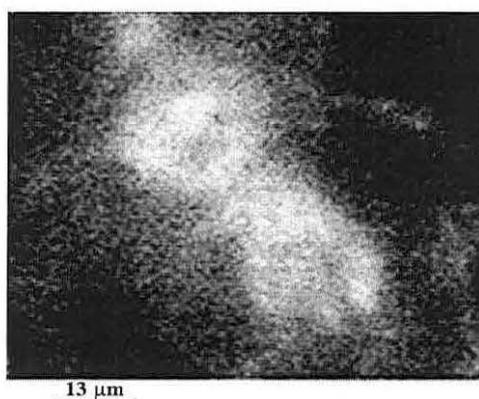


Figure (IV.3).5

Image (non déflouée) de cellules endothéliales (10^{-4} M, incubation 15 min)
marquées avec le rotor inositol cinnamylidène
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, exposition 0,5 s).

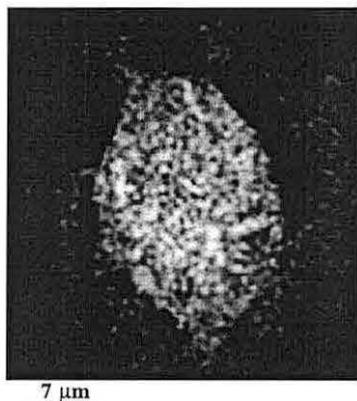
A la vue de ces résultats, qui ne diffèrent pas de ceux obtenus avec le dérivé glucidique cinnamylidène, puisqu'on ne distingue pas la localisation attendue du dérivé inositol, nous avons testé le dérivé coumarine glucidique, spécialement synthétisé pour être appliqué à des milieux biologiques.

iii/ Cas du rotor glucidique coumarine

Les deux études précédentes nous ont donc servi de témoin pour notre travail, et comme précédemment, nous avons incorporé la sonde glucidique coumarine (figure (IV.2).11a) au sein de cellules endothéliales (concentration 10^{-4} M, incubation 4 min). La figure (IV.3).6, présente l'image de fluorescence obtenue.

Il semble que le rotor coumarine s'incorpore mieux que les dérivés glucidiques cinnamylidène et inositols témoins, mais on ne distingue pas de localisation précise du traceur qui marque l'ensemble du cytoplasme, on voit en effet une fluorescence répartie de façon homogène dans toute la cellule.

Les cellules ont été marquées avec une concentration en sonde de 10^{-4} M pour un temps d'incubation de 4 min. La concentration en sonde est très importante et témoigne que l'hydrophilie apportée par le groupement glucosamine confère à la sonde une plus grande affinité pour le milieu aqueux que pour les constituants lipophiles des membranes.



7 μ m

Figure (IV.3).6

Image (déflouée) de cellules endothéliales
marquées avec le rotor glucidique coumarine (concentration 10^{-4} M, incubation 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, exposition 0,5 s).

Par la suite, nous avons eu l'idée d'utiliser dans le cas des substituants cinnamylidène et coumarine, la forme acétylée de la glucosamine qui est beaucoup moins polaire. La structure des nouveaux composés est présentée sur les figures (IV.2).11e et (IV.2).11b respectivement : les fonctions -OH du cycle glucosamine sont protégés par des fonctions esters -OCOCH₃ (-OAc).

B/ Etude de différents rotors ayant un cycle glucosamine tétra O-acétylée

i/ Cas du rotor glucidique cinnamylidène acétylé

Les résultats sont similaires aux précédents (figure (IV.3).7). On ne distingue pas de localisation spécifique du rotor cinnamylidène (concentration 10^{-5} M, incubation 5 min). La fluorescence est répartie dans toute la cellule, et il y a également un bruit de fond important à l'extérieur des cellules.

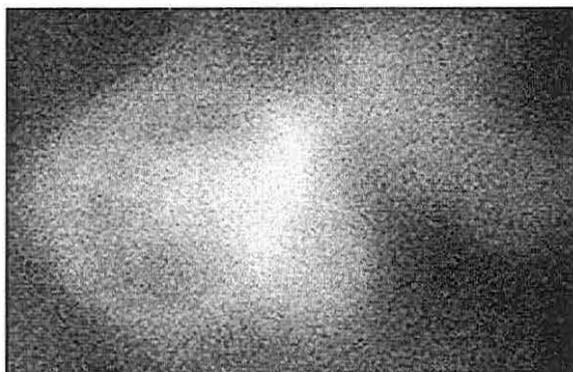


Figure (IV.3).7

Image (non déflouée) de cellules endothéliales marquées avec le rotor glucidique cinnamylidène acétylé (concentration 10^{-5} M, incubation 5 min) (microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, exposition 0,5 s).

ii/ Cas du rotor glucidique coumarine acétylé

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec cette sonde pour laquelle une concentration plus faible est suffisante pour obtenir une image exploitable (figure (IV.3).8).

Sans connaître la localisation exacte du traceur, on observe nettement que le rotor CNCONHGluAc marque des sites spécifiques de la cellule puisque l'intensité de fluorescence est intense sur le pourtour de la cellule et sur une zone globulaire indiquée par la flèche.

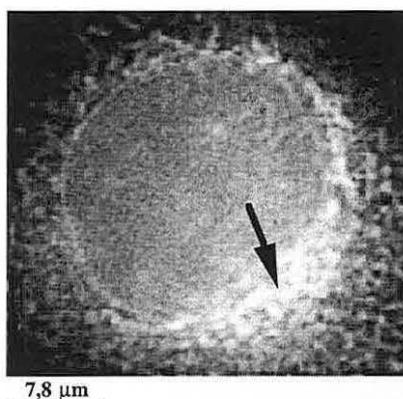


Figure (IV.3).8

Image (déflouée) de cellules endothéliales marquées avec le rotor glucidique coumarine acétylé (concentration $5 \cdot 10^{-6}$ M, incubation 4 min) (microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, exposition 0,5 s).

Ces résultats encourageants nous ont donc conduits à mener une étude plus poussée sur ce composé, afin de connaître pour ce traceur l'influence de sa concentration sur l'intensité du marquage, sa stabilité au sein de la cellule, et les perturbations causées dans l'organisation du milieu biologique par l'introduction d'une molécule étrangère.

Enfin, il nous semblait intéressant de connaître sa localisation pour mieux comprendre les observations expérimentales. Pour cela nous avons comparé, toujours par microscopie de fluorescence, le marquage du rotor CNCONHGluAc avec celui d'autres marqueurs plus connus tels que le TMA-DPH, le styrylpyridinium, la fluoescamine, la rhodamine 123 et le DiOC₆.

C/ Etude détaillée du rotor glucidique coumarine acétylé : CNCONHGluAc

i/ Influence de la concentration en sonde

Cette étude a été réalisée à partir du microscope photonique à fluorescence équipé d'un photomultiplicateur (OSP 100, Olympus). Pour chaque concentration étudiée, nous avons relevé la valeur du signal à la sortie du PM au centre de la cellule et sur la lamelle, pour la mesure du bruit de fond. Pour chaque concentration, la mesure a été réalisée de 15 à 20 fois, en changeant de champ à chaque mesure.

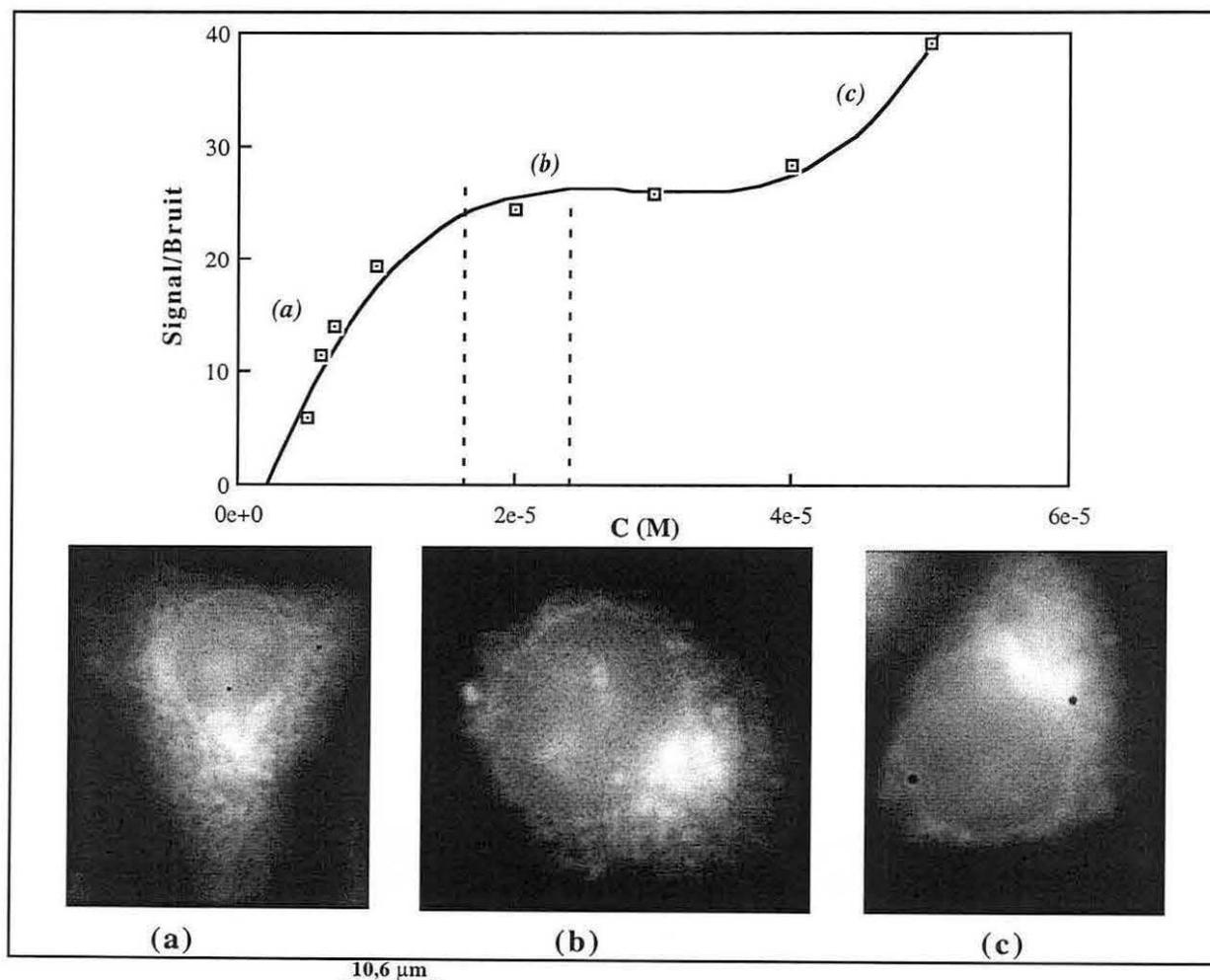


Figure (IV.3).9

Variation du rapport signal/bruit au sein de la cellule, en fonction de la concentration en sonde et images de fluorescence à (a) 10⁻⁵ M, (b) 2,5.10⁻⁵ M et (c) 5,5.10⁻⁵ M.

L'interprétation de la courbe (figure (IV.3).9) montre que le rapport signal/bruit est stable pour une certaine concentration en traceur, et qu'en deçà et au-delà de cette valeur, l'équilibre est rompu. On attribue cette montée soudaine du rapport signal/bruit à une concentration maximale en sonde acceptée par la cellule ; au-delà celle-ci n'est probablement plus perméable, et la majeure partie de la sonde est rejetée vers le milieu extérieur. On assiste peut-être également à la formation de complexes non fluorescents entre les différentes molécules de traceurs lorsque l'on se place à concentration trop élevée.

La figure (IV.3).9 correspond à une courbe polynomiale du troisième degré, d'équation :

$$y = -6,3884 + 3,5386.10^6 x - 1,2628.10^{11} x^2 + 1,4754.10^{15} x^3 \quad R^2 = 0,984$$

Cette courbe possède deux maxima, correspondant à des concentrations de $2,5.10^{-5}$ M et de $3,2.10^{-5}$ M. Ainsi, il faut travailler entre ces deux concentrations pour avoir un rapport signal/bruit optimal. C'est pourquoi dans la suite de notre étude nous avons travaillé à des concentrations en sonde CNCONHGluAc de 3.10^{-5} M.

ii/ Stabilité au cours du temps

Nous avons ensuite étudié, par microscopie de fluorescence 3D, la stabilité du marquage au cours du temps. Pour cela, nous avons marqué les cellules à une concentration de 3.10^{-5} M pendant 4 min puis la lamelle a été rincée plusieurs fois avec du tampon PBS. Différentes images ont été faites au cours du temps, entre 2 min et 2h après le rinçage de la lamelle.

Nous n'avons pas constaté d'évolution du marquage, celui-ci reste stable au cours du temps.

iii/ Localisation du traceur fluorescent

Au cours de notre étude, nous avons donc constaté que le traçage avec le rotor CNCONHGluAc était d'une grande stabilité quelles que soient la concentration et la durée d'incubation utilisées, puisque les images de fluorescence obtenues restent identiques. Nous avons alors cherché à connaître la spécificité de la sonde en la comparant à différents marqueurs spécifiques.

Pour cela, nous avons effectué le marquage des cellules, d'une part avec le rotor glucidique et d'autre part avec une sonde témoin. Ces témoins sont couramment utilisés dans le domaine biologique et permettent un marquage spécifique relatif.

Voici les différents traceurs que nous avons utilisés.

- le TMA-DPH et le styrylpyridinium (marquage de la membrane plasmique),
- la fluorescamine (marquage des protéines),
- la rhodamine 123 (marquage des mitochondries),
- le DiOC₆ (marquage du réticulum endoplasmique).

iii.1/ Contrôle d'un marquage membranaire

• Etude avec le TMA-DPH

Nous avons effectué un double marquage (a_2 et b) de cellules endothéliales avec respectivement le TMA-DPH (excitation/émission : 355/430 nm) et le rotor CNCONHGluAc (excitation/émission : 500/560 nm) (figure (IV.3).10).

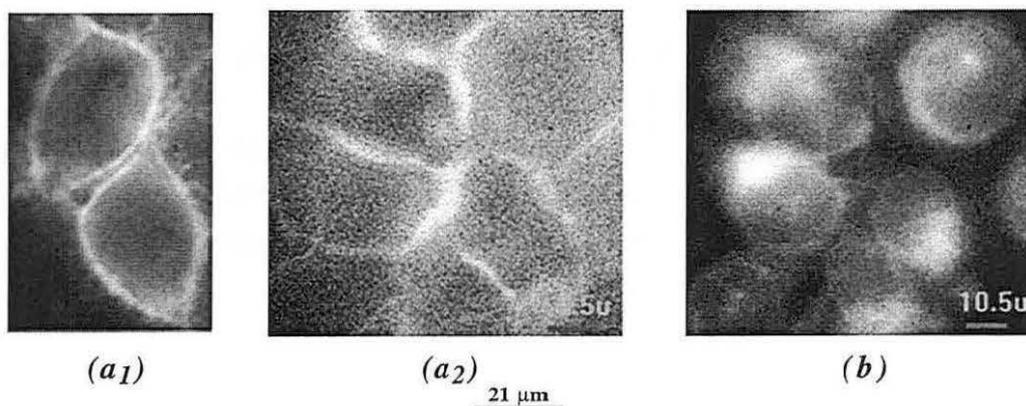


Figure (IV.3).10

Marquage de cellules endothéliales avec
le TMA-DPH (a_1 et a_2) (concentration $2 \cdot 10^{-6}$ M, incubation quelques s)
et le rotor CNCONHGluAc (b) (concentration $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, expositions 1 s (a_1 et a_2) et 0,1 s (b)).

Le TMA-DPH s'incorpore dans la membrane plasmique et marque donc la périphérie de la cellule. De toute évidence, le rotor n'est pas un marqueur analogue, comme nous pouvons le constater sur la figure (IV.3).10.

• Etude avec le styrylpyridinium

Le second marqueur que nous avons testé est le dibromure de N-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium ou styrylpyridinium (excitation/émission : 510/626 nm) qui s'insère dans le feuillet externe à la surface de la membrane et qui s'incorpore au niveau des vésicules membranaires (figure (IV.3).11).

En raison des longueurs d'onde d'excitation et d'émission du styrylpyridinium, il n'a pas été possible de réaliser un double marquage. Néanmoins, la figure (IV.3).11 montre que le rotor coumarine n'est pas un marqueur spécifique des systèmes membranaires périphériques des cellules.

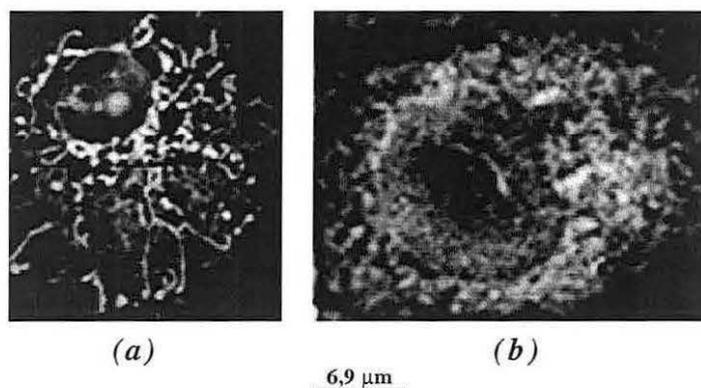


Figure (IV.3).11

Marquage de cellules endothéliales avec
le styrylpyridinium *(a)* (concentration $5 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 15 min)
et le rotor CNCONHGluAc *(b)* (concentration $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, expositions 0,5 s *(a)* et 0,1 s *(b)*).

iii.2/ Contrôle d'un marquage protéique

• Etude avec la fluorescamine

Nous avons ensuite testé une sonde qui réagit avec les groupements amine primaire des protéines : la fluorescamine (excitation/émission : 390/475 nm). La réaction de la fluorescamine avec des groupements amino est immédiate et le produit de réaction est fluorescent. Un excès de réactif est rapidement hydrolysé et reconverti en un produit non fluorescent par réaction avec le milieu aqueux ; par conséquent, le réactif réagit immédiatement avec les groupements aminés présents sur la face externe de la membrane, l'excès étant détruit avant même d'avoir la possibilité de traverser la membrane.

La figure (IV.3).12 montre le double marquage réalisé sur des cellules endothéliales à partir de la fluorescamine et du rotor CNCONHGluAc.

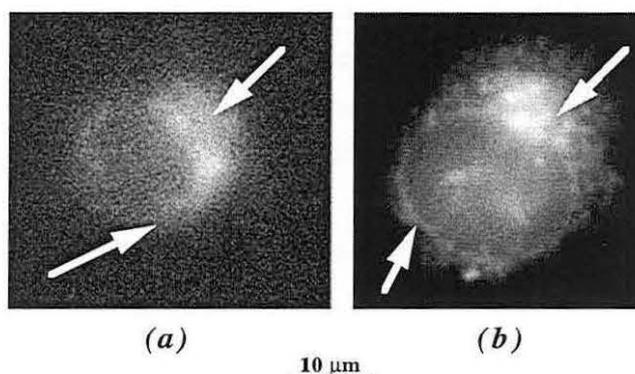


Figure (IV.3).12

Double marquage de cellules endothéliales avec
la fluorescamine *(a)* (concentration $5 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 15 min)
et la sonde CNCONHGluAc *(b)* (concentration $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, expositions 1 s *(a)* et 0,1 s *(b)*).

La comparaison des deux images montre une localisation qui semble identique puisque dans les deux cas apparaissent ces parties fortement fluorescentes indiquées par les flèches, quels que soient la concentration et le temps d'incubation pris en compte. Le marquage avec la sonde CNCONHGluAc semble donc proche de celui obtenu avec la fluorescamine, marqueur des régions protéiques.

iii.3/ Contrôle d'un marquage mitochondrial

• Etude avec la rhodamine 123

La rhodamine 123 (excitation/émission : 507/529 nm) est largement utilisée comme marqueur des structures mitochondriales.

La présence d'amas fluorescents dispersés dans toute la cellule nous a également poussés à tester ce marqueur. La figure (IV.3).13 est une comparaison du marquage de cellules endothéliales avec la rhodamine 123 (a) et la sonde glucidique acétylée.

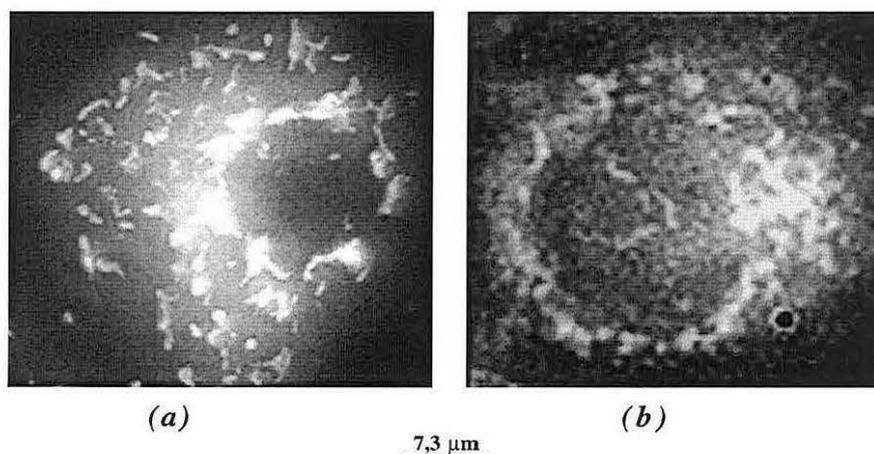


Figure (IV.3).13

Marquage de cellules endothéliales avec
la rhodamine 123 (a) (concentration $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 5 min)
et le rotor CNCONHGluAc (b) (concentration $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, expositions 0,1 s).

On observe clairement une différence entre les deux images : le marquage mitochondrial se fait par amas très distincts et éparpillés sur tout le pourtour de la cellule, tandis que le dérivé coumarine montre un marquage par amas diffus. De toute évidence, notre sonde ne marque pas les structures mitochondriales.

iii.4/ Contrôle d'un marquage réticulaire

• Etude avec la DiOC₆

La plupart des sondes carbocyanines ayant des chaînes courtes (C₁-C₆) marquent les mitochondries de cellules vivantes lorsqu'elles sont utilisées à faibles concentrations (0,5 µM). Celles qui portent un substituant pentyle (C₅) ou hexyle (C₆) peuvent également être considérées comme marqueurs du réticulum endoplasmique à condition de les employer à concentration élevée (5-50 µM). Nous avons testé la DiOC₆ (excitation/émission : 484/499 nm) à la concentration habituelle (3.10⁻⁵ M) comme témoin de marquage du réticulum endoplasmique (figure (IV.3).14). La longueur d'onde d'émission de la DiOC₆ correspondant à la longueur d'onde d'absorption de notre composé, ce double marquage pouvait donc avoir l'avantage de présenter un transfert d'énergie en cas de colocalisation.

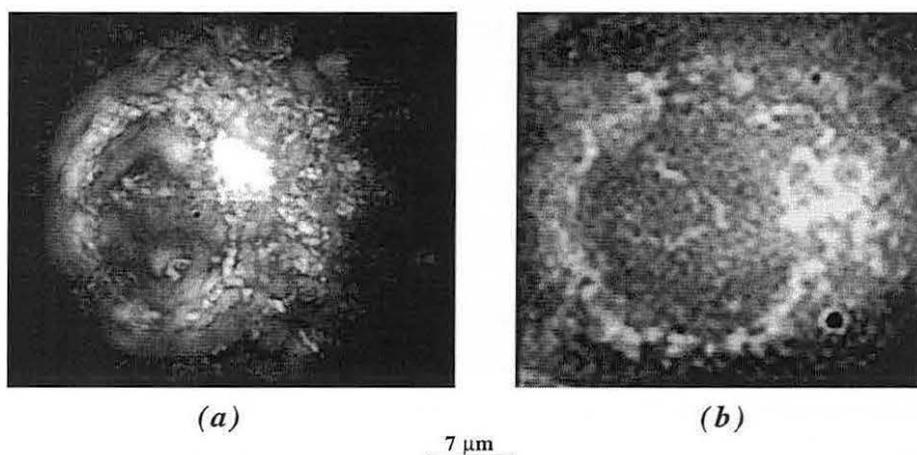


Figure (IV.3).14

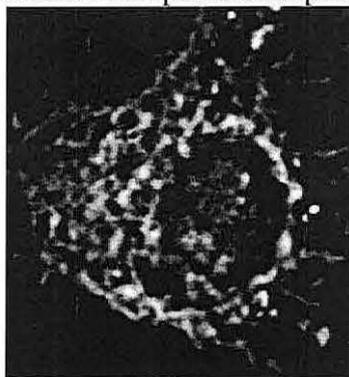
Double marquage de cellules endothéliales avec la sonde DiOC₆ (a) (concentration 3.10⁻⁵ M, incubation 5 min) et la sonde CNCONHGluAc (b) (concentration 3.10⁻⁵ M, incubation 4 min) (microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, expositions 0,1 s).

Le résultat obtenu avec ce marqueur témoin est à notre sens le plus encourageant, et certainement le plus fiable puisque la localisation des deux traceurs semble identique. Nous avons donc pu mettre en évidence que le rotor CNCONHGluAc est un marqueur du réticulum endoplasmique.

D/ Etude du rotor coumarine ester : CNCOOEt

Il apparaît donc que les différents rotors glucidiques que nous avons testés ne se comportent pas tous de la même façon. Ces différences, au niveau de l'incorporation, ne proviennent a priori pas de la fonction glucidique mais de la fonction coumarine. Cette constatation nous a conduits à tester un dérivé coumarine qui ne présente pas de fonction glucidique spécifique : le rotor CNCOOEt (figure (IV.3).11c). En conservant les conditions précédentes (concentration de 3.10⁻⁵ M, incubation de 4 min), ce nouveau rotor a été incorporé dans des cellules endothéliales, et la figure (IV.3).15 montre l'image obtenue.

On constate donc une très bonne incorporation de la sonde à l'intérieur de la cellule, le marquage avec le rotor CNCOOEt semble se rapprocher du marquage membranaire obtenu avec le styrylpyridinium. Cette étude confirme l'hypothèse précédente, à savoir que la fonction glucidique ne joue pas un rôle fondamental dans l'incorporation du traceur : elle permet simplement une localisation différente.



9,3 μm

Figure (IV.3).15

Marquage de cellules endothéliales avec
le rotor CNCOOEt (concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M, incubation de 4 min)
(microscope à fluorescence : objectif x 100, NA 1,25, exposition 0,5 s).

Enfin, connaître le comportement d'une sonde vis-à-vis d'une cellule biologique, connaître sa localisation et la concentration nécessaire sont d'importance, mais savoir si le traceur est toxique ou non pour la cellule est primordial. Il nous a donc semblé important de tester la toxicité de tous les marqueurs employés, y compris ceux qui ne s'incorporent pas, afin de pouvoir conclure quant à l'intérêt de nos différentes sondes.

E/ Tests de toxicité

Les tests de toxicité ont été faits par test d'exclusion au bleu trypan, une heure après avoir mis le traceur en contact avec les cellules endothéliales.



Figure (IV.3).16a

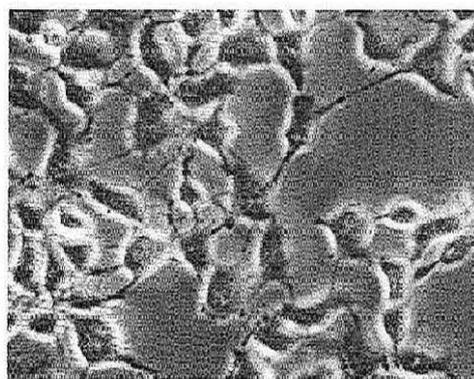


Figure (IV.3).16b

Couche pavementeuse de cellules endothéliales. Cellules endothéliales incubées avec le rotor cinnamylidène (2)-CONHGlu.

Les figures (IV.3).16a et 16b montrent, à titre de comparaison, le cliché de cellules témoins et le cliché 1h après le marquage de cellules qui ont été incubées (concentration 10^{-4} M, incubation 4 min) avec le traceur cinnamylidène (2)-CONHGlU. Il apparaît clairement sur la figure (IV.3).16b que la sonde cinnamylidène (2)-CONHGlU est nocive pour les cellules puisque ces dernières présentent une perte de leurs propriétés adhésives (décollement de la lamelle).

Le tableau (IV.3).1 récapitule les différents rotors employés, et le résultat des tests de toxicité.

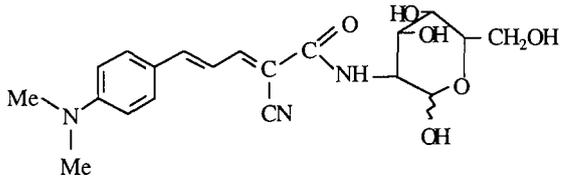
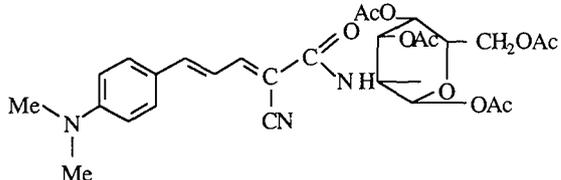
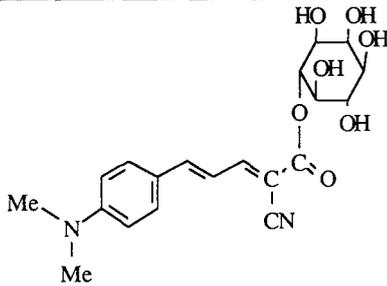
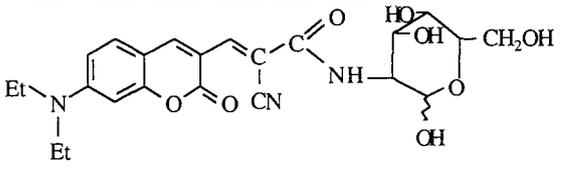
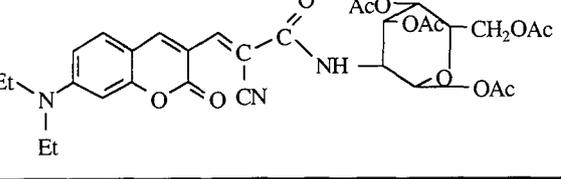
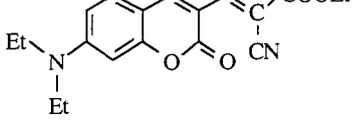
FORMULE DES DIFFERENTS ROTORS	NOM	RESULTAT DU TEST
	<i>Rotor glucidique cinnamylidène (2)-CONHGlU</i>	TOXIQUE (un grand nombre de cellules sont mortes : elles se rétractent et se décolent de la lamelle)
	<i>Rotor glucidique cinnamylidène acétylé (2)-CONHGlUAc</i>	TOXIQUE (un grand nombre de cellules sont mortes : elles se rétractent et se décolent de la lamelle)
	<i>Rotor (2)-inositol cinnamylidène</i>	TOXIQUE (un grand nombre de cellules sont mortes : elles se rétractent et se décolent de la lamelle)
	<i>Rotor glucidique coumarine CNCONHGlU</i>	TOXICITE FAIBLE (quelques cellules sont rétractées et mortes)
	<i>Rotor glucidique coumarine acétylé CNCONHGlUAc</i>	NON TOXIQUE (les cellules sont intactes et vivantes)
	<i>Rotor coumarine CNCOOET</i>	TOXICITE FAIBLE (quelques cellules sont rétractées et mortes)

Tableau (IV.3).1

Résultat des tests de toxicité effectués 1h après une incubation de 4 min.

L'analyse du tableau (IV.3).1 montre que quasiment toutes les sondes présentent une certaine toxicité, variable selon la structure du composé. Un dérivé cinnamylidène, portant un noyau benzénique sera plus toxique qu'un dérivé coumarine, la présence de l'inositol ou de la glucosamine ne semblant pas influencer sur ce paramètre, puisque le rotor CNCOOEt n'est pas plus toxique qu'un composé portant un groupement glucidique. Le groupement cyano, présent dans tous les cas, est peut-être aussi un facteur de toxicité. Il est également important de constater que même pour de faibles temps d'incubation (4 min) les rotors cinnamylidène présentent tous une toxicité importante, ce qui n'est pas le cas des rotors coumarine.

IV.3.4. CONCLUSION

Cette étude, menée essentiellement par microscopie optique de fluorescence, avait pour objectif de déterminer si les dérivés coumarine étaient des marqueurs spécifiques de systèmes cellulaires intacts, et de les comparer à d'autres traceurs glucidiques, synthétisés au laboratoire, mais n'ayant jamais fait l'objet d'applications pour des systèmes biologiques.

Les résultats nous ont permis de constater que les dérivés benzéniques (type cinnamylidène), bien que greffés sur des groupements glucidiques, ne s'incorporent pas au sein des cellules biologiques, même à des concentrations élevées et pour des temps d'incubation de plusieurs dizaines de minutes. De plus, ces composés apparaissent comme étant des traceurs fortement toxiques.

Par contre, nos dérivés coumarines, fixés ou non à un groupement glucidique, semblent être de bons marqueurs, puisqu'ils s'incorporent rapidement et de façon reproductible au sein des cellules endothéliales. Ceci n'est plus valable lorsque la glucosamine se trouve sous sa forme hydroxylée en raison d'une trop forte polarité qui ne lui permet pas de pénétrer au sein d'une structure lipidique. La concentration en sonde, nécessaire pour un marquage optimal est de $3 \cdot 10^{-5}$ M, concentration qui reste raisonnable pour éviter toute formation d'agrégats et qui ne semble pas affecter la viabilité cellulaire : cette concentration permet de ne pas dépasser le rapport 1 sonde/50 lipides [Arrigoni-Muller, 1988].

Du point de vue localisation, nous avons comparé le marquage obtenu avec nos rotors à cinq marqueurs témoins : le TMA-DPH, la fluorescamine, le styrylpyridinium, la rhodamine 123 et le DiOC₆.

Il apparaît clairement que le TMA-DPH et nos rotors marquent des sites totalement différents.

Par contre le marquage avec le rotor CNCOOEt semble se rapprocher du marquage avec le styrylpyridinium, mais des études complémentaires restent à entreprendre.

Quant au marquage du rotor CNCONHGluAc, il correspond à celui de la DiOC₆, nous sommes donc en présence d'un marqueur du réticulum endoplasmique.

IV.4. CONCLUSION

Le chapitre IV a fait l'objet de différentes applications de marquage de milieux biologiques à l'aide des différentes coumarines. Ces rotors sont :

- le dérivé coumarine-glucosamine hydroxylé CNCONHGlu,
- le dérivé coumarine-glucosamine acétylé CNCONHGluAc,
- le dérivé ester CNCOOEt.

La comparaison de ces trois sondes nous a permis de mettre en évidence l'influence du groupement glucidique dans les différents systèmes étudiés, mais également l'attrait des rotors fluorescents synthétisés dans ce travail qui semblent présenter un intérêt potentiel en biologie cellulaire.

Nous avons dans un premier temps incorporé ces trois marqueurs au sein de liposomes de DPPC afin de caractériser leur température de transition. Une très grande différence de comportement est apparue entre les traceurs glucidiques et le dérivé ester, mais également entre les rotors glucidiques hydroxylé et acétylé.

A ce stade de notre étude, nous avançons l'hypothèse que le rotor CNCOOEt, ne s'incorporait pas entre les phospholipides de DPPC, et que le rotor glucosamine acétylé était bien plus efficace que le rotor hydroxylé.

En seconde partie, nous avons étudié le comportement de ces traceurs au sein d'une monocouche de cellules endothéliales. Nous avons pu confirmer que la sonde acétylée était un marqueur beaucoup plus efficace, puisque moins polaire, que son homologue hydroxylé.

Cette étude nous a également permis de démontrer que la présence d'un groupement glucidique polaire sur une chaîne hydrophobe, comme c'est le cas pour le composé cinnamylidène, n'est pas un facteur clé pour obtenir un traceur ayant une spécificité vis-à-vis des composants cellulaires.

La nouveauté est venue du rotor coumarine CNCOOEt, qui s'est montré d'un grand intérêt vis-à-vis des cellules endothéliales alors qu'il était totalement inefficace lors de l'étude de liposomes de DPPC. Il est clair que la complexité des cellules n'a rien à voir avec celle des liposomes, même si ceux-ci sont considérés comme des membranes modèles, ce qui peut signifier que le rotor coumarine CNCOOEt est spécifique de structures absentes des phospholipides de DPPC. Cette sonde ne semble pas suivre de manière stricte le marquage mitochondrial visible avec la rhodamine 123, ni le marquage réticulaire. Le résultat le plus encourageant est le lien possible avec le marquage membranaire du styrylpyridinium : cette hypothèse reste à confirmer par d'autres études.

Le rotor coumarine CNCONHGluAc apparaît clairement comme étant un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique et la double potentialité des rotors moléculaires, variation en fonction de la polarité et de la viscosité, permettrait alors de suivre les modifications métaboliques survenant dans cet organe subcellulaire.

ANNEXE DU CHAPITRE IV

Description du CELLscan™ et obtention d'une image de fluorescence 3D

A.IV.1. PRINCIPE

Cette technique utilise un microscope optique conventionnel associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images, permettant de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions (figure (A.IV.1).1).

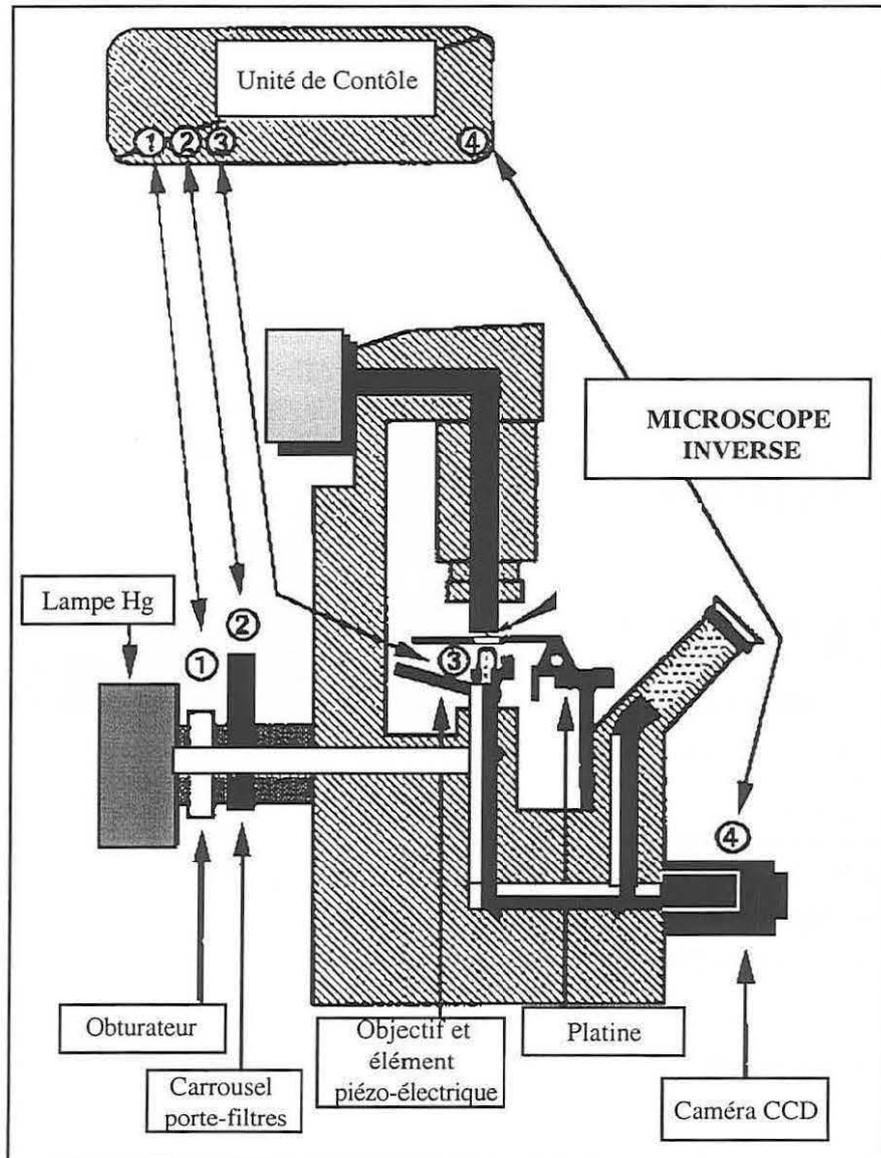


Figure (A.IV.1).1

Représentation du microscope optique équipé du système CELLscan™.

A la différence de l'approche confocale, l'objet est illuminé en entier. Cette technique a été développée pour contourner les problèmes liés à l'utilisation de la microscopie confocale :

- vitesse de balayage du laser insuffisante pour suivre des cinétiques rapides (Ca^{2+}),
- concentration du faisceau laser en un point de focalisation entraînant une photodégradation du traceur fluorescent.

A/ Acquisition de coupes 2D (module d'acquisition)

En déplaçant le plan focal à travers l'échantillon, grâce à un système de déplacement en z par moteur ou piézo-électrique, une série d'images 2D est acquise le long de l'axe optique, chacune contenant des informations de son plan focal (partie "nette") et de tous les autres plans (partie "floue"). La partie nette de l'image correspond aux informations relatives au plan focal, le flou dans l'image provient des informations de tous les autres plans. Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié (figures (A.IV.1).2 et 3).

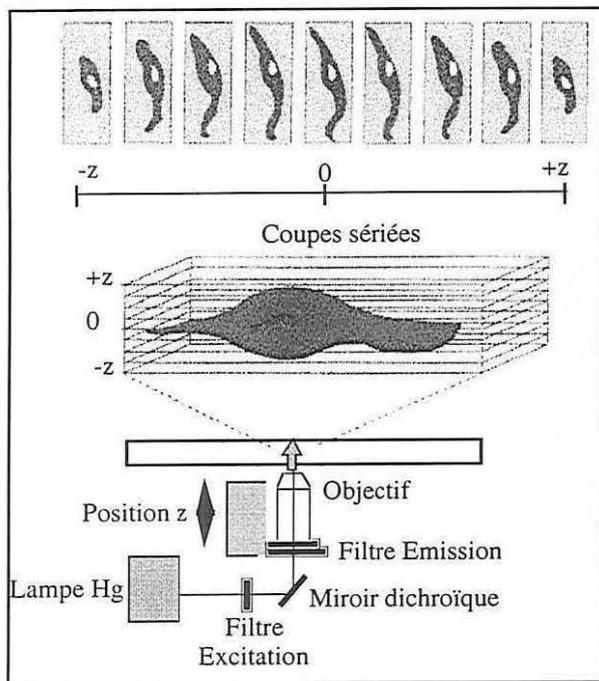


Figure (A.IV.1).2

Acquisition des images x et y selon l'axe z
(pas maximum de 0,25 μm).

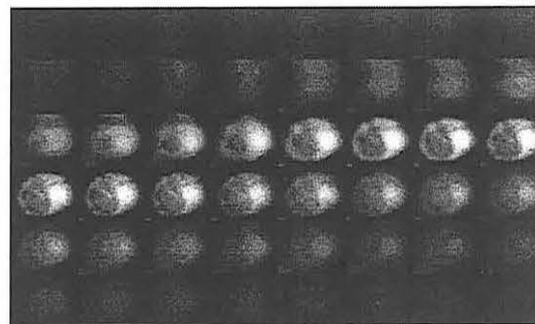


Figure (A.IV.1).3

Capture des plans x et y d'une cellule marquée
avec le rotor coumarine CNCONHGluAc
(pas de 0,25 μm).

B/ Déflouage des coupes 2D (module de traitement)

En microscopie optique, chaque image contient des informations des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. Afin de supprimer l'information située en dehors du plan de focalisation, il est nécessaire de bien connaître les propriétés optiques de formation d'images en mesurant ou calculant la fonction de transfert optique (ou "point spread function", PSF) du système complet (microscope/détecteur). Le volume de données est traité informatiquement par des algorithmes de déconvolution, fondés sur l'équation classique de formation optique des images en utilisant la fonction de transfert préalablement déterminée.

i/ Restauration d'images

Le traitement d'images concerne la manipulation et l'analyse d'images (restauration, reconstruction et réhaussement ; numérisation et compression ; description et reconnaissance de formes). Le but de la restauration d'image est de retrouver la scène originelle à partir d'observations dégradées. Ces techniques sont orientées vers la modélisation des phénomènes de dégradation (défocalisation, bruit) et l'application de procédures inverses afin d'obtenir une approximation de la scène originale.

Les différentes approches de restauration dépendent de l'hypothèse particulière faite à propos du modèle de dégradation et de formation de l'image (modèle linéaire ou non linéaire avec un bruit additif ou dépendant du signal). Les origines mathématiques de la restauration d'images sont intimement liées au domaine des équations intégrales car le principe physique d'un modèle linéaire de formation d'image peut se décrire par une intégrale de convolution. Le problème à la base de la restauration d'image est de construire une estimation de l'objet observé en utilisant l'image de la PSF (description de la façon dont un système optique spécifique déforme le signal d'un objet ponctuel qui a son origine en dessous ou au-dessus du plan focal de netteté : (figure (A.IV.1).4 et 5)).

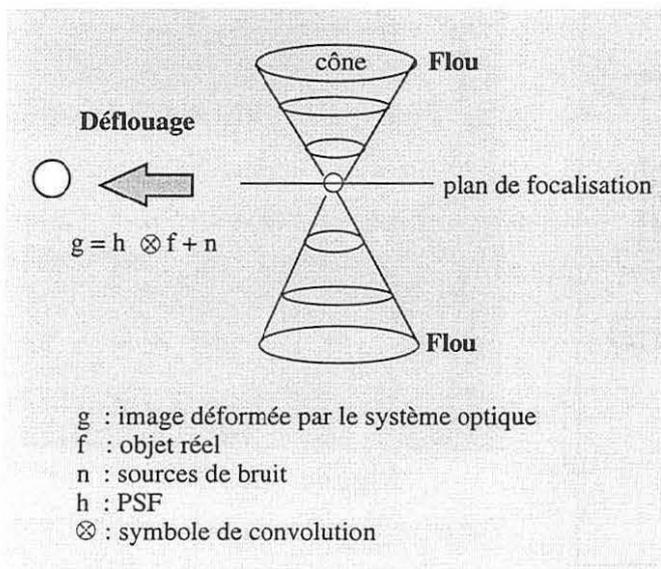


Figure (A.IV.1).4
 Restauration d'images :
 déconvolution numérique.

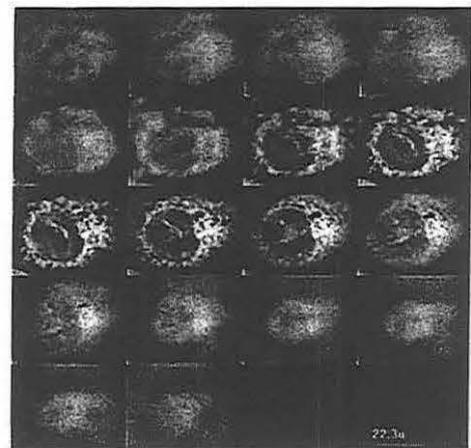


Figure (A.IV.1).5
 Déflouage des plans x et y capturés.

ii/ Fonction de transfert optique (PSF)

La fonction de transfert optique décrit comment une source ponctuelle est déformée lorsqu'elle est imagée par un système optique. La source ponctuelle est en général transformée en une tache diffuse qui est due à la limite de diffraction du système. Elle dépend de plusieurs paramètres (ouverture numérique de l'objectif, optiques, alignement de la source d'excitation, indice de réfraction du milieu intra-échantillon et du milieu à immersion, longueur d'onde d'émission...).

La réponse en fréquence, ou fonction de transfert optique (OTF) est fréquemment utilisée pour caractériser un système optique. L'OTF 3D est la transformée de Fourier en trois dimensions de la PSF.

iii/ Mesure de la fonction de transfert

La PSF est généralement mesurée à partir de billes fluorescentes dont le diamètre est inférieur à la limite de résolution du système.

C/ Reconstruction volumique de l'objet

Le principe repose sur l'acquisition d'un ensemble d'images 2D en déplaçant le plan focal jusqu'à ce que l'on ait traversé tout l'objet. La modélisation de la chaîne d'acquisition complète permettra de traiter ces images afin d'obtenir une estimée 3D de l'objet (figures (A.IV.1).6, 7 et 8).

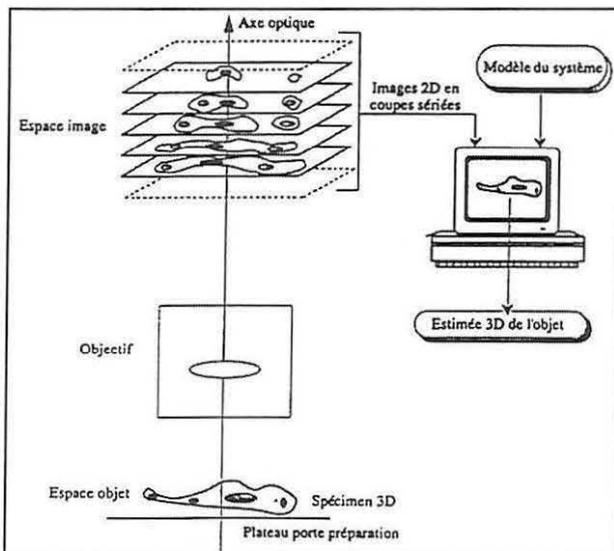


Figure (A.IV.1).6

Reconstruction volumique de l'échantillon.

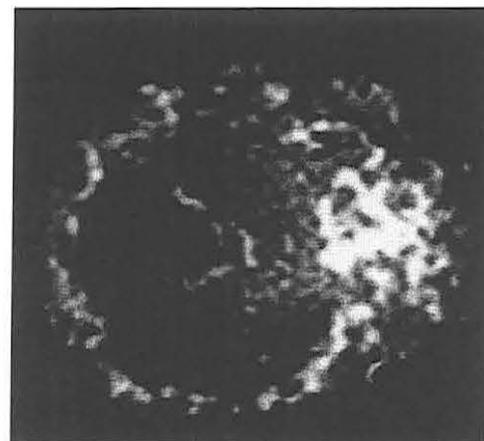


Figure (A.IV.1).7

Vue en volume de cellules endothéliales marquées avec le rotor CNCONHGluAc.

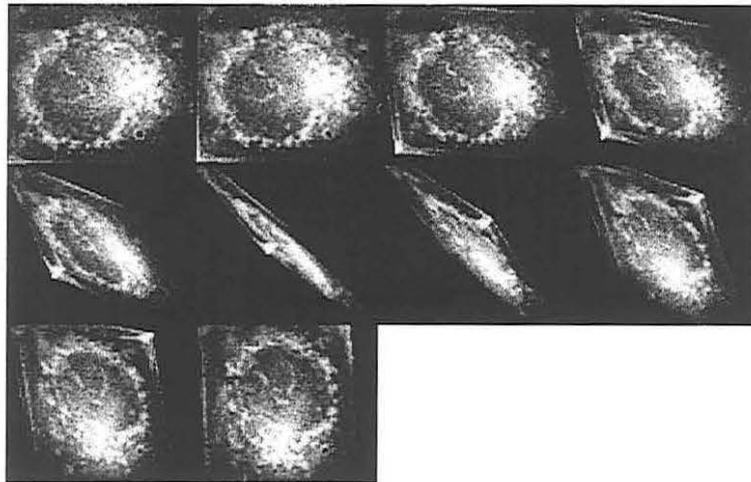


Figure (A.IV.1).8

Rotation par pas de 18° de la vue en volume.

A.IV.2. DECONVOLUTION EPR

Sur le principe des acquisitions par "coupes optiques", le système CELLScan™ met en œuvre une étape de déconvolution numérique à l'aide d'algorithmes. CELLScan™ fait appel à une technologie de pointe en matière de corrections d'images : l'EPR ("Exhaustive Photon Reassignment") ou restitution quantitative des photons issus d'un point source à leur plan d'origine. Elle consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes, qui conduit à une déconvolution 3D itérative. Cette méthode de restauration d'image est née de la collaboration du Pr. Fay (University of Massachusetts Medical Center) et d'un industriel CSPI-Scanalytics. Cet algorithme est l'un des premiers mis sur le marché et donne de bons résultats : il est très utilisé en restauration d'images de fluorescence. L'algorithme nécessite la connaissance préalable de la PSF du système, mesurée en plusieurs points du champ à l'aide de sources ponctuelles calibrées afin d'évaluer les déformations spécifiques (aberration) du système complet. Cette fonction décrit la façon dont le système optique déforme le signal d'un objet ponctuel qui a son origine au-dessus ou au-dessous du plan de netteté. Pour chaque image, les photons "défocalisés" sont évalués et réinsérés à leur point d'origine. Dans la méthode de l'EPR, les propriétés de distorsion et de profondeur de champ du microscope sont analysées mathématiquement afin d'obtenir des images plus nettes et plus contrastées.

La qualité du déflouage (déconvolution des plans 2D à l'aide de l'algorithme EPR) dépend directement des paramètres : convergence (10^{-5} recommandé), itération (entre 20 et 100), lissage (15) et essentiellement de la qualité du fichier PSF.

A.IV.3. PSF

La PSF (réponse impulsionnelle) caractérise la fonction de transfert du microscope pour des conditions expérimentales particulières, propres à chaque expérience (incrément entre chaque plan, ouverture numérique, milieu de montage, objectif, filtres, traceurs fluorescents, longueurs d'onde...). On utilise des billes fluorescentes en latex dont la longueur d'onde d'émission est la même que celle des spécimens biologiques à étudier. La taille des billes doit être inférieure à la limite de résolution du microscope. Théoriquement, elles devraient être aussi petites que possible et posséder l'intensité la plus forte possible (quasi Dirac). D'après la littérature, on adopte communément le compromis suivant : le diamètre de la bille (D_{bille}) doit être inférieur ou égal à la moitié du diamètre du premier disque d'Airy ou encore $D_{\text{bille}} = 0,61 (\lambda/NA)$.

Une fois le diamètre de la bille déterminé en fonction de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique ($D_{\text{bille}} \leq 0,25 \mu\text{m}$ pour $\lambda = 530 \text{ nm}$ et $NA = 1,25$), la préparation de billes (suffisamment diluée) est placée sur la lame (ou entre lame et lamelles, comme le spécimen). On fait l'acquisition de la PSF du bas vers le haut de la bille afin de minimiser l'influence du "bleaching". La normalisation permet d'avoir la même quantité d'énergie lumineuse dans chacun des plans et de compenser un éventuel "bleaching" du signal et/ou le papillotement de la source d'excitation.

A.IV.4. PROFONDEUR DE CHAMP ET ECHANTILLONNAGE 3D

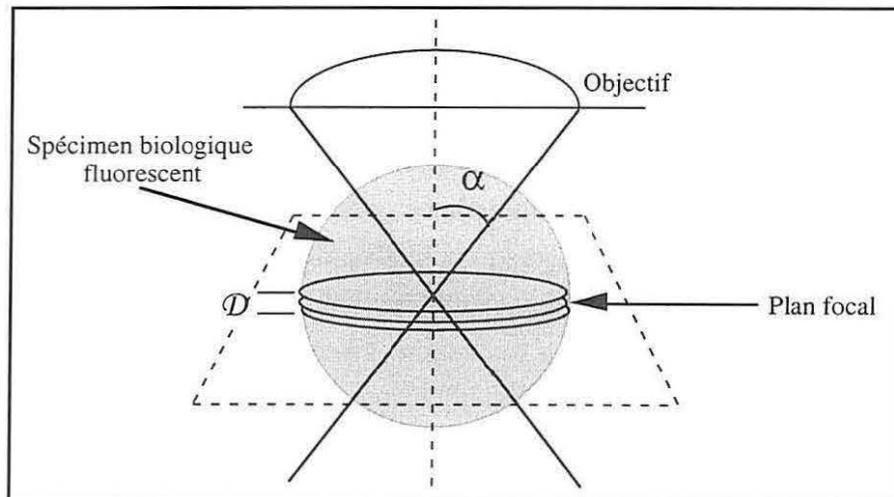


Figure (A.IV.4).1
Profondeur de champ d'un objet.

La profondeur de champ d'un objectif peut être exprimée par la relation :

$$D = \lambda / (4 n \sin^2(\alpha/2)) \text{ avec } \alpha = \sin^{-1} (NA/n)$$

Cette profondeur de champ représente la distance physique le long de l'axe optique à travers laquelle le spécimen biologique fluorescent observé se trouve focalisé. Il s'agit du déplacement possible selon l'axe z d'un point de l'objet avant que l'image ne change. Pour un objectif x100, NA = 1,25 et $n = 1,515$, pour $\lambda = 530$ nm, $D = 0,4$ μm . Certains auteurs considèrent qu'il n'est pas utile d'échantillonner selon l'axe z avec un pas inférieur à la profondeur de champ, mais d'autres affirment qu'une infinité de plans selon z est nécessaire pour arriver à une reconstruction correcte de l'objet.

Avec les caractéristiques de l'objectif ci-dessus, à 530 nm, le pas d'échantillonnage théorique est de $\delta_z = 0,248$ μm et $\delta_x = \delta_y = 0,09$ μm . En pratique, $\delta_z = 0,125$ μm (ou 0,25 μm) et $\delta_x = \delta_y = 0,06$ μm pour l'utilisation de la caméra en binning 1. Ces valeurs respectent, pour cet objectif, les conditions énoncées dans le théorème de Shannon appliqué au microscope. En "binning" 2, $\delta_z = 0,25$ μm et $\delta_x = \delta_y = 0,12$ μm , ce qui reste satisfaisant.

CHAPITRE V

IMAGERIE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE

V.1. INTRODUCTION	181
V.2. LA MICROSCOPIE EN CHAMP PROCHE - HISTORIQUE ET PRINCIPE	183
V.2.1. LA MICROSCOPIE A EFFET TUNNEL : STM	183
V.2.2. LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE : AFM	184
<i>A/ Le mode contact</i>	186
<i>B/ Le mode dynamique (ou résonnant)</i>	186
<i>C/ Le mode "Tapping"</i>	187
<i>D/ Le mode "Shear Force"</i>	188
V.2.3. LA MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE : SNOM.....	189
<i>A/ De la microscopie optique conventionnelle à la microscopie optique à sonde locale</i>	189
<i>B/ Description rapide du principe de fonctionnement des microscopes optiques en champ proche</i>	191
<i>i/ Les ondes évanescentes</i>	191
<i>ii/ Distance sonde-objet et résolution</i>	192
<i>C/ Les différents types de microscopies optiques en champ proche</i>	192
<i>i/ Illumination locale : Mode illumination</i>	192
<i>ii/ Collection locale : Mode collection</i>	194
<i>iii/ Le microscope à effet tunnel optique : PSTM</i>	196
<i>D/ Les sondes optiques utilisées par les SNOM</i>	198
<i>E/ Couplage des différentes techniques de champ proche</i>	199
<i>F/ Les limites du champ proche</i>	200
<i>G/ Les domaines d'application</i>	201
<i>i/ La polarisation</i>	202
<i>ii/ Les cristaux liquides</i>	204
<i>iii/ Détection de molécules isolées par fluorescence</i>	205
<i>iv/ Position actuelle dans le domaine de la biologie</i>	207
V.3. EVOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE VERS DES APPLICATIONS D'INTERET BIOLOGIQUE	210
V.3.1. IMAGES TOPOGRAPHIQUES ET OPTIQUES	210
<i>A/ Matériels et méthodes</i>	210
<i>i/ Description du microscope "Aurora" commercialisé par TopoMetrix</i>	210
<i>ii/ Caractéristiques du matériel utilisé</i>	212
<i>ii/ Protocole de fixation des cellules biologiques de type fibroblastes et lymphoblastes</i>	212
<i>B/ Images topographiques</i>	213
<i>i/ Caractérisation de surfaces planes</i>	213
<i>ii/ Images topographiques d'échantillons "mous"</i>	214

<i>C/ Images optiques</i>	215
<i>i/ Par transmission du signal</i>	215
<i>ii/ Par réflexion du signal</i>	216
<i>iii/ Application à des échantillons biologiques</i>	217
<i>iv/ Etude en milieu aqueux</i>	220
V.3.2. IMAGERIE PAR FLUORESCENCE	222
<i>A/ Matériels et méthodes</i>	222
<i>i/ Modifications apportées au microscope "Aurora"</i>	222
<i>ii/ Caractéristiques du matériel utilisé</i>	223
<i>B/ Observation de cellules biologiques</i>	224
V.4. CONCLUSION	225

V.1. INTRODUCTION

Jusqu'aux années cinquante, microscopie était synonyme de microscopie optique conventionnelle. Ce type de microscopie, fort de ses quatre siècles d'existence (le tout premier microscope optique est attribué à Zacharias Jansen, 1595, Hollande) n'a cessé (et ne cesse) d'évoluer et d'atteindre des performances impressionnantes. Malgré toutes ses qualités, cette microscopie a toujours été confrontée à un mur réputé infranchissable : la limite de diffraction théorique (critère de Rayleigh) qui ramène la résolution latérale des appareils à une demi-longueur d'onde de la lumière incidente. Dans les années cinquante, l'apparition de la microscopie électronique, dont le principe avait déjà été proposé par Knoll en 1935, révolutionna la microscopie. Souvent moins souple d'utilisation que la microscopie optique (échantillon sous vide, obligatoirement conducteur, appareillage imposant et encore coûteux...), elle permit rapidement d'atteindre des résolutions nanométriques. Ce type de microscope peut être véritablement considéré comme un microscope optique dont les lentilles ont été remplacées par des lentilles magnétiques et dont la source lumineuse a été remplacée par un faisceau d'électrons ($\lambda_{\text{électron}} \ll \lambda_{\text{photon}}$) : c'est en diminuant la longueur d'onde que l'on a amélioré la résolution latérale. Néanmoins, la résolution de tels systèmes atteint rarement la longueur d'onde, qui peut être de quelques picomètres à haute énergie. L'effet de la diffraction est en effet souvent négligeable par rapport aux aberrations géométriques, aux instabilités mécaniques, aux difficultés techniques pour focaliser fortement le faisceau d'électrons sur l'échantillon, et au danger de travailler à haute densité d'énergie (risque de destruction de l'échantillon).

Dès le début du siècle, on se demanda alors s'il était possible d'éviter l'effet de la diffraction en empêchant l'effet de la propagation des ondes en champ lointain. L'idée générale était de sonder directement l'échantillon à une distance très faible de la surface ($\ll \mu\text{m}$) à l'aide d'une sonde matérielle de taille inférieure au micromètre : la résolution latérale ne serait alors pas limitée par la longueur d'onde, mais par la taille de la sonde. En 1928, Synge proposa en effet d'utiliser une ouverture nanométrique dans un écran métallique pour éclairer localement l'échantillon. Cette petite ouverture, approchée à une très faible distance de la surface de l'échantillon agirait comme une nanosource qui sélectionnerait optiquement une petite zone de l'échantillon : l'idée de la microscopie en champ proche (ou à sonde locale) était née.

Jusque dans les années 80, cette idée de sonde locale n'a pu être mise en œuvre pour des raisons techniques, la nanotechnologie étant alors loin d'être maîtrisée : fabriquer de telles sondes et contrôler d'aussi faibles distances et déplacements étaient alors impossibles. Au début des années 80, grâce au développement de systèmes de déplacement à base de céramiques piézo-électriques, la microscopie en champ proche apparut sous trois formes remarquables : la microscopie à effet tunnel, la microscopie à force atomique et la microscopie optique en champ proche. Ces microscopes, fondés sur un principe commun, totalement innovant, n'utilisent pas de lentilles, mais une sonde appropriée pour "éclairer" ou aller chercher l'information au voisinage immédiat de l'objet.

Si en microscopie traditionnelle l'image est obtenue instantanément grâce à l'objectif, les microscopes à sonde locale sont des microscopes à balayage, où l'image est construite point par point en déplaçant la sonde successivement sur tous les points de l'objet.

Si la sonde est métallique et mesure un courant tunnel on parle de STM (Scanning Tunneling electronic Microscope) ; si la sonde mesure une force on obtient un microscope à force atomique (Scanning Atomic Force Microscope) ; enfin lorsque la sonde émet ou détecte de la lumière, il s'agit d'un microscope optique en champ proche dont le sigle générique est SNOM (Scanning Near-field Optical Microscope).

Il me semblait important, avant de commencer la description et la discussion de nos résultats, de décrire les différentes familles de microscopies en champ proche, dans la mesure où ce travail représente la première contribution du DCPR-GRAPP dans ce domaine. Notre objectif étant de développer la microscopie optique en champ proche pour des applications en biologie, nous décrivons ensuite dans ce chapitre, l'évolution de notre recherche et de nos résultats.

V.2. LA MICROSCOPIE EN CHAMP PROCHE - HISTORIQUE ET PRINCIPE

V.2.1. LA MICROSCOPIE A EFFET TUNNEL : STM

A la fin des années 20, l'effet tunnel d'électrons au travers de la barrière de potentiel constituée par l'espace vide entre deux solides a été prévu par Fowler et Nordheim (1928) et Frenkel (1930), repris en 1982, par le Laboratoire de Recherche d'IBM-Zürich qui annonce le contrôle de cet effet et son utilisation dans la réalisation d'un microscope capable d'atteindre une résolution latérale de 0,2 nm [Binnig, 1982]. Ils nomment ce système STM (Scanning Tunneling Microscope). Le principe de ce microscope est décrit sur la figure (V.2).1. Une pointe métallique, en général en tungstène, dont l'extrémité en interaction avec l'échantillon est constituée d'un ou de quelques atomes est approchée de la surface d'un échantillon conducteur.

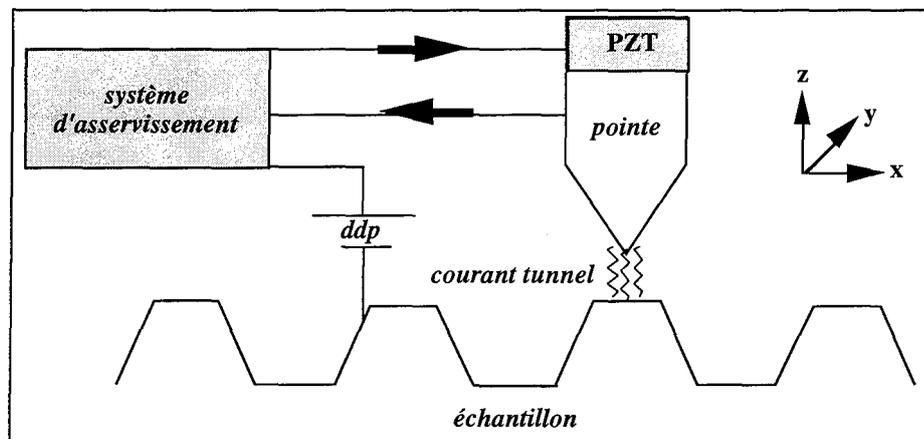


Figure (V.2).1

Principe du microscope à effet tunnel.

Si une faible différence de potentiel (ddp) est appliquée entre la pointe et l'échantillon et si la distance pointe-échantillon est suffisamment faible (typiquement < 1 nm) un courant électrique apparaît, correspondant à des électrons qui sont passés par effet tunnel de l'échantillon à la pointe et qui sont mis en mouvement par la ddp . Ce courant tunnel très faible (quelques nA), est une fonction exponentielle de la distance pointe-échantillon, ce qui le rend très sensible à celle-ci : une variation de cette distance de 0,1 nm change l'intensité du courant tunnel d'un ordre de grandeur. A l'aide de céramiques piézo-électriques, on effectue un balayage x, y très précis de la pointe au-dessus de l'échantillon afin de construire point par point une image de celui-ci. A chaque point, le courant tunnel est mesuré avec précision.

Deux principaux modes d'utilisation du microscope sont possibles :

- Le mode à "courant constant" : un système d'asservissement permet au cours du balayage de maintenir le courant tunnel constant en réglant la distance entre la pointe et l'échantillon à l'aide d'un transducteur piézo-électrique (PZT) solidaire de la sonde. Le signal de sortie de l'asservissement (tension appliquée au PZT) fournit directement une cartographie de la topographie de surface de l'échantillon.
- Le mode dit à "hauteur constante" : dans ce cas, l'asservissement n'est pas utilisé et ce sont les variations du courant tunnel en fonction de la position x , y de la pointe qui donnent des informations sur l'échantillon. Ce mode présente l'avantage d'éviter l'asservissement électronique et ses problèmes de gain, de stabilité et de rapidité, mais son utilisation augmente le risque d'abîmer la pointe et l'échantillon au cours du balayage.

L'information obtenue par STM est principalement topographique, la valeur du courant tunnel dépendant essentiellement de la distance pointe-échantillon. Néanmoins, d'autres paramètres peuvent modifier notablement le courant tunnel, tels que la densité locale d'états électroniques de surface ou la composition chimique locale ; de telles informations sont donc accessibles par STM, et se mélangent même souvent aux informations de relief. Les premières images obtenues par STM [Binnig, 1982], sont impressionnantes par leur résolution latérale. Depuis, la microscopie à effet tunnel s'est développée et est devenue l'un des principaux outils de caractérisation d'échantillons nanométriques. Les meilleures résolutions atteintes grâce au STM sont de l'ordre de 5 picomètres en z et de 0,1 nanomètre en x , y , cette résolution transversale dépendant fortement de la forme et de la taille de l'extrémité de la pointe. Le STM permet de travailler à l'air ambiant, mais son principal inconvénient est qu'il est nécessaire que l'échantillon soit conducteur ; c'est pourquoi il est indispensable de déposer une fine couche de métal (en général de l'or) sur la surface des échantillons isolants.

Outre l'étude et l'imagerie de surface, le STM trouve de très belles applications dans de nombreux domaines tels que la nanolithographie par oxydation locale et contrôlée [Hiroyuki, 1993] et la nanoécriture sur couche d'or [Lebreton, 1994].

Le STM valut le prix Nobel de Physique en 1986 à Binnig et Rohrer d'IBM-Zürich.

V.2.2. LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE : AFM

En 1986, Binnig, Quate et Gerber présentent le microscope à force atomique [Binnig, 1986]. Ils le nomment "Atomic Force Microscope" (AFM). Binnig et Gerber étant deux des co-inventeurs du STM, ils profitèrent sans doute de leur expérience de la nanotechnologie pour la réalisation de l'AFM. L'AFM qui peut aussi être décrit dans la littérature sous l'appellation SFM (Scanning Force Microscope), utilise une pointe solidaire d'un levier, jouant le rôle d'un ressort, pour détecter les forces qui s'exercent entre l'extrémité de la pointe et les atomes de l'échantillon.

Ces forces sont d'origines diverses mais peuvent se regrouper en deux classes distinctes : les forces à courte portée et les forces à longue portée.

- Le premier groupe concerne les forces qui agissent sur le levier lorsque la pointe est à moins de 2 nm de la surface de l'échantillon. Il comprend surtout les forces répulsives, dues au recouvrement des nuages électroniques des atomes de l'échantillon et de la sonde, empêchant la pénétration de celle-ci dans l'échantillon ; mais également, dans une moindre mesure, les forces attractives de liaisons de covalence (mise en commun d'électrons), les forces de friction agissant parallèlement à la surface et causant une torsion du levier, et les forces de déformation notamment dues à l'élasticité et à la plasticité de la pointe ou de l'échantillon.
- Le second groupe est composé de forces agissant jusqu'à environ 15 nm de l'échantillon. Il s'agit essentiellement de forces de Van der Waals et de forces de capillarité, ces deux forces attractives étant notamment dues à la présence naturelle d'une fine couche d'eau tapissant la surface de l'échantillon, mais aussi de forces magnétiques ou électrostatiques.

La figure (V.2).2 représente la courbe typique des forces agissant sur le levier via la pointe pour différentes distances pointe-échantillon. Remarquons qu'à "grande" distance (> 1 nm), les forces attractives dominent alors qu'elles sont négligeables par rapport aux forces répulsives lorsque la pointe est à moins d'un nanomètre de la surface de l'échantillon.

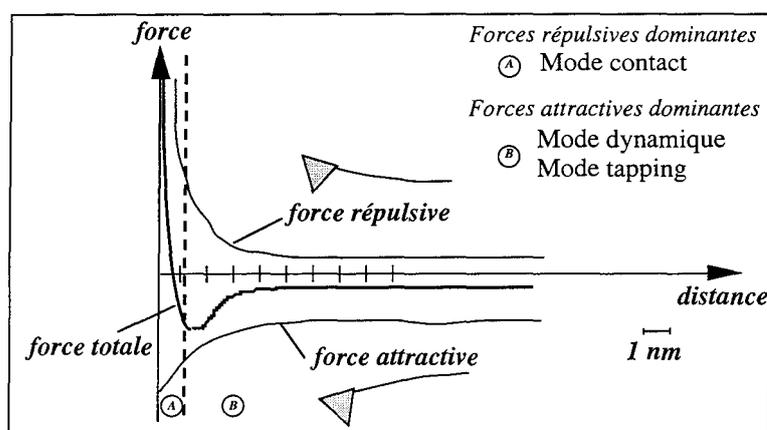


Figure (V.2).2

Force détectée par une sonde AFM en fonction de la distance pointe-échantillon, résultant de la superposition des forces attractives et des forces répulsives.

Actuellement, l'utilisation de l'AFM se fait selon quatre principaux modes. Ces modes se différencient par la nature de la force atomique détectée (attractive, répulsive, latérale...) et par la façon d'utiliser la pointe (vibration ou non).

A/ Le mode contact

Dans ce mode (figure (V.2).3), on détecte les forces répulsives entre la pointe et l'échantillon dues au recouvrement des nuages électroniques. Ces forces provoquent la déflexion du levier qui est mesurée avec précision à l'aide d'un faisceau laser qui se réfléchit sur le bras de levier de la pointe, et est détecté par une photodiode à quadrants, comme indiqué sur la figure (V.2).3. L'extrémité de la pointe touche donc véritablement l'échantillon, comme le diamant d'un tourne-disque le fait pour le disque. Les forces mises en jeu sont tellement faibles que ce mode s'avère en général non destructif. Au cours du balayage x, y de l'échantillon, la déflexion du levier est très dépendante de la topographie locale. Une boucle d'asservissement, agissant sur un transducteur piézo-électrique solidaire de l'échantillon et perpendiculaire à sa surface, permet de maintenir constante la déflexion du levier. Le signal de sortie de cette boucle fournit directement une image de la topographie de l'échantillon ; on dit alors que l'on travaille à force constante. Comme pour le STM, on peut également travailler à hauteur constante en ouvrant la boucle et en mesurant directement la déflexion du levier au cours du balayage.

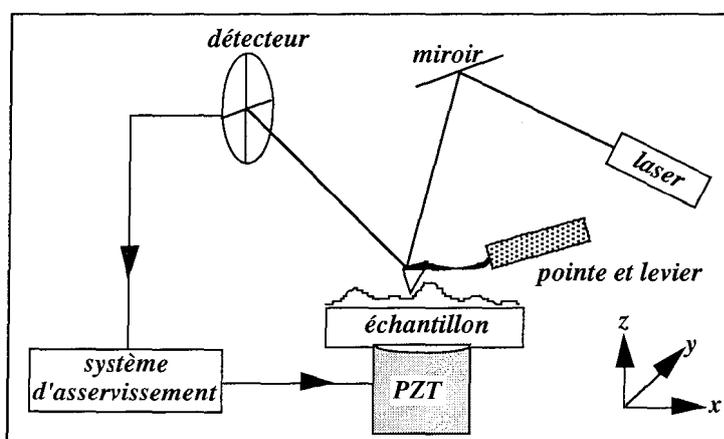


Figure (V.2).3

Principe du microscope à force atomique en mode contact.

Les pointes utilisées sont souvent de forme pyramidale et sont en général en nitrure de silicium (Si_3N_4) ou en silicium (Si) ; elles peuvent aussi être en or ou en diamant. La raideur des leviers utilisés est inférieure à 1 N/m, les forces détectées sont plus faibles que 10^{-9} N et les résolutions latérales obtenues sont atomiques. Le mode contact, présentant la meilleure résolution latérale, est le plus utilisé des modes AFM ; c'est celui qui fut présenté par Binnig et al., en 1986.

B/ Le mode dynamique (ou résonnant)

Ce mode est décrit pour la première fois en 1987 par Martin, Williams et Wickramasinghe d'IBM, New York. Dans ce cas, on fait vibrer le levier à une fréquence très proche de sa résonance (typiquement plusieurs dizaines de kHz), perpendiculairement à la surface de l'échantillon avec une amplitude d'environ 1 nm (figure (V.2).4).

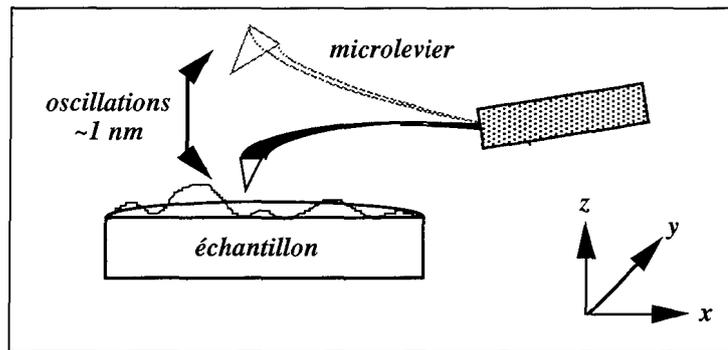


Figure (V.2).4

Principe du microscope à force atomique en mode résonnant.

Le gradient de force étant très dépendant de la distance pointe-échantillon, les variations de l'amplitude de vibration observées pendant le balayage x, y de l'échantillon fournissent une image de la topographie de surface de l'objet. Là aussi, une boucle d'asservissement peut être utilisée pour travailler à une amplitude de vibration constante.

Ce type d'AFM, qui utilise des raideurs de levier de quelques N/m, permet de mesurer des gradients de force inférieurs à 10^{-5} N/m, et d'imager des échantillons avec une résolution latérale de quelques nanomètres.

Comme ce microscope travaille avec des forces atomiques attractives, l'extrémité de la pointe reste "éloignée" de quelques nanomètres de l'échantillon, ce qui, par rapport à l'AFM de contact, limite sa résolution latérale mais diminue les risques d'endommagement de la pointe et de l'échantillon.

C/ Le mode "Tapping"

Ce mode, récemment imaginé [Zhong, 1993], résulte d'une combinaison entre le mode contact et le mode dynamique. Comme pour le mode dynamique, la pointe vibre perpendiculairement à la surface de l'échantillon mais avec une raideur de levier plus importante (de 10 à 100 N/m) et une amplitude de vibration de plusieurs dizaines de nanomètres. Ces différences permettent à la pointe de traverser périodiquement la couche attractive (eau, Van der Waals...) et de "taper" sur la surface de l'échantillon. Dans ce mode, ce sont donc les forces atomiques répulsives qui entrent principalement en jeu. Les importantes raideurs de levier et les amplitudes d'oscillation perpendiculairement à la surface de l'échantillon limitent la sensibilité en z . Cependant, elles permettent d'être peu sensibles à des forces peu connues et souvent destructrices telles que la viscosité et la friction qui n'agissent que dans la région très proche de l'échantillon dans laquelle la pointe ne reste qu'un court instant par rapport à sa période de vibration ; ceci confère au mode "tapping" la possibilité de travailler dans des milieux liquides [Hansma, 1994]. Ce mode de fonctionnement est donc le principal mode utilisé pour des applications dans le domaine biologique [Kuznetsov, 1996] qui nécessite parfois de travailler en milieu tamponné.

D/ Le mode "Shear Force"

Ce mode a été imaginé en 1992 [Betzig, 1992]^a par les utilisateurs de microscopies optiques en champ proche qui avaient besoin d'une technique AFM utilisant leurs sondes optiques, ces dernières étant des pipettes en verre [Toledo-Crow, 1992] ou des fibres optiques monomodes [Betzig, 1992]^a. Vu la géométrie effilée et fragile de telles sondes, il était alors impensable de les utiliser comme un levier se déplaçant perpendiculairement à la surface de l'échantillon. Ces auteurs eurent alors l'idée d'un mode résonnant où la sonde vibre de quelques nanomètres à sa fréquence de résonance, mais cette fois parallèlement à la surface de l'échantillon (figure (V.2).5).

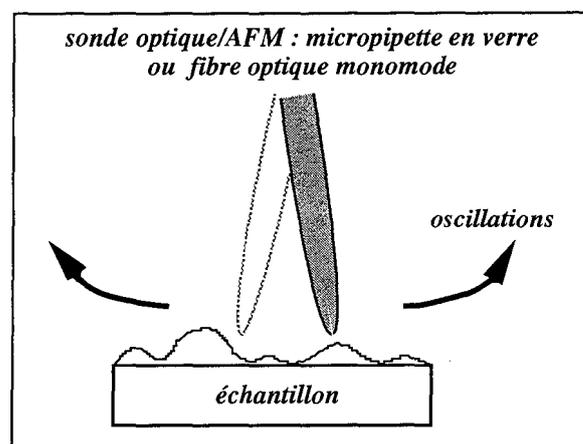


Figure (V.2).5

Principe du microscope à force atomique en mode "shear force".

Cet AFM est sensible à des forces latérales dites de cisaillement dont la nature est encore assez peu connue. Bien que ce mode fournisse de belles topographies, sa résolution latérale est limitée à quelques nanomètres qui suffisent d'ailleurs à la microscopie optique en champ proche qui, comme nous le verrons, est encore loin de la résolution atomique.

Les techniques AFM, pour la plupart, fonctionnent à l'air ambiant et possèdent l'avantage par rapport au STM de pouvoir caractériser des échantillons aussi bien isolants que conducteurs. Utilisé en imagerie, l'AFM fournit une information essentiellement topographique. De plus, l'AFM étant sensible à des forces de toutes natures, il permet de les étudier et de les mesurer avec précision. Notons que l'existence de cette grande gamme de forces rend parfois délicate l'interprétation des images, et rappelons que ce type de microscope est très sensible à la couche d'eau qui recouvre naturellement la surface des échantillons et qui est à l'origine de la plupart de ces forces, l'épaisseur de cette couche variant de 5 à 50 nanomètres selon le taux d'humidité de l'air.

V.2.3. LA MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE : SNOM

Nous nous limiterons, dans cette présentation de la microscopie optique en champ proche aux microscopes utilisant une "ouverture optique". Les microscopies à sondes locales dites "sans ouverture", traduction de l'expression anglo-saxonne "Apertureless Microscopy" sont actuellement moins développées bien qu'elles présentent un potentiel certain comme l'indiquent les descriptions faites dans plusieurs ouvrages [Bachelot, 1996 ; de Fornel, 1998].

A l'heure actuelle, les systèmes à ouverture, forts de leurs dix années d'expérience, constituent la famille largement dominante de la microscopie optique en champ proche, tant par les performances atteintes que par les applications qui en ont découlé. Bien que cette microscopie qui repose sur un concept ancien [Synge, 1928], représente l'une des premières idées de sonde locale, elle est en pratique la plus récente, la moins performante d'un point de vue résolution latérale et peut-être la moins connue des microscopies de champ proche. Cependant, c'est sans doute la plus variée, de par ses nombreux modes d'utilisation et le grand nombre de propriétés physiques accessibles.

A/ De la microscopie optique conventionnelle à la microscopie optique à sonde locale

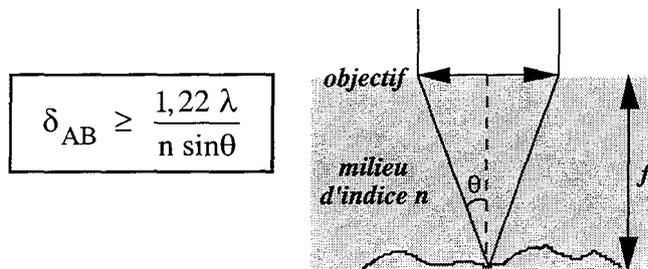
La microscopie optique conventionnelle est à l'heure actuelle la technique de microscopie la plus populaire : elle est relativement peu onéreuse, rapide, et fournit une grande richesse d'informations, particulièrement lorsqu'il s'agit de travailler dans un environnement naturel, comme c'est le cas dans le domaine biologique. En microscopie optique traditionnelle, l'objet à étudier est éclairé par transmission ou réflexion et la lumière diffractée est captée par une lentille-objectif servant à en faire une image : c'est une microscopie de champ lointain, c'est-à-dire que la détection de la lumière s'effectue à une distance très grande devant la longueur d'onde : ce simple fait limite physiquement la résolution spatiale d'un tel appareil.

Il a donc fallu changer complètement le principe des microscopes pour améliorer sérieusement la résolution latérale.

Le but d'un microscope étant de distinguer des détails, une des qualités fondamentales est le pouvoir de résolution. En fait, il faut distinguer deux types de résolution :

- La résolution dans la direction perpendiculaire au plan de l'objet ne semble pas avoir de limite. Par interférométrie, en observation visuelle, on parvient à déceler des variations de hauteur de $\lambda/10$.
- Mais en microscopie, la qualité de l'image dépend essentiellement de la résolution latérale, parallèle au plan de l'objet. Cette résolution a une limite théorique qui a été parfaitement définie à la fin du XIX^e siècle par Abbe et Rayleigh et qui est rappelée dans l'ouvrage de Born et Wolf, 1970.

Pour être vus comme deux points image résolus, deux points objets A et B doivent être séparés par une distance δ_{AB} telle que :



Dans cette formule, λ est la longueur d'onde de la radiation utilisée, n est l'indice du milieu dans lequel est "immergé" l'objet et θ la demi-ouverture angulaire de l'objectif.

La microscopie traditionnelle utilise de la lumière visible ($0,4 \mu\text{m} < \lambda < 0,8 \mu\text{m}$). Aussi, même avec un objectif très ouvert ($\sin\theta = 1$) les images auront une résolution latérale théorique qui ne peut être inférieure à $0,25\text{-}0,4 \mu\text{m}$. Dans la pratique, à cause des défauts résiduels des lentilles, cette limite se situe typiquement aux environs d'un micromètre et exceptionnellement de $0,5 \mu\text{m}$. Celle-ci peut être quelque peu améliorée par :

- l'augmentation de l'ouverture numérique (dont la valeur peut facilement atteindre 1,4 avec un objectif à immersion),
- la diminution dans le visible de la longueur d'onde utilisée,
- ou l'utilisation d'un microscope confocal qui permet de gagner un facteur deux en résolution latérale et permet une véritable tomographie à trois dimensions des objets grâce à sa faible profondeur de champ.

Pour dépasser la limite de résolution latérale imposée par le critère de Rayleigh, une condition nécessaire est de pouvoir détecter les composantes non radiatives (dites évanescentes car elles «s'évanouissent» en suivant une loi exponentielle au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface observée), qui sont associées aux très fines structures spatiales de l'objet et qui ne sont plus détectables à grande distance.

C'est en 1928, que Synge a commencé à parler d'une technique qui permettrait de dépasser la limite de diffraction des microscopes optiques. Sa proposition contenait les points clés de ce qui est maintenant appelée microscopie optique en champ proche : *"une sonde de faible ouverture, placée dans le champ proche, est illuminée et agit comme une source lumineuse de taille inférieure à la longueur d'onde émise. La quantité de lumière collectée par l'échantillon transporte l'information d'un volume de très petite surface, dont la taille est en grande partie déterminée par l'ouverture de la sonde"*.

L'invention du microscope à effet tunnel (STM) a été la preuve expérimentale qu'il était mécaniquement possible de contrôler des distances sonde/objet de quelques nanomètres. De là, le

microscope à effet tunnel a permis la découverte d'une large gamme de microscopie à sonde locale, dont le microscope optique en champ proche.

La découverte du STM a permis la mise en place du SNOM, mais, ironiquement, c'est également l'énorme intérêt pour le STM et plus tard pour le microscope à force atomique (AFM) qui a retardé l'entrée du SNOM dans la course des microscopies en champ proche. Maintenant, après 10 années d'évolution constante, il apparaît clairement que le STM et l'AFM ont accès à un nombre réduit d'informations, et ce, spécialement dans le domaine de l'identification chimique. De plus en plus, les recherches commencent à se tourner vers les richesses fournies par les investigations optiques, ce qui entraîne l'évolution vers une résolution moléculaire.

B/ Description rapide du principe de fonctionnement des microscopes optiques en champ proche

i/ Les ondes évanescentes

Le champ diffracté par un objet beaucoup plus grand que la longueur d'onde ne contient essentiellement que des ondes homogènes se propageant sans atténuation. Pour de tels objets, une lentille en champ lointain peut capter toutes ces ondes et restituer une image correcte de l'objet.

Lorsque la taille de l'objet se rapproche de la longueur d'onde, le champ diffracté commence à comprendre un nouveau type d'onde, les *ondes évanescentes*. Ces ondes, non propagatives, ont une intensité lumineuse qui décroît exponentiellement en fonction de la distance à l'objet, et l'énergie de ces ondes n'est plus mesurable dès que l'on s'éloigne de plus d'une longueur d'onde de l'objet. On ne peut donc pas capter ce genre d'information avec un objectif classique, et l'image de l'objet dans ce cas va être dégradée.

Quand l'objet est plus petit que la longueur d'onde, une très grande partie du champ est évanescent. En microscopie classique, on observera cet objet avec une taille apparente proche de la limite de diffraction dans le meilleur des cas, et l'observation des détails sub-longueur d'onde contenus dans les ondes évanescentes ne sera possible que grâce à la microscopie en champ proche optique.

Par contre, en faisant travailler une sonde en champ proche (champ qui se situe à une distance de l'objet inférieure à la longueur d'onde de la lumière utilisée), immergée dans les ondes évanescentes, on peut capter ces ondes et recueillir l'information qu'elles transportent sur les détails fins de l'objet. Dans ce type de microscope, la sonde sert à convertir par diffraction ces ondes évanescentes en ondes propagatives guidées ensuite vers le détecteur.

C'est cette perturbation qui est à la base du fonctionnement d'un microscope optique en champ proche. Il existe deux modes de fonctionnement principaux :

- le mode collection, utilisant un nanocollecteur comme nous venons de le voir,
- le mode illumination, utilisant cette fois une nanosource.

Pour comprendre ce dernier cas de fonctionnement, il suffit d'appliquer le principe de réciprocité au raisonnement précédent. La lumière incidente est guidée de la source à la pointe. Cette dernière est un objet très petit qui diffracte le mode incident propagatif en un champ diffracté évanescent. En soumettant l'objet à un tel champ, on obtient par diffraction sur ces détails nanométriques, des ondes propagatives pouvant être captées en champ lointain par un objectif classique.

Ces ondes, connues depuis l'époque de Newton, n'ont réellement été théoriquement étudiées que ces dernières décennies. Le terme évanescent montre à lui seul le côté étrange de ces ondes qui restent confinées au voisinage de l'objet qui leur a donné naissance. On retiendra donc ici que le seul moyen dont on dispose pour avoir accès aux informations qu'elles transportent est de les perturber par diffraction, pour générer un champ propagatif "classique".

ii/ Distance sonde-objet et résolution latérale

En microscopie classique, la résolution latérale dépend de l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde utilisée. En microscopie optique en champ proche, un paramètre fondamental influant sur la résolution latérale est la distance sonde-objet. En effet, on montre [Van Labeke, 1997] qu'on peut relier la taille δ d'un détail de l'objet à imager, à la longueur de décroissance L de l'onde évanescente associée, par la relation :

$$L = \frac{\delta}{2\pi} \quad \text{si} \quad \delta \ll \lambda$$

où L est la distance pour laquelle l'intensité du champ évanescent ne vaut plus que 10% de son intensité sur la surface.

Ainsi, pour des objets plus petits que la longueur d'onde, la résolution latérale des microscopes optiques en champ proche dépend de la distance sonde-objet. Plus on veut résoudre un détail petit, plus il faut approcher l'objet à une faible distance. Pour résoudre un détail de 100 nm, il faut que la sonde soit à une distance de 20 nm. Ce qui va impliquer pour les microscopes optiques en champ proche l'utilisation de céramiques piézo-électriques pour contrôler la position des sondes avec cette précision.

C/ Les différents types de microscopies optiques en champ proche

i/ Illumination locale : Mode illumination

Les premiers microscopes optiques en champ proche prennent en compte la suggestion que fit Syngé en 1928. Ce physicien britannique, souvent considéré comme le fondateur de la microscopie optique en champ proche, proposa d'utiliser une petite ouverture de diamètre nanométrique dans un écran métallique éclairé et placé à quelques nanomètres de la surface de l'échantillon. De cette façon, le

champ transmis et détecté au loin contiendrait des informations sur le coefficient de transmission optique de l'échantillon avec une résolution submicronique (figure (V.2).6).

Dans ce principe, deux paramètres sont importants : le diamètre de l'ouverture et sa distance à l'échantillon ; ce sont eux qui déterminent la résolution latérale.

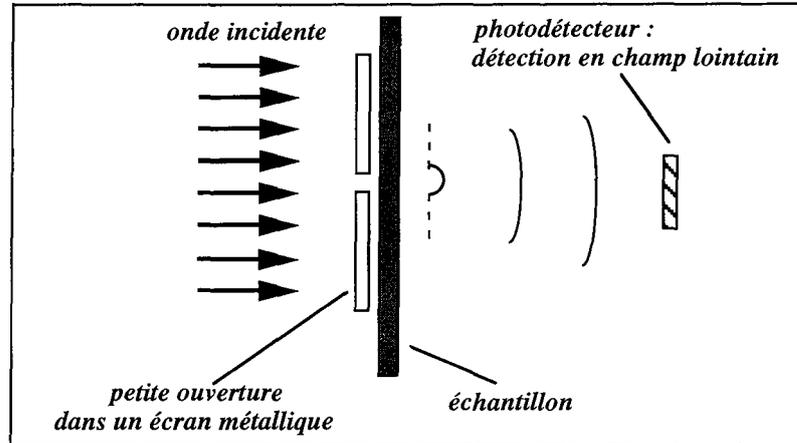


Figure (V.2).6

Principe du microscope optique en champ proche en mode illumination.
Fonctionnement en transmission [Bachelot, 1996].

Dans le mode illumination, la sonde est utilisée comme une nanosource illuminant l'objet en champ proche.

Si on reprend l'idée de Synge, le rôle de l'écran métallique est de limiter la lumière à une tache, de diamètre à peu près égal à celui de l'ouverture, servant à éclairer localement l'échantillon. Si l'on éloigne l'écran de quelques centaines de nanomètres, la diffraction joue son rôle de filtre passe-bas, et l'échantillon voit une source lumineuse de taille micronique. Il faut donc approcher l'échantillon et le placer dans le champ proche de l'ouverture, cette dernière diffractant essentiellement la lumière sous forme d'ondes évanescentes du fait de sa taille nanométrique.

C'est donc l'interaction entre le champ évanescent généré par l'ouverture, et l'échantillon, qui permet, par balayage et détection en champ lointain, de construire point par point une image de l'objet avec une résolution latérale très inférieure au micromètre.

Ce principe a été remarquablement imagé en 1984 par Massey qui montra que cette technique pouvait permettre d'atteindre une résolution optique d'une trentaine de nanomètres, uniquement limitée par l'épaisseur de peau de l'écran métallique. Dans cet article, l'auteur propose l'utilisation de transducteurs piézo-électriques, récemment développés à l'époque et utilisés par le STM, pour le déplacement de l'échantillon, et émet des idées générales sur la fabrication de sondes optiques.

Cette idée de source locale de taille bien plus petite que la longueur d'onde a été mise en pratique pour la première fois en 1972, dans le domaine des micro-ondes ($\lambda = 3$ cm), par Ash et Nicholls qui ont

obtenu une résolution latérale de $\lambda/60$ en utilisant une ouverture de 0,5 mm de rayon placée à 0,5 mm de l'échantillon.

Dans le domaine de l'optique, il a fallu attendre 1984 pour que cette idée soit mise en pratique. Pohl et al., d'IBM-Zurich, présentent pour la première fois un microscope optique à champ proche capable d'atteindre une résolution latérale de 25 nm en utilisant une longueur d'onde de 488 nm ($\lambda/20$).

En même temps, ils proposent une technique de fabrication de pointes de quartz taillées à l'acide fluorhydrique et dont les côtés sont recouverts d'aluminium. Peu de temps après, la même équipe confirme les possibilités de ce microscope et montre qu'on peut utiliser l'écran métallique pour contrôler la distance pointe-échantillon par effet tunnel [Durig, 1986].

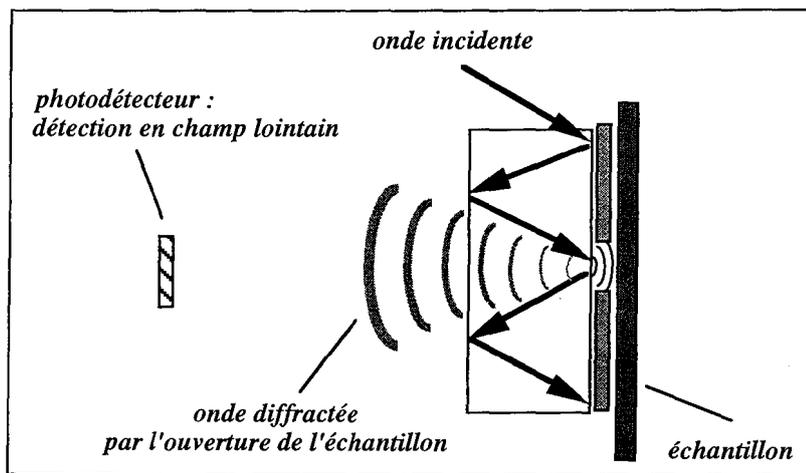


Figure (V.2).7

Principe du microscope optique en champ proche en mode illumination.
Fonctionnement en réflexion.

Ce mode d'illumination est adapté à la réflexion en 1987 [Fisher, 1987]. Dans ce système de géométrie complexe, le champ réfléchi par l'échantillon passe par la même ouverture que le champ incident (figure (V.2).7).

ii/ Collection locale : Mode collection

Ce mode est présenté en 1987 par Betzig et al., qui proposent d'utiliser l'ouverture nanométrique non pas pour l'illumination de l'échantillon mais comme détecteur dont le rôle est de collecter localement, et à une distance très faible de l'objet ($\ll \lambda$), le champ proche diffracté par l'échantillon (figure (V.2).8).

Dans cette expérience, fonctionnant en transmission, l'illumination se fait à l'aide d'un objectif conventionnel de microscope et le champ collecté par la sonde est véhiculé vers un photomultiplicateur via une fibre optique. Dans ce mode, on peut considérer que la sonde optique

(l'ouverture) vient "frustrer" localement les ondes évanescentes porteuses d'informations précieuses, pour les rendre progressives et détectables en champ lointain.

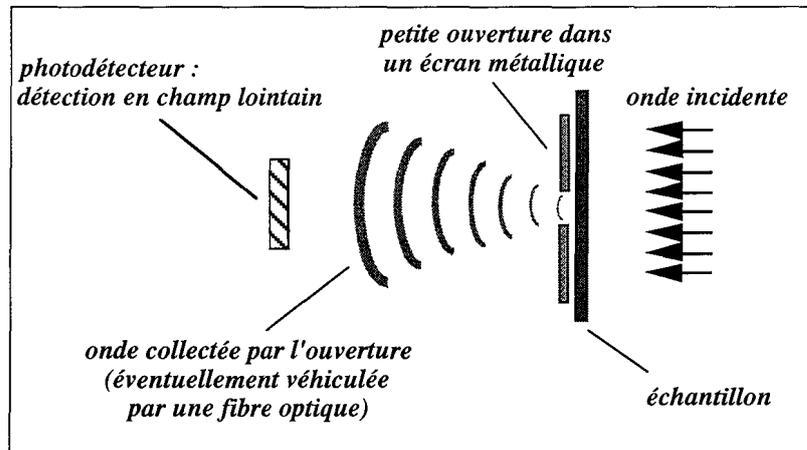


Figure (V.2).8

Principe du microscope optique en champ proche en mode collection.

Fonctionnement en transmission.

En réflexion, le mode collection est beaucoup plus délicat du fait des multiples réflexions du faisceau incident pouvant survenir avant d'atteindre l'ouverture (figure (V.2).9).

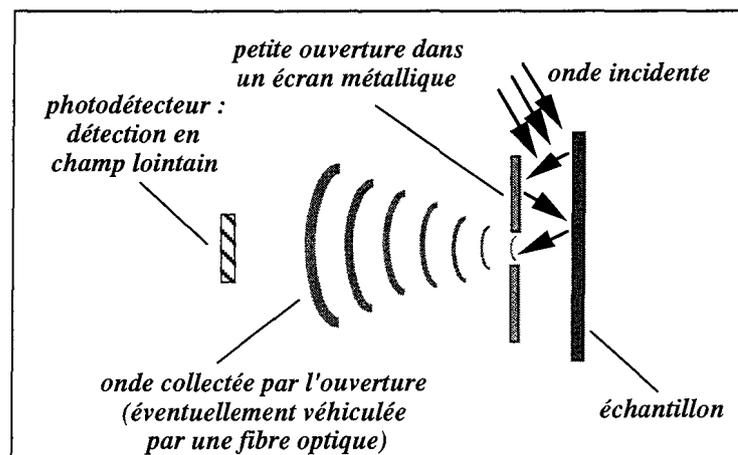


Figure (V.2).9

Principe du microscope optique en champ proche en mode collection.

Fonctionnement en réflexion.

En 1989, Spajer et al. ont développé un microscope optique à champ proche travaillant en réflexion où la pointe est utilisée à la fois en modes illumination et collection : la pointe est l'extrémité d'une fibre optique, elle sert, à l'aller, à éclairer l'objet en champ proche et, au retour, à collecter la lumière diffractée (figure (V.2).10).

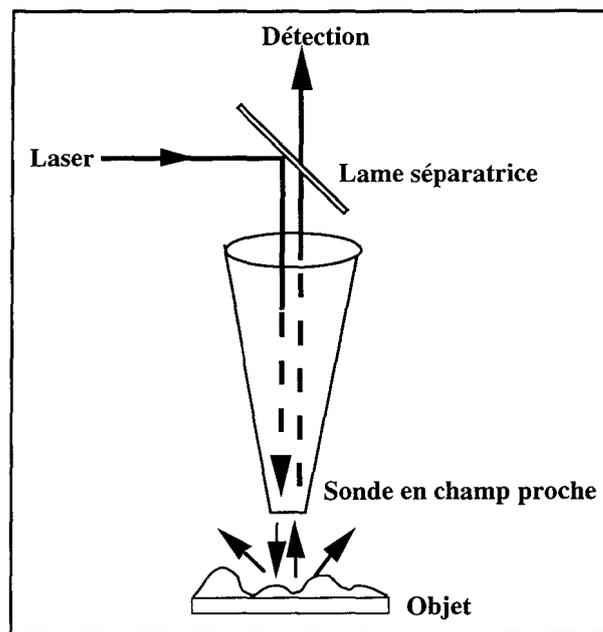


Figure (V.2).10

Principe du microscope optique en champ proche où la sonde fonctionne en mode illumination et en mode collection (RSNOM : réflexion SNOM).

Enfin, pour nommer la grande famille des microscopies optiques en champ proche utilisant l'un des principes que nous venons de décrire, nous emploierons l'acronyme généralement accepté de SNOM, de l'anglais "Scanning Near-Field Optical Microscope".

iii/ Le microscope à effet tunnel optique : PSTM

En 1989, le microscope à effet tunnel optique est imaginé et développé indépendamment et simultanément par trois équipes : celle de Courjon [Courjon, 1989] qui le nomme STOM ("Scanning Tunneling Optical Microscope"), celle de de Fornel et Goudonnet [de Fornel, 1989] qui utilise le terme EFOM ("Evanescent Field Optical Microscope"), et celle de Reddick [Reddick, 1989] qui propose l'acronyme PSTM ("Photon Scanning Tunneling Microscope").

Ce microscope se distingue des SNOM par sa technique d'illumination qui est toute particulière : ce microscope fonctionne en transmission, mais l'objet est éclairé en réflexion totale interne ce qui produit sur la surface de l'objet une onde évanescente (figure (V.2).11). Dans les premières applications de ce microscope tunnel optique, la sonde était l'extrémité d'une fibre optique "taillée" en pointe et utilisée telle quelle sans métallisation.

Lorsque la sonde optique est suffisamment proche de l'échantillon, elle pénètre dans le champ évanescent, le frustre localement et partiellement, générant ainsi un champ progressif qui est détecté via une fibre optique par un photomultiplicateur ; cet effet de réflexion totale frustrée localement est nommé "effet tunnel optique" par analogie à l'effet tunnel électronique à partir duquel fonctionne le STM. Le signal, qui dépend fortement de la distance pointe-échantillon est utilisé par une boucle d'asservissement afin de maintenir l'intensité constante pendant un balayage x, y : on dit alors que l'on travaille à intensité constante.

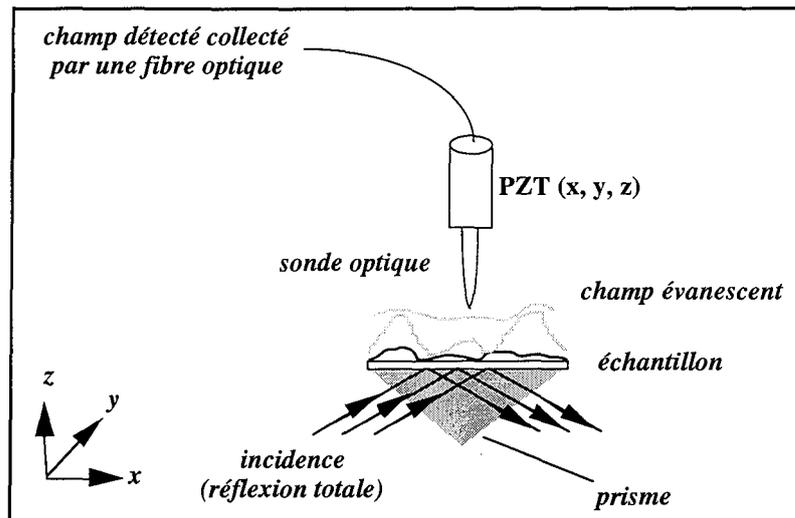


Figure (V.2).11

Principe du microscope à effet tunnel.

Le signal de sortie de l'asservissement fournit une image topographique et optique de l'objet. Comme pour les autres techniques de champ proche, on peut également ouvrir la boucle et travailler à hauteur constante.

Remarquons que son mode de fonctionnement fait du PSTM un système travaillant en mode collection et en transmission, puisque la principale information optique susceptible d'être détectée est la transmittance locale de l'échantillon, ce dernier étant nécessairement semi-transparent. Le PSTM a été rapidement adapté pour travailler en réflexion en utilisant l'ouverture pour éclairer localement et collecter le champ réfléchi [Spajer, 1992]. Cependant, utilisé dans ce mode, il perd son caractère de PSTM et convient d'être associé à la famille des SNOM (figure (V.2).7). En fait, il semble que tout microscope à ouverture utilisant comme régulation de la distance sonde-échantillon une onde évanescente de Fresnel (obtenue par réflexion totale interne) sera considéré comme un PSTM, tous les autres étant des SNOM.

D/ Les sondes optiques utilisées par les SNOM

Le problème technique le plus important des microscopies optiques en champ proche est la réalisation de la sonde optique. Actuellement la quasi-totalité de ces microscopes utilise une fibre optique taillée en pointe. La pointe sert de sonde locale et la fibre optique sert à guider la lumière de la source à la pointe en mode illumination ou de la pointe au détecteur en mode collection. On utilise généralement des fibres monomodes, de diamètre de cœur d'environ 2 à 5 microns.

Afin d'atteindre la configuration écran métallique-ouverture typique du SNOM, plusieurs techniques furent développées, chacune essayant de répondre aux critères suivants (figure (V.2).12) :

- le diamètre de l'ouverture ne doit pas dépasser une trentaine de nanomètres,
- l'écran doit être convexe et le trou doit être situé sur un plan le plus bas possible par rapport au reste de la pointe afin de tenir compte de la topographie de surface,
- l'épaisseur de la couche métallique doit être plus faible que le diamètre d'ouverture pour que la résolution latérale dépende exclusivement des dimensions de l'ouverture.

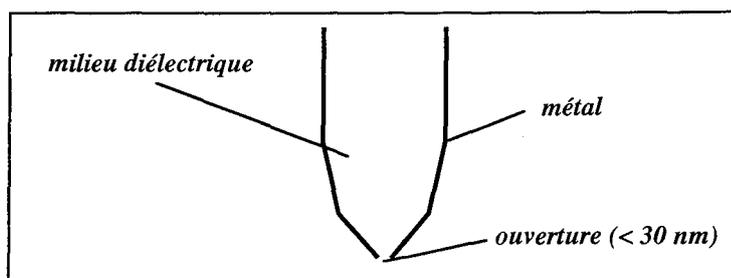


Figure (V.2).12

Schématisme d'une pointe idéale pour le SNOM.

Il va sans dire que respecter ces trois critères simultanément constitue un véritable défi technologique. Les premières sondes optiques utilisées par Pohl et al., 1984, étaient formées d'un cristal de quartz taillé en pointe chimiquement par attaque à l'acide fluorhydrique, puis complètement recouvert d'une couche d'aluminium d'une cinquantaine de nanomètres d'épaisseur puis d'une fine couche d'or pour protéger de la corrosion. L'ouverture était formée en exerçant une légère pression mécanique au bout de la pointe en appuyant celle-ci contre une surface, cette opération provoquant l'élimination locale du métal.

Depuis, deux principaux types de sondes ont été développés et utilisés avec succès : la micropipette en verre étirée à chaud et recouverte d'aluminium par évaporation [Betzig, 1987 ; Harootunian, 1986], et la fibre optique monomode taillée en pointe par étirement mécanique jusqu'à cassure suivie d'une attaque chimique à l'acide fluorhydrique, ou par chauffage local en utilisant un laser à gaz carbonique [Betzig, 1991]. La métallisation se fait ensuite par dépôt d'aluminium, d'or ou d'argent. Les rayons de bout de pointe, obtenus par ces méthodes, varient de 20 à 100 nm. Les sondes faites à partir de fibres optiques sont les plus appréciées car elles permettent en plus de guider la lumière incidente ou détectée.

E/ Couplage des différentes techniques de champ proche

Au début des années 90, malgré de très beaux résultats, les utilisateurs de microscopes optiques en champ proche prirent réellement conscience que la topographie des échantillons étudiés avait une influence importante sur le signal optique, et donc masquait souvent les propriétés optiques locales que l'on cherchait à caractériser. En effet, le but de la microscopie optique à sonde locale n'est absolument pas de rentrer en compétition avec l'AFM en mesurant des topographies nanométriques, mais bien de détecter les propriétés optiques (réflectance, transmittance, fluorescence, Raman...) des échantillons avec une résolution submicronique. Ce problème de topographie est évident dans le cas du PSTM dont le signal dépend fortement de la distance pointe-échantillon, ce qui est remarquablement expliqué dans le cas du SNOM, dans l'article de Trautman et al., 1992. Les influences respectives de la topographie et du contraste diélectrique sur le signal SNOM ou PSTM ont récemment été étudiées [Carminati, 1995].

Dès 1992, afin de remédier à ce problème, la microscopie optique en champ proche opte pour un couplage SNOM/AFM [Betzig, 1992^c ; Toledo-Crow, 1992 ; Bergossi, 1995]. Dans ce couplage, la même pointe sert à la fois de sonde optique et de sonde AFM. Afin de conserver les sondes optiques déjà existantes (fibres ou pipettes), le mode AFM "shear force" est retenu (§ V.2.2. D). De cette façon, le signal AFM permet le suivi de la topographie alors que le signal SNOM mesure les propriétés optiques locales indépendamment, espère-t-on, de la topographie.

D'autres auteurs [Baida, 1992] préfèrent utiliser des leviers AFM commerciaux en nitrure de silicium (Si_3N_4) pour travailler en mode contact (figure (V.2).13), ce mode ayant largement fait ses preuves.

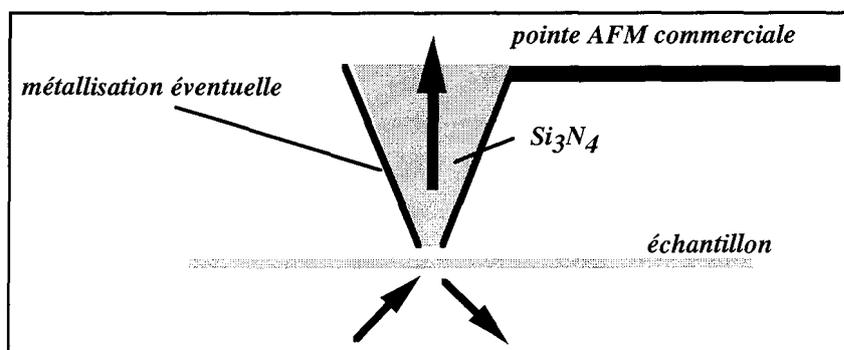


Figure (V.2).13

Pointe AFM en nitrure de silicium pour couplage PSTM/AFM.

Ils profitent astucieusement d'une certaine transparence à la lumière du Si_3N_4 pour utiliser ces pointes comme sondes optiques destinées à frustrer localement le champ évanescent généré par réflexion totale (configuration PSTM). Un des avantages de cette technique par rapport au PSTM classique est que la sonde optique est en contact avec l'échantillon (distance < 1 nm), ce qui laisse espérer de très hautes résolutions latérales.

Ces sondes optiques peuvent être partiellement métallisées pour devenir des pointes type écran-ouverture. D'autres équipes [Garcia-Parajo, 1994 ; Barchiesi, 1993 ; Lieberman, 1993], qui ont préféré un couplage SNOM/STM, utilisent habilement la métallisation entourant l'ouverture pour créer un effet tunnel. Cette dernière configuration, proposée quelques années auparavant [Durig, 1986], nécessite des échantillons conducteurs. L'épaisseur de cette couche, typiquement égale à 10 nm, est évidemment faible afin de ne pas masquer les propriétés optiques de l'échantillon. En fait, aujourd'hui, on ne peut raisonnablement plus concevoir un système SNOM ou PSTM sans couplage avec un AFM ou un STM.

F/ Les limites du champ proche

Bien que certains SNOM aient déjà été commercialisés (Topometrix...), la microscopie en champ proche est un domaine de l'optique encore très jeune (à peine une décennie) et de nombreux phénomènes physiques inhérents à ce mode de détection restent flous et peu connus. Par exemple, certaines des propriétés optiques accessibles en champ proche par cette microscopie peuvent avoir le même comportement qu'en champ lointain, d'autres par contre peuvent fortement différer du fait de l'interaction pointe/échantillon qui introduit souvent des artefacts dans les images [Durkan, 1995]. En effet, pour interpréter des images SNOM ou PSTM, il est souvent nécessaire de considérer les pointes comme des systèmes localement perturbateurs plutôt que des sondes optiques passives se contentant de collecter des informations. Ceci est par exemple évident dans certains systèmes travaillant en réflexion dans lesquels la lumière subit de nombreuses interactions avec la sonde avant d'être détectée [Cline, 1995].

Exceptés les RSNOM ([figure \(V.2\).10](#)) pour lesquels la lumière incidente passe par la même ouverture que la lumière réfléchie, les géométries SNOM et PSTM sont souvent asymétriques, ce qui rend les images très dépendantes de la position du détecteur et/ou de la direction du faisceau incident par rapport à la géométrie de l'échantillon [de Fornel, 1992].

Le comportement du signal champ proche optique a également la particularité d'être très sensible à la topographie locale, à la direction de polarisation de la lumière incidente et à la nature de l'échantillon. Ceci empêche la plupart du temps les études quantitatives et se traduit par le fait que les images SNOM et PSTM sont souvent porteuses d'informations physiquement plus riches et variées mais plus difficilement interprétables que celles fournies par la microscopie conventionnelle.

La fabrication des sondes à ouverture utilisées par les SNOM et PSTM fait appel à des technologies compliquées, lourdes et souvent coûteuses qui se sont améliorées et précisées au cours des dix dernières années. Actuellement, bien que ces techniques soient efficaces (des sondes SNOM sont commercialisées), la géométrie obtenue (rayon de courbure de bout de pointe, diamètre de l'ouverture, forme et épaisseur de l'écran) n'est pas toujours reproductible, ni assurée.

L'ensemble ouverture-écran représente donc généralement une surface plate d'une centaine de nanomètres de diamètre (figure (V.2).14), ce qui empêche le suivi correct d'échantillons présentant un fort degré de rugosité ou une topographie abrupte.

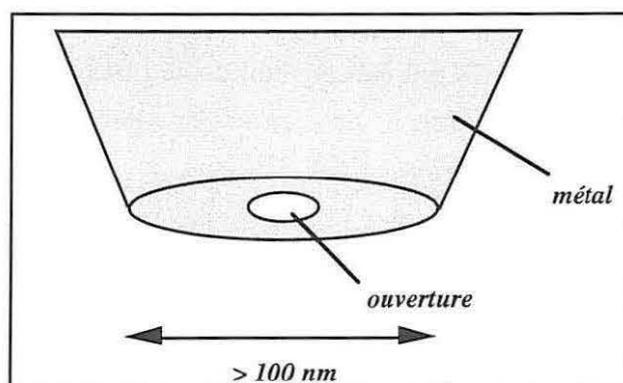


Figure (V.2).14

Schéma de l'extrémité d'une pointe typique de SNOM.

La meilleure résolution latérale obtenue par les SNOM à ouverture est selon les auteurs de 12 nm [Betzig, 1991]. Une résolution très proche a également été obtenue à partir de films de polymères de 25 nm d'épaisseur emprisonnant des particules de latex de 14 nm de diamètre [Rücker, 1997]. Il est admis que l'on ne peut pas faire mieux et que cette résolution est fondamentalement limitée par l'épaisseur non nulle du métal entourant l'ouverture. Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait que depuis les premiers résultats de Pohl et al., 1984, annonçant une résolution latérale d'environ 30 nm, celle-ci n'a pas ou peu été améliorée.

G/ Les domaines d'application

Ainsi, comme nous l'avons déjà décrit, les microscopes optiques à champ proche à ouverture peuvent travailler en transmission comme en réflexion, ce dernier mode offrant une plus large gamme d'échantillons. Les SNOM et PSTM sont capables d'étudier avec une résolution latérale de l'ordre de 30 nm ($\sim \lambda/20$) la plupart des propriétés et phénomènes optiques observables en microscopie conventionnelle : indice de réfraction [Trautman, 1992], facteur de réflexion [Fisher, 1987], facteur de transmission [Carminati, 1995], fluorescence [Harootunian, 1986], spectroscopie [Betzig, 1992]^a, effets de polarisation [Betzig, 1992]^b, absorption... Précisons qu'aucune autre technologie ne peut accéder à ces informations à l'échelle nanométrique.

Le couplage avec l'AFM (ou le STM) permet de suivre la plupart des topographies de surface. La variété de modes de fonctionnement existants permet de s'adapter à un grand nombre de problèmes et de caractériser aussi bien des échantillons biologiques [Toledo-Crow, 1992 ; Van Hulst, 1992], que des matériaux diélectriques [Toledo-Crow, 1992], conducteurs [Betzig, 1992]^a ou semi-conducteurs [Toledo-Crow, 1992].

En PSTM, les travaux expérimentaux les plus poussés ont été menés au Laboratoire d'Optique P.M. Duffieux de l'Université de Besançon (D. Courjon, M. Spajer, G. Tribillon...), et au Laboratoire de Physique de la Faculté des Sciences de l'Université de Bourgogne (J.P. Goudonnet, F. de Fornel...).

En SNOM, les résultats les plus variés ont été sans nul doute obtenus au Laboratoire AT&T Bell, Murray Hill, USA (E. Betzig, J.K. Trautman) ainsi qu'au Département de Chimie de l'Université du Minnesota, Minneapolis, USA (P.F. Barbara, D.A. Higgins...).

La microscopie optique en champ proche constitue un outil très efficace de caractérisation optique à l'échelle nanométrique et couvre des domaines aussi variés que la minéralogie [Gutmannsbauer, 1995], la micro-électronique [Duncan, 1996], la lithographie [Krausch, 1995], l'étude de phospholipides [Hwang, 1995] et de membranes synthétiques [Dunn, 1994], de fibres optiques [Higgins, 1996]^a... De plus, elle pourrait être utilisée pour le stockage de l'information à haute densité, le mode illumination locale servant à l'écriture et le mode collection locale à la lecture. Il a été en effet expérimentalement démontré qu'en utilisant un SNOM, on pouvait atteindre une densité de stockage d'environ 7 Giga bits par centimètre carré, soit un gain d'à peu près deux ordres de grandeur par rapport à la densité qu'offrent les disques compacts classiques (typiquement 1 bit/ μm^2) [Betzig, 1992]^a.

L'un des premiers domaines d'intérêt fut la polarisation de fluorescence [Jalocha, 1995 ; Higgins, 1996^b] et les utilisations qu'elle implique, comme la modification de cristaux liquides, les films magnéto-optiques, la cartographie de molécules isolées...

La fluorescence fait également partie des grands domaines de recherche en cours pour la détection de molécules fluorescentes isolées, l'étude de films de polymères, mais également pour le marquage de zones spécifiques au sein de divers systèmes biologiques.

Détailler tous les domaines d'applications du SNOM est impossible dans le cadre de ce travail, néanmoins il est intéressant de montrer quelques résultats types, afin d'illustrer les possibilités de la microscopie optique en champ proche.

i/ La polarisation

L'appareillage utilisé pour les études en polarisation peut facilement être adapté à des SNOM fonctionnant en mode réflexion ou transmission, en plaçant des polariseurs (lame à $\lambda/4$ ou lame à $\lambda/2$) sur le parcours lumineux avant l'échantillon, et un analyseur entre l'échantillon et le détecteur.

A titre d'exemple, la [figure \(V.2\).15](#) illustre les résultats d'une étude sur un échantillon constitué d'une lame de silice recouverte par un quadrillage d'or, dans laquelle la lumière réfléchie a été polarisée dans différentes directions, la lumière incidente étant polarisée à 45° par rapport à la verticale (dans le sens des aiguilles d'une montre).

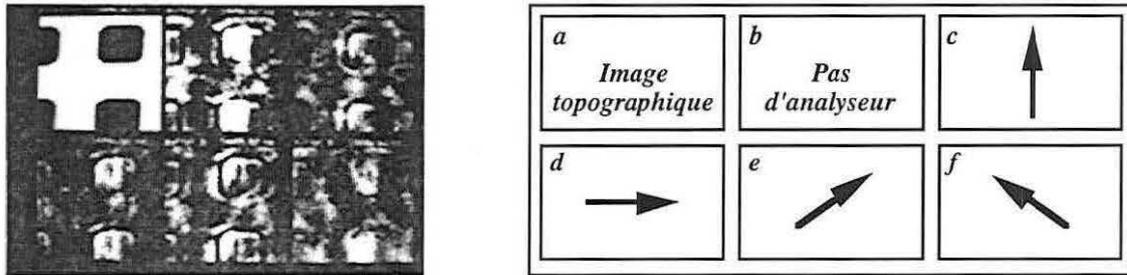


Figure (V.2).15

Images SNOM en mode réflexion
en fonction de la direction de polarisation de l'analyseur [Moyer, 1995].

Il apparaît que l'image b ressemble à la somme de deux images polarisées orthogonalement. Dans le cas où l'analyseur est orienté dans le même sens que la polarisation incidente (e), les contrastes sont amplifiés. La combinaison entre une image SNOM et une image topographique permet une très bonne interprétation des résultats, notamment au niveau des bordures de l'échantillon, qui s'avèrent très dépendantes des conditions de polarisation.

Dans le cas où le SNOM fonctionne en mode transmission, le même type d'expérience a été réalisé. Les auteurs de cette étude [Betzig, 1992]^b ont choisi d'étudier un échantillon qui se présente sous la forme de quatre anneaux d'aluminium déposés sur une lame de verre. L'épaisseur d'aluminium déposée était de 20 nm pour un diamètre de 1 μm . Les images de la figure (V.2).16 ont été réalisées à partir de différentes orientations de polarisation à l'incidence et à l'analyse.

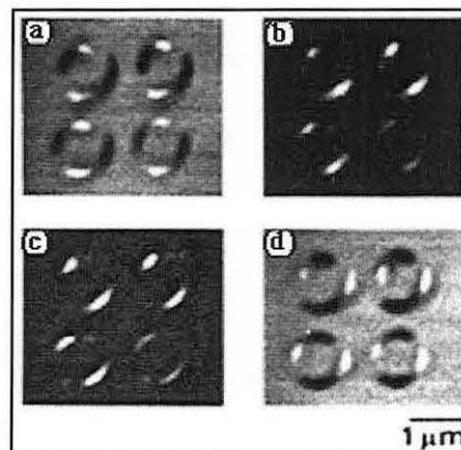


Figure (V.2).16

Images SNOM en mode transmission
selon différentes directions de polarisation à l'incidence et à l'analyse [Betzig, 1992]^b :
a verticale/verticale ; b verticale/horizontale ; c horizontale/verticale ; d horizontale/horizontale.

Les auteurs de cette étude ont interprété ces images de la façon suivante : l'intensité est maximale sur les bordures où la direction du vecteur champ électrique est perpendiculaire à la surface du métal.

Cette variation d'intensité autour de l'anneau reflète l'importance des conditions aux limites sur les contrastes de l'image. Sur l'image a, l'intensité est la plus forte là où la structure du métal est proche de l'horizontale ; une situation analogue est constatée sur l'image d, dans le cas où la structure du métal est verticale.

La polarisation apporte donc un grand nombre d'informations sur les propriétés physiques des échantillons, mais il ne faut pas perdre de vue que l'interprétation des images obtenues reste difficile. Malgré tout, ce domaine reste porteur en physique, puisqu'il est à la base de bon nombre d'applications, notamment pour la modification de structure des cristaux liquides.

ii/ Les cristaux liquides

En plus du fonctionnement en «mode passif», le SNOM peut fonctionner en «mode actif» et permettre des modifications sublongueur d'onde de la surface d'un échantillon. Moyer et al., 1995, ont réalisé la première expérience SNOM à partir de cristaux liquides (figure (V.2).17).

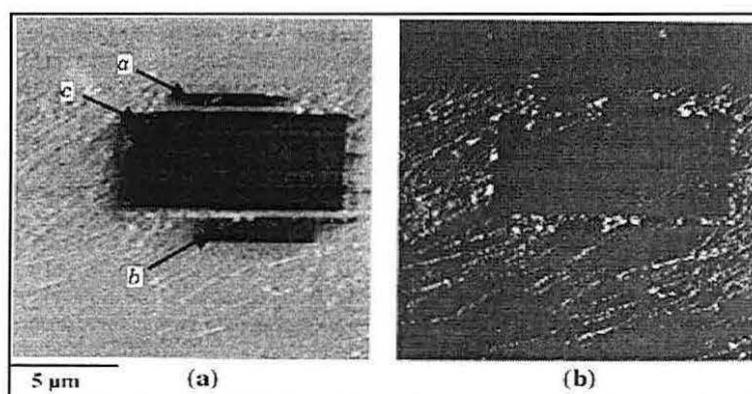


Figure (V.2).17

Image SNOM de la polarisation croisée de cristaux liquides (a) et image topographique correspondante (b) [Moyer, 1995].

La zone sombre a subi un "marquage" par le SNOM.

L'orientation des molécules de la structure du cristal liquide joue le rôle de polariseur sur la lumière réfléchi. A l'entrée du détecteur, un filtre polariseur est orienté de façon à transmettre la lumière polarisée, produisant l'arrière plan lumineux de la figure (V.2).17. Auparavant, la zone noire rectangulaire a été balayée par la pointe du SNOM, avec une puissance telle que les molécules de cristaux liquides se sont réorientées. Cela a donc changé la direction de polarisation de la lumière réfléchi qui n'a pu être détectée, créant ainsi cette zone sombre sur l'image : la microscopie optique en champ proche constitue donc un outil très efficace de caractérisation optique à l'échelle submicronique.

Une analyse en ligne de l'image topographique a montré que les cristaux liquides avaient un profil plat, de 2 nm d'épaisseur, tandis que l'image optique passe clairement d'une zone claire à une zone sombre. Cela montre que le contraste optique est indépendant de la topographie.

Cette étude a eu un intérêt majeur pour démontrer les possibilités du SNOM pour le stockage de l'information à haute densité, le mode illumination locale servant à l'écriture et le mode collection locale à la lecture.

iii/ Détection de molécules isolées par fluorescence

Localiser finement des éléments fluorescents présente un intérêt très important tant pour les biologistes que pour les physiciens. La détection de molécules isolées compte parmi les avancées les plus spectaculaires en matière d'applications du SNOM en raison de la bonne résolution latérale atteinte sur ces échantillons, probablement grâce à la facilité d'analyse (géométrie plane), mais également à la possibilité de les étudier à l'air et à température ambiante. L'intérêt de ces études repose sur la compréhension du rôle de l'environnement immédiat des molécules, via des mesures d'absorption, de fluorescence, de durées de vie, de polarisation...

En 1993, Betzig et Chichester ont été capables de visualiser le champ issu d'une seule molécule. La [figure \(V.2\).18A](#) est l'image de molécules de carbocyanine diluées dans une résine de type PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)). La forme apparente des molécules varie d'un endroit à l'autre de l'échantillon, du fait de l'orientation du dipôle actif de la molécule. La [figure \(V.2\).18B](#) est une simulation des orientations possibles des dipôles correspondant à la [figure \(V.2\).18A](#).

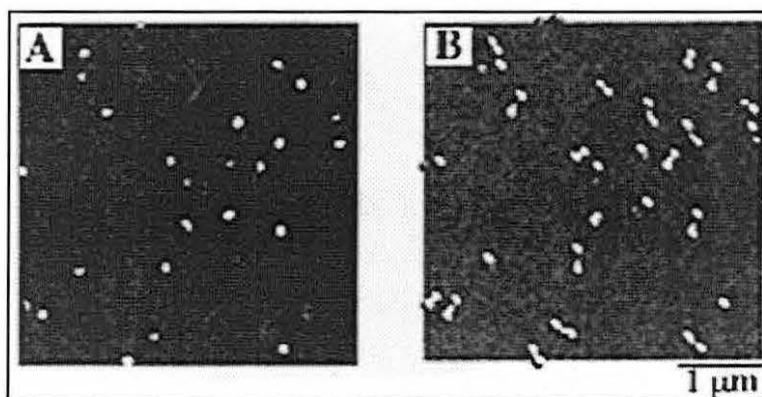


Figure (V.2).18

Molécules dispersées dans du PMMA.

Image SNOM ($4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$) sous polarisation aléatoire (A)
et simulation de l'orientation des dipôles (B) [Betzig, 1993]^a.

Quelques années plus tard, les chercheurs du Département de Chimie de l'Université de Leuven, Belgique [Rücker, 1997] en collaboration avec l'équipe Japonaise du Pr Masuhara ont imagé des films de polymères (de $10\ \mu\text{m}$ et de $25\ \text{nm}$ d'épaisseur) contenant des billes fluorescentes de $100\ \text{nm}$ de diamètre ([figure \(V.2\).19](#)).

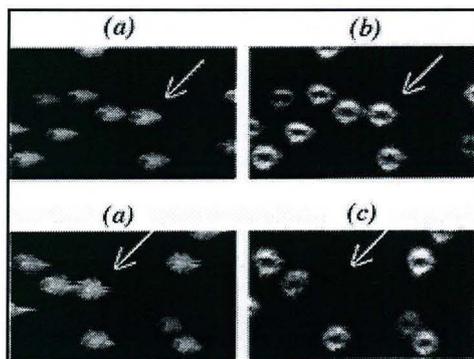


Figure (V.2).19

Images topographiques (a)
et images SNOM optique (b) et de fluorescence (c) [Rücker, 1997].
La flèche indique une bille ayant subi un photoblanchiment (c).

Cette étude a permis de montrer que le champ proche optique pouvait permettre des phénomènes photochimiques, tels le photoblanchiment sur de petites zones et en même temps permettre le repérage des zones affectées.

Higgins et Barbara ont montré qu'il était possible de superposer des images topographiques et optiques réalisées simultanément (figure (V.2).20, travaux dans Paesler et Moyer, 1996). La fluorescence (en rouge) est observée uniquement sur les molécules isolées de PMMA (en vert) et non pas sur le substrat de verre (en bleu).

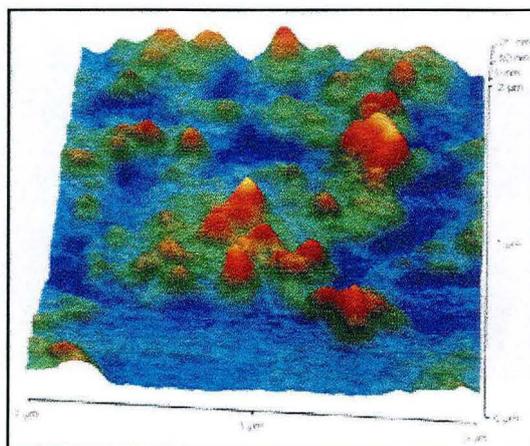


Figure (V.2).20

Images de fluorescence SNOM (rouge) de molécules isolées
superposée aux images topographiques (bleu, vert).

Enfin, l'étude d'agrégats au sein de films de polymères montre également l'importance des images de fluorescence SNOM [Higgins, 1995]. La figure (V.2).21 présente les images topographiques et de fluorescence SNOM d'agrégats d'un dérivé cyanine (PIC) piégé dans une matrice de PVS.

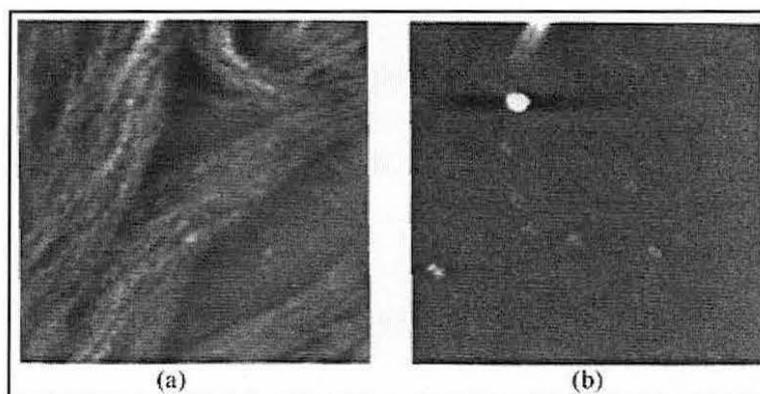


Figure (V.2).21

Image de fluorescence SNOM (a) et topographique (b)
d'agrégats de polymères dans un film de PVS de 30 nm d'épaisseur [Higgins, 1995].

Des structures longilignes de 100 μm de long et d'épaisseur submicronique sont clairement présentes sur l'image (a). La plupart des informations présentes sur l'image SNOM n'apparaissent pas en topographie puisque les structures filamenteuses sont emprisonnées dans le film de polymère, en dessous de la surface.

iv/ Position actuelle dans le domaine de la biologie

Pour un biologiste, la microscopie optique conventionnelle est l'un des outils les plus importants mis à sa disposition. Elle permet l'étude de toute sorte d'échantillons biologiques, dans des conditions très variables : mise en place de dispositifs permettant des analyses sous différentes conditions atmosphériques, à différentes températures, à l'air ou en milieu liquide. La limitation de la résolution latérale par la diffraction de la lumière reste le seul inconvénient de cette technique.

Face à ce problème de résolution, la microscopie électronique permettait d'outrepasser ces difficultés, mais il fallait bien admettre qu'un nouveau phénomène perturbateur ne faisait pas spécialement de cette technique l'outil miracle : la nécessité d'utiliser un échantillon rendu conducteur (par vaporisation d'un métal à sa surface) impliquait l'utilisation d'échantillons biologiques fixés sur lamelle, et desséchés.

Puis la microscopie à sonde locale est peu à peu entrée dans les mœurs grâce aux possibilités offertes par la microscopie à force atomique. Cette technique permet d'atteindre des résolutions latérales de l'ordre de 5 nm, et de travailler en milieu aqueux, dans différentes conditions atmosphériques et à différentes températures, sans avoir à modifier la nature de l'échantillon. Seulement cette technique n'est pas adaptée pour l'observation des propriétés optiques, sa seule possibilité est l'obtention d'images topographiques ; c'est pourquoi actuellement de nombreuses recherches sont dirigées vers le couplage AFM/SNOM.

Si les physiciens et les chimistes ont très tôt compris tous les avantages qu'ils pouvaient tirer du SNOM, les biologistes, eux, ont beaucoup tardé à s'intéresser aux possibilités de la microscopie optique en champ proche, malgré la résolution spatiale qu'elle permet d'atteindre.

Quand on connaît un peu mieux les avantages et inconvénients de cette technique, on comprend la réticence que les biologistes ont montrée vis-à-vis de cette nouvelle technologie : risque d'endommagement de l'échantillon par la pointe, échauffement des cellules par le laser, temps d'acquisition de l'image important, travail en milieu aqueux difficile, résolution sublongueur d'onde atteinte avec des échantillons placés à moins de 10 nm de la pointe...

Pourtant, de très belles applications ont été démontrées avec la microscopie optique en champ proche.

Betzig, en collaboration avec le Laboratoire AT&T Bell [Betzig, 1993]^b, a été le premier à réaliser des images SNOM de fluorescence d'échantillons biologiques à partir de fibroblastes de souris, fixés et séchés (figure (V.2).22).

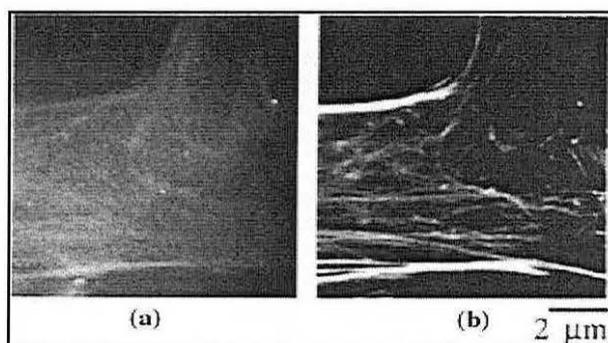


Figure (V.2).22

Images topographique (a) et de fluorescence SNOM (b)
d'un réseau d'actine de cellules de fibroblastes de souris [Betzig, 1993]^b.

Une comparaison avec d'autres microscopies a permis de montrer une résolution en x et y bien meilleure que celle obtenue avec un microscope confocal, et des contrastes mieux révélés qu'en microscopie à force atomique. Cette étude a permis d'analyser la structure de filaments d'actine du cytosquelette, entre les fibres de stress.

Moers et al., 1996, ont utilisé le SNOM en fluorescence pour localiser et identifier plusieurs fragments d'ADN du génome ayant des acides nucléiques marqués. Les images obtenues ont permis grâce à l'obtention simultanée de l'image topographique, de connaître la localisation exacte du marqueur au sein de l'ADN.

La fluorescence de protéines photo-synthétiques isolées a également été imagée par microscopie optique en champ proche [Dunn, 1995], et des détails de moins de 100 nm ont été révélés. Un travail approchant a également permis de localiser des protéines de Malaria (marquées avec des anticorps couplés à de la fluorescéine isothiocyanate et à de la tétraméthylrhodamine) dans des érythrocytes infectés [Enderle, 1997].

La figure (V.2).23 montre des images de microscopie optique conventionnelle (a) et SNOM en topographie (b) et en fluorescence (c) des érythrocytes : sur l'image de fluorescence, seule la cellule infectée apparaît.

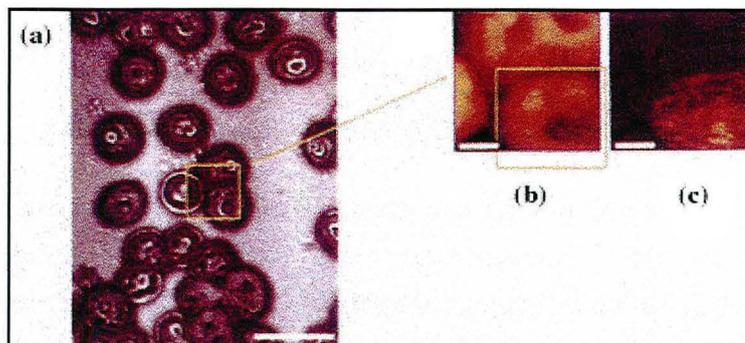


Figure (V.2).23

Protéines de Malaria dans des membranes d'érythrocytes [Enderle, 1997]
imagées par microscopie optique conventionnelle (a, échelle 10 µm) et
SNOM : topographie (b, échelle 2 µm) et fluorescence (c, échelle 2 µm).

La combinaison des images topographiques et de fluorescence SNOM a donc permis de mieux comprendre la fonction des différentes structures, ainsi que les interactions protéines-protéines. Une analyse complémentaire a également montré une résolution latérale de 100 nm avec le SNOM, alors qu'elle n'est que de 300 nm avec le microscope confocal.

Peu à peu, les applications commencent donc à trouver des intérêts grandissants, faisant de la technique SNOM un appareillage complet pour des études en biologie grâce :

- à sa "super résolution", au-delà de celle du confocal,
- à la source lumineuse en champ proche qui permet d'exciter la cellule à sa surface, c'est-à-dire dans la membrane uniquement,
- à l'excellent rapport signal/bruit obtenu, puisque l'auto-fluorescence des cellules n'est pas intégrée sur toute l'épaisseur de l'échantillon,
- aux informations issues de la topographie qui permettent de cartographier les cellules avec une résolution latérale de l'ordre de 100 nm,
- et surtout grâce à la possibilité de réaliser des images topographique et de fluorescence simultanément, et ainsi de faciliter le repérage de différentes structures biologiques.

Ce sont ces différents points qui ont motivé ce travail de thèse vers des applications à la biologie de la microscopie optique en champ proche, avec surtout la recherche de possibilités pour appliquer la technique en milieux aqueux, comme nous le verrons au cours de la partie suivante dans laquelle sont exposés les différents résultats montrant la progression de nos observations.

V.3. EVOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE VERS DES APPLICATIONS D'INTERET BIOLOGIQUE

V.3.1. IMAGES TOPOGRAPHIQUES ET OPTIQUES

A/ Matériels et méthodes

i/ Description du microscope "Aurora" commercialisé par TopoMetrix

Le microscope optique à champ proche que nous avons utilisé est l'Aurora, commercialisé par TopoMetrix à Santa Clara, USA. Ce microscope fonctionne en mode illumination selon le principe rappelé dans la partie V.2.3.B de ce chapitre, et peut être utilisé soit en mode transmission, soit en mode réflexion. La figure (V.3).1 représente de façon schématique, le fonctionnement de ce microscope.

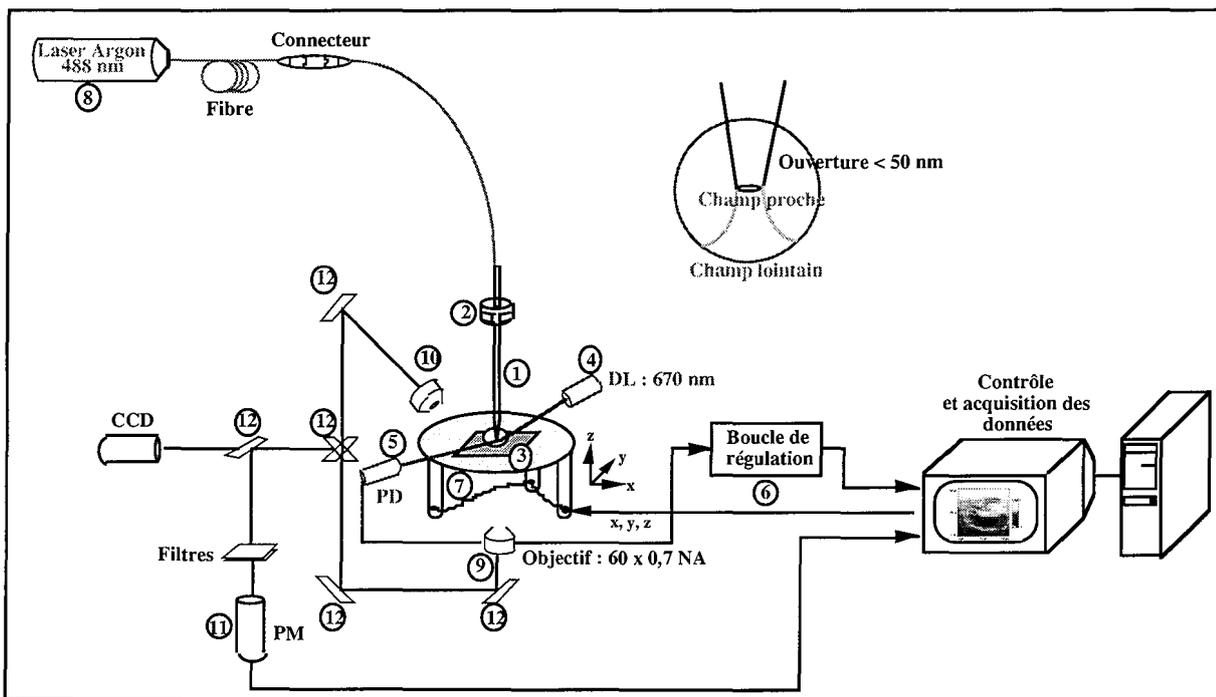


Figure (V.3).1

Schéma descriptif du microscope optique en champ proche commercialisé "Aurora" - TopoMetrix.

Le cœur du SNOM est constitué d'une fibre optique⁽¹⁾, très fine, étirée en pointe, aluminisée sur les côtés et dont le diamètre d'ouverture est de 50 nm.

La fibre optique, reliée à un tube piézo-électrique⁽²⁾, va vibrer à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. En approchant la fibre de la surface de l'échantillon à étudier⁽³⁾, des interactions fibre-surface vont entrer en jeu, entraînant une diminution de l'amplitude d'oscillation de la fibre et de ce fait une variation de phase.

C'est cette atténuation, fonction de la distance pointe-échantillon, qui est prise en compte pour maintenir une distance constante entre la pointe et l'échantillon. Cette distance est comprise entre 2 et 15 nm \pm 0,5 nm. Le principe de l'appareil repose donc sur la régulation des forces de cisaillement qui apparaissent dans le champ proche de l'échantillon.

Ce principe, basé sur la détection de changement de phase est possible grâce à une diode laser^④ et une photodiode^⑤ de suivi qui constituent à elles-deux un capteur qui enregistre le déphasage entre le signal fourni par le piézo et l'oscillation réelle de la fibre (c'est-à-dire modifiée par la variation des forces de cisaillement à l'approche de l'échantillon). En réponse à cette information et pour maintenir une distance constante entre la pointe et l'échantillon, une boucle d'asservissement^⑥ va assurer le contrôle de l'amplitude, en faisant varier la position z de l'échantillon posé sur un tube piézo-électrique^⑦. C'est également ce piézo-électrique qui va permettre le déplacement sous la fibre de l'échantillon selon les axes x et y.

Cet ensemble d'éléments, en balayant l'échantillon sous la pointe, va donner accès dans un premier temps, à la topographie ligne par ligne de la surface examinée. Par ailleurs, si l'on veut ensuite réaliser une image optique cette étape est indispensable, puisque c'est elle qui va permettre à l'échantillon d'être dans le champ proche du faisceau émis par l'extrémité de la fibre.

Le SNOM est équipé d'un laser argon ionisé^⑧ ($\lambda = 488$ nm), dont le faisceau lumineux guidé jusqu'à l'apex de la sonde agit comme une nanosource, qui va permettre la formation d'un champ évanescent diffracté. En soumettant l'échantillon à un tel champ, on obtient par diffraction sur des détails nanométriques, des ondes propagatives pouvant être captées en champ lointain par un objectif classique.

Le signal peut être recueilli par transmission^⑨ ou par réflexion^⑩ (selon la nature de l'échantillon) grâce à deux objectifs. Dans chacune des deux configurations, la lumière collectée est guidée vers un tube photomultiplicateur^⑪ par l'intermédiaire de miroirs^⑫. On obtient ainsi des images optiques par réflexion ou par transmission de la lumière.

Si l'échantillon étudié comporte un marqueur fluorescent dont la longueur d'onde d'excitation est voisine de 488 nm, on devrait pouvoir recueillir des images en réémission de fluorescence.

Il est à rappeler qu'une image optique nécessite au préalable la réalisation d'une image topographique par contrôle des forces de cisaillement. Cette condition est un avantage sur l'AFM, puisque le SNOM doit permettre la réalisation simultanée d'images topographique et optique. On peut également ajouter que sur les images obtenues, les différentes hauteurs ou les différences d'intensités, sont représentées par une échelle colorimétrique, allant du sombre pour les zones profondes, au foncé, pour les zones élevées.

ii/ Caractéristiques du matériel utilisé

Le SNOM "Aurora" est constitué de deux éléments majeurs : la "tête" et la platine qui permet également de supporter l'objet.

La tête du microscope comprend :

- la pointe (fibre optique monomode, TopoMetrix) et le système aimanté sur laquelle elle est montée,
- la diode laser ($\lambda_a = 670$ nm) et la photodiode à quadrants permettant la régulation de la boucle d'asservissement,
- et une source de lumière blanche qui éclaire l'échantillon.

La platine est constituée :

- d'un tube piézo-électrique : déplacements en x, y jusqu'à 7 mm ; résolution de 0,1 μ m,
- de deux objectifs qui permettent de recueillir le signal en réflexion (Nikon x 20 ; NA 0,35) ou en transmission (Nikon x 60 ; NA 0,7),
- d'un tube photomultiplicateur (Hamamatsu, type R3896),
- et d'une caméra CCD haute résolution.

Le faisceau du laser argon est guidé jusqu'à l'apex de la pointe par couplage avec une fibre optique (3M, type FS-SN 3224). Les déplacements du tube piézo-électrique, la recherche de la fréquence de résonance ainsi que toute la régulation du système sont contrôlés par le logiciel TopoMetrix, SPMLab V 3.06.

iii/ Protocole de fixation des cellules biologiques de type fibroblastes et lymphoblastes

Avant de réaliser les observations par microscopie optique en champ proche, il est nécessaire de fixer les cellules sur des lamelles de microscope selon un protocole de fixation bien défini [Betzig, 1992]^a. Les cellules (3T3-L1 et U937)* sontensemencées dans des boîtes de Pétri comportant des lamelles de microscope. Ces lamelles sont fixées 24h après ensemencement afin d'éviter une concentration cellulaire trop importante. Le protocole de fixation nécessite :

- deux lavages de 10 min dans du PBS,
- une fixation de 10 min dans du formaldéhyde à 3,7% dans du PBS à 37°C,
- trois lavages de 5 min dans du PBS,
- deux rinçages brefs à l'eau distillée puis séchage à l'air.

* Etude réalisée en collaboration avec M. Donner, DR INSERM, GRIMI, Plateau de Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy

B/ Images topographiques

i/ Caractérisation de surfaces planes

L'une des premières applications, réalisée à l'aide du microscope optique à champ proche dans l'équipe du DCPR-GRAPP, a consisté à suivre pas à pas la modification de surfaces de silice lors des différentes étapes nécessaires au greffage d'un fluorophore sur celle-ci [Darne, 1996]. Les surfaces en silice, modifiées par des molécules organiques, trouvent des applications dans divers domaines allant des matériaux composites renforcés par des fibres de silice, aux phases stationnaires de la chromatographie, en passant par leurs applications dans la réalisation de capteurs.

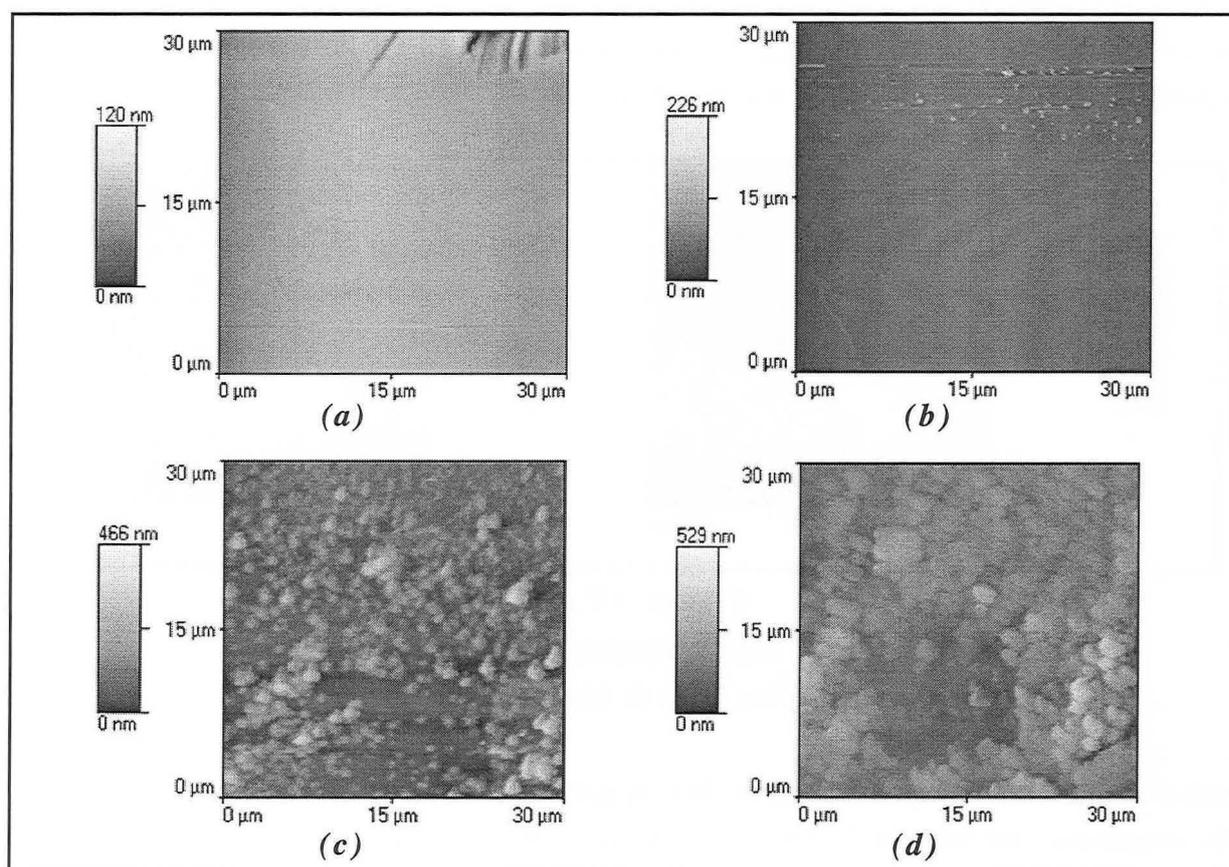


Figure (V.3).2

Différents états de la surface de silice
 avant tout traitement (a), après activation en milieu acide (b),
 après silanisation (c) et après greffage du fluorophore (d).

La figure (V.3).2 montre les différents états de la surface obtenus après chaque traitement, pour un même point sur la plaque.

Avant tout traitement, et suite à l'activation par un milieu acide, la surface apparaît sans rugosité. La silanisation conduit à un recouvrement homogène de la surface, et l'image (d) montre que l'ajout du fluorophore ne modifie pas beaucoup l'aspect de la surface, et que seules les zones silanisées sont greffées.

La microscopie optique en champ proche est donc d'un grand intérêt pour la caractérisation d'échantillons ayant une surface relativement plane, comme nous le voyons ici, et comme nous l'avons déjà vu dans la partie V.2.3. G de ce chapitre.

Lorsqu'il s'agit d'imager des échantillons ayant des topographies plus accidentées, et présentant une surface "molle", les problèmes rencontrés sont nombreux : notre premier objectif a donc été de maîtriser l'appareil et de connaître ses limites en fonction de l'échantillon à analyser.

ii/ Images topographiques d'échantillons "mous"

Les premières images topographiques d'échantillons biologiques ont été réalisées à l'air à partir de spermatozoïdes fixés* ([figure \(V.3\).3a](#)) et de fibroblastes 3T3-L1 de souris ([figure \(V.3\).3b](#)) préalablement fixés sur lamelle de microscope, selon le protocole décrit par Betzig et al., 1992^a.

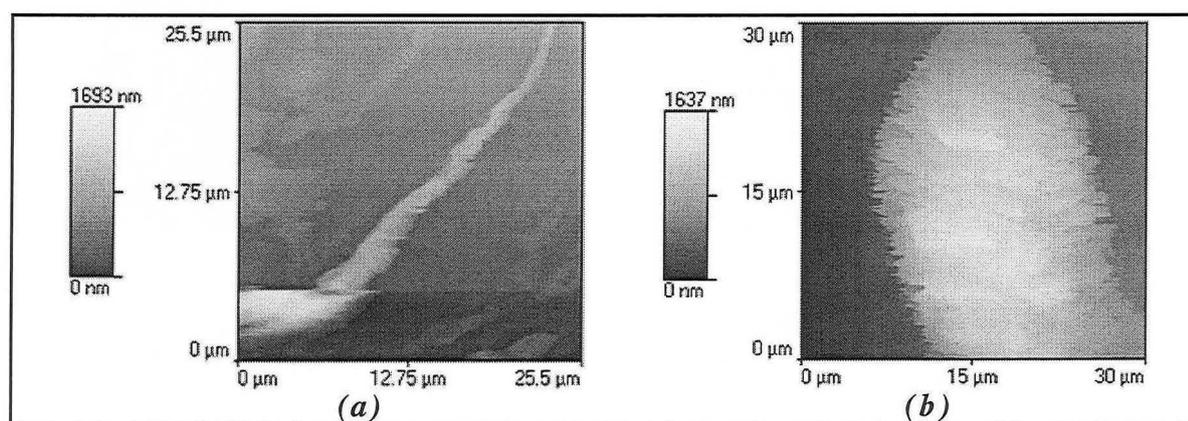


Figure (V.3).3
Images topographiques
de spermatozoïdes (a) et de fibroblastes de souris (b).

L'étude d'échantillons biologiques présente donc plusieurs difficultés :

- la membrane, qui protège la cellule et qui est sondée par la pointe, peut être facilement endommagée en raison de sa souplesse,
- les cellules biologiques sont généralement épaisses, le balayage de la surface est donc difficile à réaliser, et il faut s'assurer qu'il soit suffisamment lent pour permettre aux piézo-électriques de réajuster la position en z de l'échantillon,
- enfin, il faut pouvoir observer des cellules qui ne sont pas à confluence, et qui ont été au préalable fixées sur une lamelle de microscope.

Nous avons ensuite voulu vérifier que les images que nous obtenions n'étaient pas déformées : pour cela, nous avons topographié un globule rouge ([figure \(V.3\).4a](#)), et comparé les dimensions obtenues à celles d'images issues de la littérature ([figure \(V.3\).4b](#)) et réalisées en AFM-contact**.

* Etude réalisée en collaboration avec le Professeur B. Foliguet, Faculté de Médecine, Vandœuvre-les-Nancy

** Image réalisée au service commun de microscopie en champ proche de l'Université Henri Poincaré, Nancy

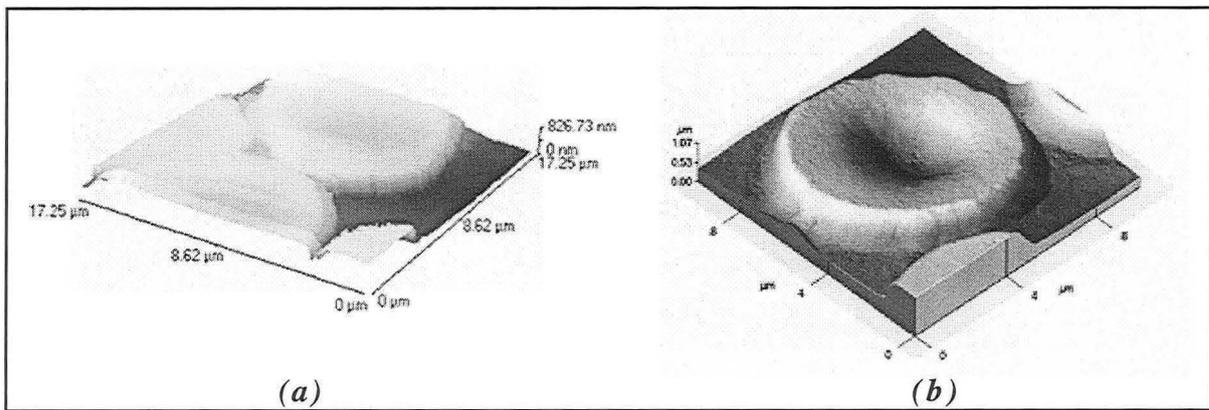


Figure (V.3).4
Images topographiques de globules rouges
en SNOM (a) et en AFM-contact (b).

Les deux topographies montrent un globule rouge d'un diamètre avoisinant les 10 μm , et d'épaisseur de l'ordre de 1 μm , dimensions également mises en évidence par Butt et al., 1990. Dans le cas de l'image SNOM, l'épaisseur semble un peu plus faible, et nous attribuons cela à un étalement de la cellule qui n'a pas subi de protocole de fixation particulier. De plus, l'image AFM a été réalisée en milieu liquide, tandis que l'image SNOM a été réalisée à l'air.

Cette première étude a donc confirmé nos hypothèses, à savoir qu'il était possible de réaliser des images SNOM d'échantillons biologiques et d'obtenir en topographie des résultats comparables à ceux de l'AFM.

Nous avons ensuite évolué progressivement vers la réalisation d'images optiques, réalisées soit en transmission, soit en réflexion.

C/ Images optiques

i/ Par transmission du signal

En mode transmission, seuls des échantillons transparents et faiblement absorbant peuvent être étudiés, tels que des films minces semi-conducteurs ou des spécimens biologiques. Généralement, le mode transmission fournit un signal lumineux plus intense dans la mesure où la lumière détectée se fait dans la même direction que la lumière émise.

Pour montrer les contrastes que peuvent fournir les images optiques en SNOM, nous avons réalisé des images optiques d'un échantillon standard (commercialisé par TopoMétrix) constitué d'un réseau de chrome déposé sur silice (figure (V.3).5).

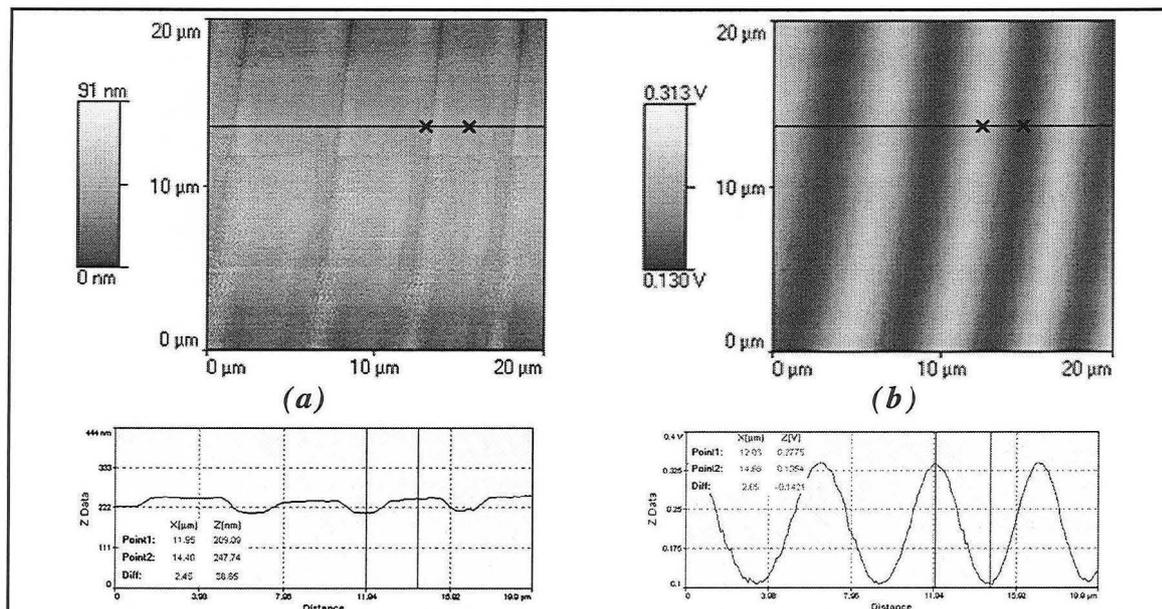


Figure (V.3).5

Images d'un réseau de chrome déposé sur silice en topographie (a) et en optique par transmission (b).

Il est clair que, sur ce genre d'échantillons très plats, la topographie apporte peu d'informations. Sur l'image (a) les variations en z s'échelonnent sur 91 nm, et le passage du chrome à la silice est à peine visible.

Sur l'image optique nous voyons nettement une zone claire, correspondant à la silice qui transmet très bien le signal lumineux, et une zone sombre, qui correspond au chrome qui ne laisse pas passer le signal lumineux ; ces propriétés sont clairement mises en évidence sur le profil en ligne qui accompagne l'image optique (b).

On obtient donc des renseignements sur les caractéristiques optiques de l'échantillon, caractéristiques qui peuvent souvent être complétées avec celles mises en évidence à l'aide d'images optiques par réflexion du signal.

ii/ Par réflexion du signal

En réflexion, un plus grand nombre d'échantillons peut être étudié. Bien que le signal détecté soit généralement légèrement inférieur à celui obtenu en mode transmission, l'information recueillie provient essentiellement de la surface de l'échantillon et la résolution latérale est bien meilleure.

La figure (V.3).6 présente donc le même échantillon que la figure précédente, analysé dans la même zone, mais imagé en mode réflexion. Dans ce cas, on peut observer une zone claire, correspondant au chrome qui réfléchit très bien le signal lumineux et une zone sombre, qui correspond au verre qui réfléchit très peu le signal lumineux.

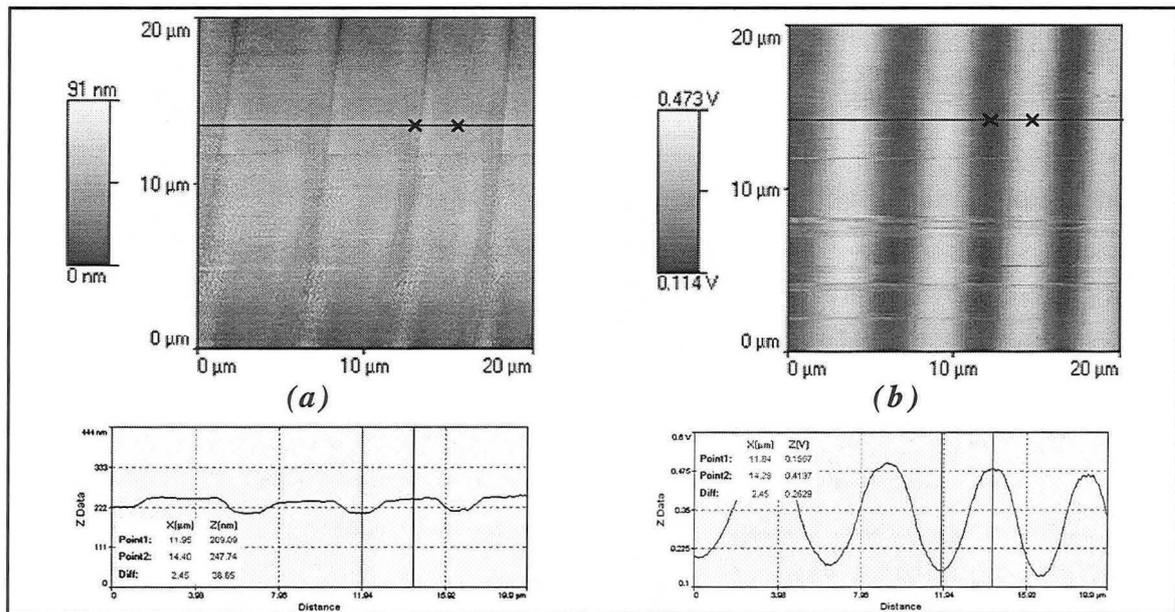


Figure (V.3).6

Images d'un réseau de chrome déposé sur silice
en topographie (a), et en optique par réflexion (b).

La figure (V.3).6 est donc l'inverse de la figure (V.3).5, puisque la zone claire de l'une des figures correspond à la zone sombre de l'autre, et réciproquement : les informations recueillies sont donc complémentaires.

L'un des avantages d'opérer en mode réflexion concerne la détection de fluorescence dans le cas d'échantillons biologiques. En effet, dans ce mode, on recueille beaucoup moins de lumière excitatrice qu'en mode transmission. Ainsi, en mode réflexion, le bruit de fond produit par la lumière incidente est nettement plus faible qu'en mode transmission (où l'analyse se fait en ligne).

iii/ Application à des échantillons biologiques

L'évolution de ce travail s'est poursuivie par la réalisation d'images optiques d'échantillons biologiques. Dans ce cas de figure, la réalisation d'images en transmission tout comme celle d'images par réflexion posent plus de problèmes en raison du substrat sur lequel sont fixées les cellules biologiques. Les lamelles de microscope sont peu réfléchissantes et le réglage du laser pour l'élaboration d'images topographiques (nécessaires à la réalisation des images optiques) est difficile à mettre en œuvre.

Néanmoins, nous avons pu réaliser différentes images SNOM, à l'air, d'une lignée de lymphoblastes d'origine humaine, la lignée U937, fixés sur lamelle de verre selon le protocole décrit dans la partie "matériels et méthodes" (§ V.3.1. A) de ce chapitre (figure (V.3).7).

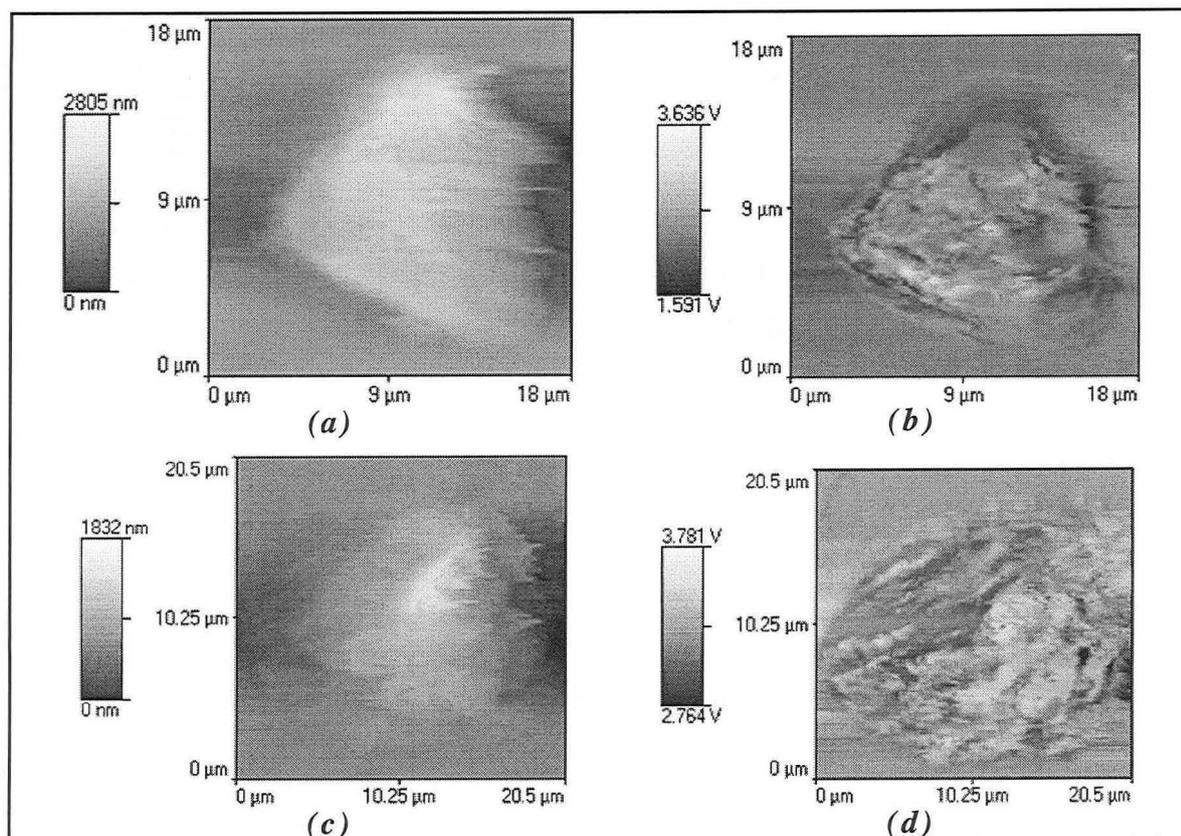


Figure (V.3).7

Images de lymphoblastes d'origine humaine (lignée U937)
en topographie (a, c), et en optique par transmission (b, d).

Dans le cas d'échantillons biologiques, les images topographiques ne sont pas d'un grand intérêt. Seules les images optiques, si elles sont combinées avec des images de fluorescence SNOM peuvent permettre de visualiser les structures fines de la cellule telles que les lysosomes (200-500 nm), les mitochondries (1-4 μm), les constituants du cytosquelette filamenteux (de 7 à 25 nm de diamètre), de localiser la position du noyau (3-10 μm) au sein de la cellule, et de visualiser la membrane plasmique et les protéines (80-100 nm) incluses dans le feuillet lipidique. Il est clair que sur les images présentées, on peut distinguer un grand nombre de structures fines, sans pour autant pouvoir actuellement les attribuer à quelque élément que ce soit : il faudrait pour cela pouvoir différencier tous les constituants par des marquages spécifiques ; ici seul le noyau est localisable.

Les images optiques par transmission apportent plus d'informations que les images optiques par réflexion (figure (V.3).8) dans la mesure où le signal lumineux traverse toute la cellule (notons que les images présentées sur la figure (V.3).8 n'ont pas été réalisées sur les mêmes cellules que celles de la figure (V.3).7). Les images SNOM par réflexion permettent de beaucoup mieux localiser le noyau et les constituants volumineux de la cellule. Ces deux images SNOM restent complémentaires, et si elles sont associées à des images en émission de fluorescence, elles permettront une certaine compréhension du système cellulaire.

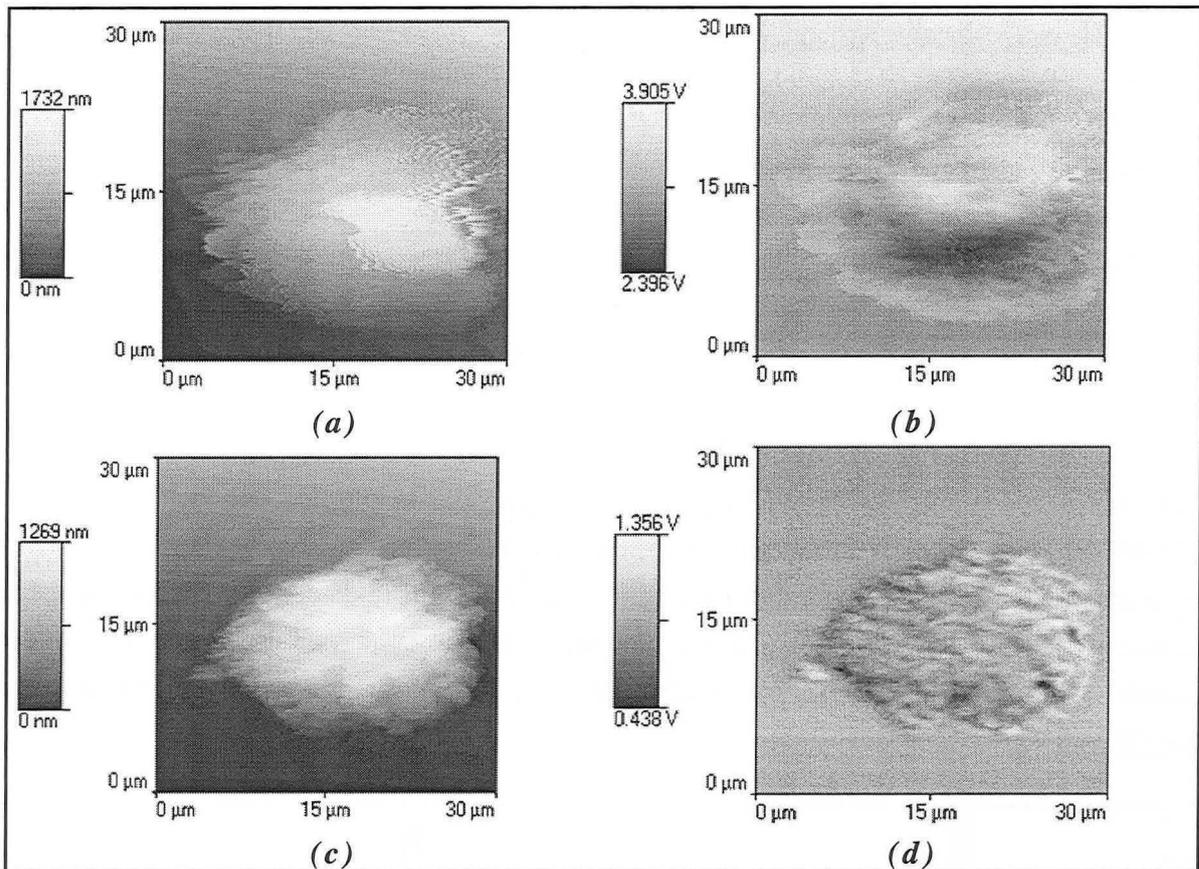


Figure (V.3).8

Images de lymphoblastes d'origine humaine (lignée U937)
en topographie (*a, c*) et en optique par réflexion (*b, d*).

Toutefois, il ne faut pas oublier qu'à l'heure actuelle se pose le problème de l'interprétation des images obtenues par microscopie optique en champ proche, dans la mesure où il est difficile de connaître la part de signal provenant du champ proche et celle provenant du champ lointain.

Ce travail nous a donc permis de prendre conscience des possibilités offertes par le SNOM pour des études dans le domaine de la biologie. Néanmoins les problèmes rencontrés ont été nombreux :

- mauvaise réflexion du faisceau laser sur les lamelles de microscope en verre, pour suivre la topographie,
- épaisseur importante de l'échantillon, d'où une sollicitation fréquente et rapide des piézo-électriques conduisant à un "décrochage" de la pointe et à un échec,
- problèmes de préparation de l'échantillon. Le protocole de fixation n'étant pas valable pour tous les types de cellules, comme c'est le cas pour les cellules endothéliales, nous sommes confrontés à une "cristallisation" du tampon à la surface des cellules et donc à une impossibilité pour la pointe de balayer la surface de l'échantillon.

Ainsi, même si la maîtrise de la technique est difficile dans ce domaine, c'est certainement un outil très prometteur pour les biologistes aussi, afin d'apporter un avantage supplémentaire à la microscopie optique en champ proche dans ce domaine, nous nous sommes attachés à l'évolution de cette technique en milieu aqueux : l'intérêt étant d'étudier des cellules *in vivo*.

iv/ Etude en milieu aqueux

Pour démontrer que le SNOM est une technique largement au-delà de la microscopie optique conventionnelle, il a fallu prouver les capacités du SNOM à travailler en milieux liquides.

En fait, très peu d'auteurs ont travaillé sur le sujet puisque la plupart ont utilisé un combiné SNOM/AFM [Ataka, 1996 ; Muramatsu, 1996]. A ma connaissance ce sont Seaver et al., 1995, qui ont les premiers commencé par montrer qu'à l'interface liquide/air la détection d'ondes évanescentes était toujours possible. Plus tard, face à des problèmes de déviation du faisceau laser à l'interface air/liquide, Moyer et al., 1996, ont élaboré une cellule pour travailler en milieu liquide (figure (V.3).9).

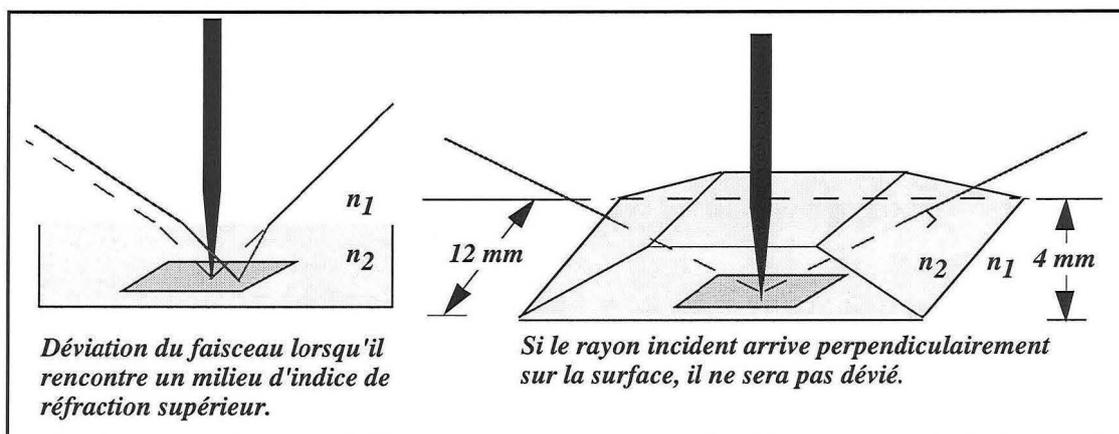


Figure (V.3).9

Cellule élaborée par Moyer et al., 1996,
pour des observations en milieu liquide.

Cette cellule, confectionnée à partir de lamelles de microscope doit avoir une taille bien particulière (figure (V.3).10) pour pouvoir être adaptée au microscope SNOM-Aurora, en raison de la place disponible entre la platine porte-objet et la tête du microscope sur laquelle est aimantée la pointe.

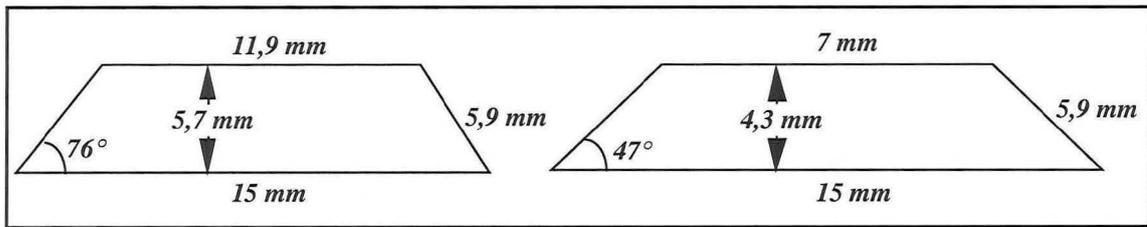


Figure (V.3).10

Cotes de la cellule [Moyer, 1996].

Elle doit également avoir une géométrie bien particulière de façon à ce que le faisceau laser nécessaire à la réalisation des différentes images arrive perpendiculairement à la surface de la cellule de mesure, et qu'il soit réfléchi sur l'échantillon perpendiculairement vers le photodétecteur.

Grâce à cette cellule, ces auteurs ont pu réaliser des images topographiques et optiques d'un échantillon constitué d'îlots d'aluminium, déposés sur une lamelle de verre.

Nous avons également voulu utiliser le même type de cellule pour effectuer des images topographiques et SNOM d'échantillons biologiques. Cependant la taille de l'ouverture de la cellule n'était pas adaptée pour incorporer une lamelle de microscope et nécessitait trop de manipulations.

Nous avons donc élaboré un autre système, permettant de travailler en milieu aqueux à la condition de ne déposer sur l'échantillon qu'une très fine couche de liquide.

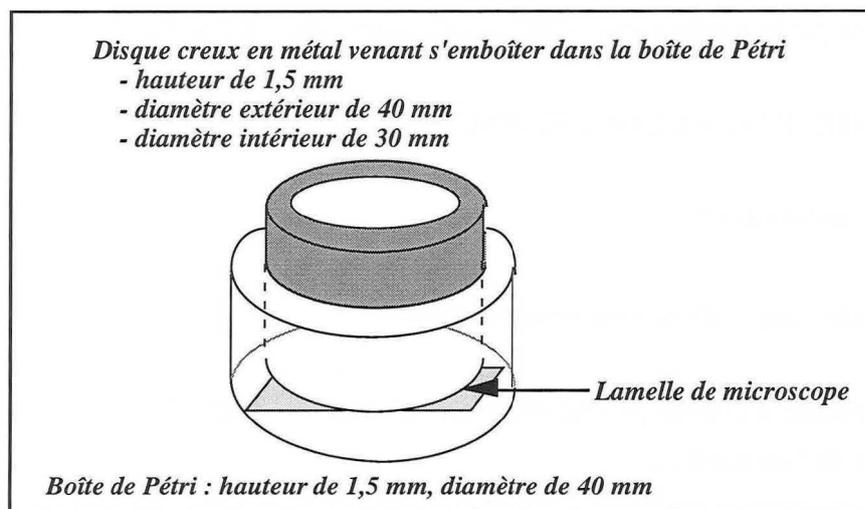


Figure (V.3).11

Schéma et cotes de la cellule.

Ce système (figure (V.3).11) utilise une boîte de Pétri de 40 mm de diamètre, coupée à 1,5 mm de hauteur. La lamelle sur laquelle sont fixées les cellules est déposée dans cette boîte, recouverte d'une fine pellicule de milieu liquide et maintenue en place par une rondelle métallique. C'est cette même rondelle, qui par conduction de chaleur, pourrait servir à chauffer le milieu liquide de façon à le maintenir à température constante.

Grâce à ce système, nous avons pu réaliser des images topographiques et optiques de cellules biologiques de la lignée U937 en milieu liquide (figure (V.3).12).

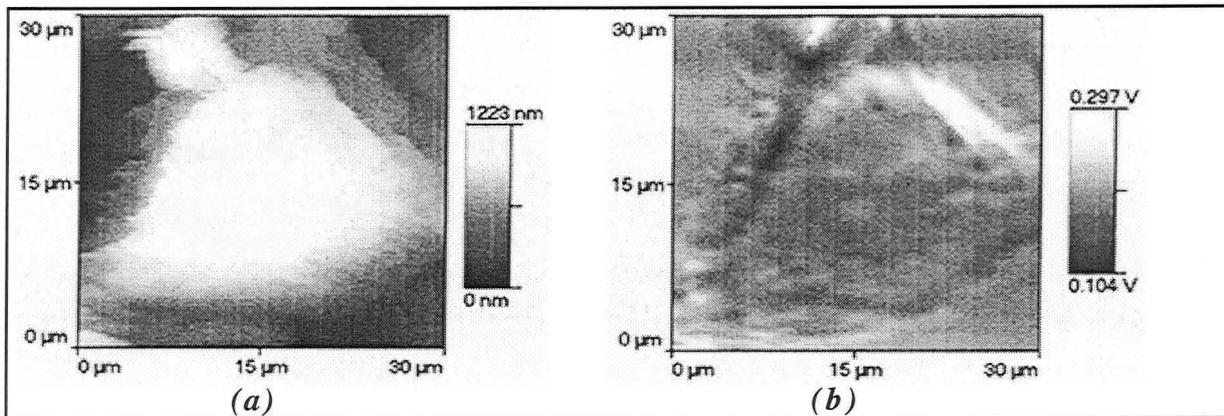


Figure (V.3).12
Images topographique (a) et SNOM en réflexion (b)
d'une cellule biologique (lignée U937) maintenue en milieu liquide.

Il est donc tout à fait possible de travailler avec des échantillons maintenus dans un milieu liquide. Dans ces conditions, la technique n'est pas facile à utiliser et il est évident qu'à l'heure actuelle une combinaison SNOM/AFM est le meilleur moyen de travailler en milieu liquide et d'allier les capacités de l'AFM à réaliser des images topographiques en milieu aqueux, et les capacités du SNOM à fournir des images optiques par transmission ou réflexion du signal avec une très grande résolution latérale.

V.3.2. IMAGERIE PAR FLUORESCENCE

A/ Matériels et méthodes

i/ Modifications apportées au microscope "Aurora"

Le microscope optique à champ proche commercial, Aurora-TopoMetrix, n'est pas équipé pour réaliser des images de fluorescence.

Très vite, nous nous sommes rendus compte que la géométrie de l'appareil limitait son utilisation et que le système de détection mis en place n'était pas suffisamment sensible pour détecter le signal de fluorescence, souvent faible face aux faisceaux lumineux parasites provenant des deux lasers nécessaires (laser argon, 488 nm ; laser de suivi, 670 nm), et qui empruntent le même chemin que le signal à détecter. Par ailleurs, les objectifs mis en place sur l'appareil ont une ouverture un peu faible pour recueillir un maximum de signal.

Face à tous ces problèmes, de nombreuses modifications sont à apporter à l'appareil, et la figure (V.3).13 présente toutes les modifications nécessaires pour pouvoir utiliser le SNOM-"Aurora" en fluorescence. Ces modifications, ont déjà été entreprises par P. Vanoppen du Laboratoire de Spectroscopie de Leuven, Belgique, dirigé par le Professeur De Schryver, en collaboration avec P.F. Barbara du Département de Chimie de Minnesota, USA.

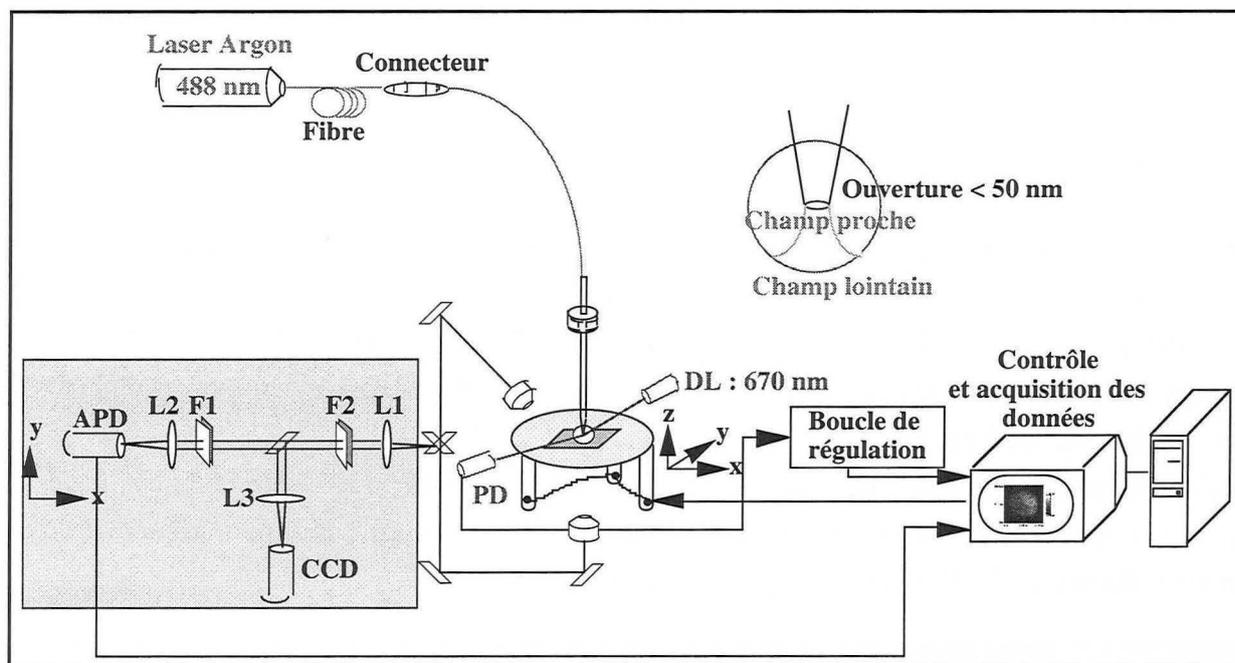


Figure (V.3).13

Schéma du SNOM-"Aurora" après les modifications nécessaires pour pouvoir recueillir un signal de fluorescence.

Ces changements ne modifient pas le fonctionnement de l'appareil, seule la détection est modifiée. Pour cela, il est possible d'utiliser un système de lentilles qui permet d'éclater le faisceau lumineux de façon à pouvoir d'une part le dévier vers la caméra CCD à l'aide d'un miroir pivotant, et d'autre part intercaler des filtres holographiques qui permettront de s'affranchir des longueurs d'onde parasites. Ce filtrage spectral sera efficace à condition que le faisceau lumineux soit bien colimaté.

L'étude en fluorescence se fait en particulier avec l'objectif en transmission, de façon à minimiser la perte de signal ; on peut donc remplacer l'objectif fourni avec l'appareil par un objectif ayant une plus grande ouverture numérique (NA 0,95) et éventuellement un objectif à immersion d'huile (NA 1,4).

ii/ Caractéristiques du matériel utilisé

L'objectif pour travailler en réflexion n'est pas modifié. Seul l'objectif de transmission est amélioré. On peut utiliser :

- soit un Nikon x 160 ; NA 0,95,
- soit un Nikon x 100 à immersion d'huile ; NA 1,4.

Un système de lentilles achromatiques ayant respectivement des distances focales de 120 mm (lentille L1), 60 mm (lentille L2) et 60 mm (lentille L3) est également nécessaire.

Deux filtres holographiques (Kaiser Optical System) de 488 nm et 670 nm, associés au système de détection permettent de s'affranchir au maximum des longueurs d'onde excitatrices.

Enfin, la détection du signal de fluorescence ne se fait plus au moyen d'un photomultiplicateur mais d'une Photodiode Avalanche (EG&G), plus adaptée à la mesure de faibles quantités de photons.

B/ Observation de cellules biologiques

L'ultime étape de notre étude consistait à observer la fluorescence de cellules biologiques au moyen du SNOM. La localisation d'un traceur fluorescent étant difficile à prévoir, cette technique était pour nous un moyen supplémentaire de suivre le marquage de différents échantillons biologiques, avec une résolution latérale de quelques dizaines de nanomètres, et de permettre grâce aux images optiques de reconnaître les sites de localisation.

En collaboration avec P. Vanoppen (Leuven, Belgique), nous avons pu réaliser quelques images de fluorescence SNOM de lymphoblastes de la lignée U937, en utilisant comme marqueur le rotor coumarine glucidique CNCONHGlu (figure (V.3).14).

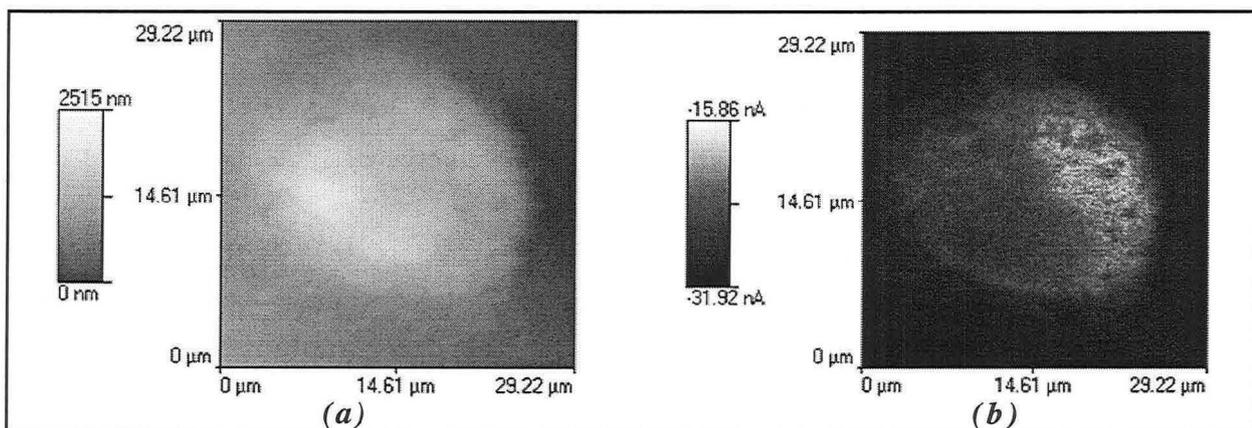


Figure (V.3).14

Images topographique (a) et de fluorescence (b) de lymphoblastes.

Sur l'image de fluorescence, il apparaît que la sonde est localisée à l'extérieur du noyau, certainement dans le cytoplasme de la cellule, et non dans le feuillet externe de la membrane puisque la fluorescence est répartie sur l'ensemble de la cellule.

L'image (b) correspond bien aux observations que nous avons déjà faites, par ailleurs, avec le CELLscanTM sur des cellules endothéliales. Cela pourrait laisser supposer que le rotor glucidique synthétisé se répartit dans le cytoplasme cellulaire, quel que soit le type de cellule considéré.

V.4. CONCLUSION

L'acquisition en 1995 d'un microscope optique à champ proche par notre laboratoire, a vivement intéressé de nombreuses équipes de biologistes avec lesquelles nous avons commencé une collaboration. Ces chercheurs ont voulu connaître les possibilités de cette nouvelle technologie, et mon travail a donc consisté à analyser différents types de cellules biologiques, en topographie et en optique, afin de cerner les différents paramètres limitants de la méthode et de développer notre microscope en conséquence.

Aujourd'hui, il est clair que cette technique peut être d'un grand intérêt pour les biologistes en raison de la finesse des détails accessibles à la surface des échantillons et des différentes possibilités d'acquisition du SNOM (topographie, images optiques, émission de fluorescence). De plus, en modifiant notre appareil, nous nous donnons la possibilité de travailler avec une autre source d'excitation (source UV) mais également de travailler en comptage monophotonique (utilisation de la diode avalanche).

Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que l'évolution rapide de toutes les techniques de microscopie (microscopies en champ proche, microscopies confocales, microscopies optiques 3D) tend vers une complémentarité de ces différentes techniques plutôt qu'à essayer de les faire évoluer de façon isolée.

CONCLUSION

GENERALE

L'objectif de ce travail a été d'élaborer des traceurs fluorescents ayant un domaine d'absorption proche de 490 nm convenant à la fois

- ❑ pour des études dans des milieux biologiques (la lumière excitatrice doit se situer au-delà de 450 nm, domaine d'absorption des composants cellulaires), et
- ❑ pour la détection de la fluorescence d'échantillons biologiques par microscopie optique en champ proche (la source laser disponible émet à 488 nm).

Six dérivés coumarine fluorescents ont été synthétisés. Ces composés présentent tous un groupement 7-N,N-diéthylamino, donneur d'électrons et un groupement attracteur d'électrons placé en position-3 sur l'hétérocycle coumarine, séparés par une conjugaison plus ou moins longue mais permettant un transfert de charge intramoléculaire. Parmi ces composés fluorescents, on compte deux dérivés acides (COOH et CNCOOH) et deux dérivés esters (COOEt et CNCOOEt) qui ont été obtenus avec des rendements élevés (supérieurs à 70%). De plus, par condensation d'une glucosamine dans sa forme acétylée sur le dérivé acide portant une double liaison, puis hydrolyse de ce composé, nous avons obtenu deux dérivés glucidiques fluorescents (CNCONHGluAc et CNCONHGlu), avec un rendement de l'ordre de 40%.

En tirant parti des structures chimiques de ces composés, pouvant se comporter comme des rotors moléculaires fluorescents, nous avons étudié leurs propriétés photophysiques tant en excitation continue, qu'en excitation pulsée dans des solvants de différentes polarités et viscosités.

La première étude a montré que trois de ces composés (rotors CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc) possèdent des longueurs d'onde d'absorption au-delà de 490 nm répondant ainsi à notre objectif.

- ❑ En ce qui concerne les effets de solvant, le déplacement vers le rouge des longueurs d'onde au maximum d'émission de fluorescence permet de rendre compte d'une modification de l'environnement en terme de polarité.
- ❑ L'aspect viscosité, quant à lui, est principalement mis en évidence par les augmentations de l'efficacité de l'émission de fluorescence traduisant bien l'accroissement de la rigidité de l'environnement local du traceur.

Les grands déplacements de Stokes, les faibles rendements et durées de vie de fluorescence dans des solvants de forte polarité sont autant d'éléments caractérisant l'existence d'un déclin de fluorescence non radiatif à partir d'un état "twisté" à transfert de charge intramoléculaire (TICT).

La seconde étude, concernant les déclins de fluorescence, a révélé l'existence de deux durées de vie, caractérisant probablement la présence d'un conformère de nos molécules, à l'état excité. Ces deux durées de vie ne semblent pas provenir du même composé puisqu'elles ne subissent pas la même influence de la température.

En effet, la durée de vie la plus longue (de 0,3 ns en milieu fluide à 2,5 ns en milieu visqueux) diminue nettement avec une augmentation de température, tandis que la plus courte (de l'ordre de 0,5 ns) ne fluctue pratiquement pas.

La suite de ce travail a consisté à suivre la localisation et l'évolution de ces traceurs dans des systèmes biologiques simples ou complexes tels que les cellules endothéliales.

Au préalable, nous avons montré leur intérêt pour l'étude de systèmes moléculaires organisés de type liposomes, en ce sens que ces systèmes représentent des modèles de milieux biologiques. Nous avons donc incorporé trois marqueurs (rotors CNCOOEt, CNCONHGlu et CNCONHGluAc) au sein de liposomes de DPPC afin de caractériser leur température de transition (T_M).

- ❑ Parmi les trois rotors, seul le CNCONHGlu montre une incorporation rapide et stable au sein des chaînes d'acide gras de DPPC ; les deux autres sondes présentent une cinétique d'incorporation qui fluctue au cours du temps.
- ❑ Autour de la T_M qui correspond à une modification de la structure moléculaire des vésicules, seules les sondes glucidiques présentent un changement de pente dans le tracé de type Arrhénius, autour de 41°C. Cette valeur correspond bien à la température de transition de phase du DPPC.

Une très grande différence de comportement est donc apparue entre les traceurs glucidiques et le dérivé ester, mais également entre les rotors glucidiques hydroxylés et acétylés. Nous avons alors émis l'hypothèse que le rotor CNCOOEt, ne s'incorporait pas entre les phospholipides de DPPC.

En seconde partie, nous avons étudié le comportement de ces traceurs au sein d'une monocouche de cellules endothéliales. Nous avons alors constaté que la sonde acétylée est un marqueur beaucoup plus efficace que son homologue hydroxylé, et que le rotor CNCOOEt semble présenter un grand intérêt vis-à-vis des cellules endothéliales.

Une étude plus approfondie avec le rotor CNCONHGluAc a montré que :

- ❑ la concentration en sonde, nécessaire pour un marquage optimal est de $3 \cdot 10^{-5}$ M, concentration qui reste raisonnable pour éviter toute formation d'agrégats et qui ne semble pas affecter la viabilité cellulaire,
- ❑ des tests de toxicité ont également révélé que cette sonde ne modifie pas l'aspect des cellules qui conservent leurs propriétés adhésives.

Nous avons ensuite étudié la spécificité de nos sondes en les comparant à différents marqueurs d'organites subcellulaires, couramment utilisés dans le domaine biologique. Nous en avons conclu que :

- ❑ le rotor CNCOOEt ne semble pas suivre de manière stricte le marquage mitochondrial visible avec la rhodamine 123, ni le marquage réticulaire. Cependant nous avons retrouvé pour cette sonde un marquage similaire à celui obtenu avec le styrylpyridinium (marqueur membranaire). Des études complémentaires doivent encore être menées pour pouvoir confirmer cette hypothèse,
- ❑ le rotor CNCONHGluAc est apparu clairement comme étant un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique et la double potentialité des rotors moléculaires, variation en fonction de la polarité et de la viscosité, devrait permettre de suivre les modifications métaboliques survenant dans cet organite subcellulaire,
- ❑ le rotor glucidique non acétylé, quant à lui ne présente pas de site de localisation particulier : il semble plutôt être diffus dans tout le cytoplasme de la cellule.

Par ailleurs, il sera nécessaire, pour confirmer ces hypothèses et valider l'intérêt biologique de ces sondes, de soumettre les cellules à différents stimuli physiologiques modifiant l'activité des organites subcellulaires (métabolisme des acides gras à chaînes courtes, métabolisme glucidique, homéostasie calcique...) et de suivre l'évolution des caractéristiques physico-chimiques des rotors moléculaires dans ces conditions particulières.

De plus, les cellules des organismes supérieurs étant différenciées à un haut niveau, il serait également nécessaire de tester ces traceurs dans des cellules de différents types et dans diverses conditions physiologiques. Prenons par exemple les cellules endothéliales soumises à des stress mécaniques (forces de cisaillement) ou chimiques (interactions avec des cytokines) ou encore des neurones soumis à un choc hypoxique, ce qui aurait comme résultats de modifier l'ensemble de l'équilibre métabolique de ces cellules.

Nos résultats nous ont donc permis de mettre en évidence l'efficacité des rotors moléculaires fluorescents glucidiques pour l'étude de membranes biologiques. Il apparaît que selon la structure de base du rotor, la fonction glucidique est plus ou moins intéressante, et se révèle même parfois sans apport supplémentaire. Dans certains cas, la localisation du rotor glucidique est différente de celle de son homologue non glucidique, c'est donc la fonction glucosamine qui détermine la spécificité de la sonde : elle joue alors le rôle de molécule d'ancrage.

Mais l'intérêt des rotors moléculaires fluorescents glucidiques ne s'arrête pas là : ce sont, comme nous avons pu le voir tout au long de ce travail, des sondes de polarité, des sondes de viscosité et de pH qui peuvent être synthétisées sans trop de difficultés, et surtout avec des prix de revient très faibles (si l'on considère uniquement le coût des réactifs chimiques) par comparaison avec des

marqueurs tels que le TMA-DPH (Molecular Probes, 25 mg, ≈ 1155 FF), le styrylpyridinium (Molecular Probes, 1 mg, ≈ 1050 FF), ou le DiOC₆ (Molecular Probes, 100 mg, ≈ 644 FF). Il est bien entendu, que ces tarifs prennent en compte différents facteurs (utilisation du matériel, emploi de personnel) que nous n'avons pas considérés dans notre cas.

Ces études ouvrent donc la porte à une nouvelle génération de sondes fluorescentes utilisables en biologie cellulaire, et laissent aux biologistes un choix important d'outils permettant l'approche, par une méthode relativement douce, de fonctions cellulaires difficilement accessibles par les sondes fluorescentes classiques.

Par ailleurs, l'observation de différents types de cellules biologiques par microscopie optique en champ proche s'est révélée d'un grand intérêt. En effet, même si cette microscopie reste très complexe d'utilisation, elle permet d'accéder à des détails d'une grande finesse se trouvant à la surface des échantillons et ce par différentes méthodes d'acquisition (réalisation d'images topographiques et optiques par transmission ou réflexion du signal). L'inconvénient majeur étant que les observations doivent être réalisées à l'air à partir de cellules fixées sur lamelle.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à montrer qu'il était possible de réaliser ces différents types d'images en milieu aqueux, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour des études *in vitro*. Parallèlement, nous avons obtenu des images de fluorescence de cellules biologiques marquées avec l'un des rotors synthétisés (sonde CNCONHGlu), résultats qui nous ont encouragés à modifier partiellement la configuration de notre appareil afin de pouvoir ajouter l'option fluorescence à cette microscopie.

A la suite de nos résultats, de nombreux projets de collaboration se sont ouverts, et devraient commencer dès l'amélioration de l'appareil. Ils concernent :

- ❑ L'étude de la propagation d'un stress oxydatif généré sur la membrane plasmique de cellules endothéliales de façon très localisée (topographiquement, une déformation de la membrane plasmique doit s'observer avec formation de "blebs" dans la zone irradiée qui progressivement doit gagner la zone non irradiée) en collaboration avec le Professeur R. Santus, Museum d'Histoire Naturelle, Paris ;
- ❑ L'étude de la morphologie de cellules endothéliales soumises à un stress mécanique en collaboration avec le Professeur J.F. Stoltz, Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, Nancy ;
- ❑ Le suivi, à l'aide d'analogues fluorescents de phospholipides, de la fixation de ligands sur leur récepteur à la surface cellulaire pour l'étude des modifications de l'organisation lipidique membranaire en collaboration avec M. Donner, Groupe de Recherche sur les Interactions Moléculaires aux Interfaces, Nancy.

Cet intérêt pour cette nouvelle technique de microscopie optique en champ proche est donc très encourageant. Dans ce sens un projet de recherche conjoint entre notre laboratoire dépendant du CNRS et le Conseil National de Recherches du Canada vient d'être accordé. Ce projet concerne le développement de la fluorescence en microscopie optique en champ proche, avec des applications en biologie cellulaire, et des actions amont liées à des aspects capteurs optiques et traceurs fluorescents.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

A

[**ABDEL-MOTTALEB, 1990**] : ABDEL-MOTTALEB M.S.A., EL-KADY M.Y, LOUTFY R.O., WINNIK F. [1990]

Flexible styrylcoumarin fluorescence probe for polymerization
 J. Photochem. Photobiol., A. Chem., 53, 387-396

[**ADIBNEJAD, 1996**] : ADIBNEJAD M. [1996]

Les rotors moléculaires fluorescents. Synthèse-Etude photophysique-Applications
 Thèse INPL, DCPR-GRAPP, ENSIC, Nancy

[**AKKERMAN, 1986**] : AKKERMAN J.W.N., NIEUWENHUIS H.K., SIXMA J.J. [1986]

Thrombosis and Atherosclerosis
 Ed. Bøehringer Ingelheim, Part I, 26-27

[**ALBERTS, 1986**] : ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. [1986]

Dans "*Biologie moléculaire de la cellule*"
 Ed. Flammarion, Paris

[**ANDRE, 1983**] : ANDRE J.C., DONNER M. [1983]

Mouvements de translation dans les membranes biologiques
 Dans "Techniques avancées en hémostase", DPIC-INPL Ed., Nancy, 361-401

[**ANDRE, 1990**] : ANDRE J.C., BAROS F., BOUCHY A., BOUCHY M., DONG W., DUHAMEL J., REIS E SOUSA T., VIRIOT M.L. [1990]

Recent studies on coupling between translational transport and reactivity at molecular scale : models and experimentation
 Laser Chem., 10, 431-454

[**ARRIGONI-MULLER, 1988**] : ARRIGONI-MULLER S. [1988]

Applications de la polarisation de fluorescence en biologie cellulaire
 Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy I

[**ASH, 1972**] : ASH E.A., NICHOLLS G. [1972]

Super-resolution aperture scanning microscope
 Nature, 237, 510-512

[**ATAKA, 1996**] : ATAKA T., MURAMATSU H., NAKAJIMA K., CHIBA N., HOMMA K., FUJIHARA M. [1996]

Design and application of scanning near-field optical/atomic force microscopy
 Thin Solid Films, 273, 154-160

B

[**BACHELOT, 1996**] : BACHELOT R. [1996]

Etude et réalisation d'un microscope optique en champ proche utilisant une sonde sans ouverture
 Thèse de Doctorat, Université de Paris VII

[**BAIDA, 1992**] : BAIDA F., COURJON D., TRIBILLON G. [1992]

Combinaison of a fiber and a silicon nitride tip as a bifunctional detector : first results and perspectives
 Near Field Optics, Ed. D.W. Pohl and D. Courjon, NATO ASI Series, 232, 71-78

[**BANGAR RAJU, 1994**] : BANGAR RAJU B., VARADARAJAN T.S. [1994]

Substituent and solvent effects on the twisted intramolecular charge transfer of three new 7-(diethylamino)coumarin-3-aldehyde derivatives
 J. Phys. Chem., 98, 8903-8905

[BANGAR RAJU, 1995] : BANGAR RAJU B., VARADARAJAN T.S. [1995]

Photophysical properties and energy transfer dye laser characteristics of 7-diethylamino-3-heteroaryl coumarin in solution

Laser Chem., 16, 109-120

[BARCHIESI, 1993] : BARCHIESI D. [1993]

Modélisation des microscopes optiques en champ proche : STOM-SNOM. Optimisation et spectroscopie

Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon

[BAUMANN, 1992] : BAUMANN W., BISCHOF H., FROHLING J.C., BRITTINGER C., RETTIG W., ROTKIEWICZ K. [1992]

Considerations on the dipole moment of molecules forming the twisted intramolecular charge transfer state

J. Photochem. Photobiol., A, 64, 49-72

[BENTIKOUK, 1988] : BENTIKOUK Z., VIRIOT M.L., SIEST G., ANDRE J.C. [1988]

New molecular rotors. Synthesis and fluorescence

Proceedings "XII IUPAC Symposium on Photochemistry", Bologne, Italie (22-27 juillet), 612-613

[BENTIKOUK, 1990] : BENTIKOUK Z. [1990]

Des rotors moléculaires fluorescents associés à des optodes pour les immunodosages

Thèse INPL, DCPR-GRAPP, ENSIC, Nancy

[BERGMANN, 1932] : BERGMANN M., ZERVAS L., [1932]

Synthesis of glucopeptides of D-glucosamine (N-glycyl-D-glucosamine and N-D-alanyl-D-glucosamine)

Ber., 65B, 1201-1205

[BERGOSSI, 1995] : BERGOSSI O. [1995]

Mise au point et applications d'un microscope optique en champ proche en réflexion (R-SNOM). Combinaison avec un microscope à forces de cisaillements

Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon

[BERROY, 1997] : BERROY P. [1997]

Synthèse d'un rotor "cinnamylidène-inositol" et étude de ses propriétés de fluorescence dans des systèmes membranaires modèles

DEA "Génie Biologique", DCPR-GRAPP, ENSIC-INPL, Nancy

[BETZIG, 1987] : BETZIG E., ISAACSON M., LEWIS A. [1987]

Collection mode near-field scanning optical microscopy

Appl. Phys. Lett., 51, 2088-2090

[BETZIG, 1991] : BETZIG E., TRAUTMAN J.K., HARRIS T.D., WEINER J.S., KOSTELAK R.L. [1991]

Breaking the diffraction barrier : optical microscopy on a nanometric scale

Science, 251, 1468-1470

[BETZIG, 1992]^a : BETZIG E., TRAUTMAN J.K. [1992]

Near-field optics : microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit

Science, 257, 189-195

[BETZIG, 1992]^b : BETZIG E., TRAUTMAN J.K., WEINER J.S., HARRIS T.D., WOLFE R. [1992]

Polarization contrast in near-field scanning optical microscopy

Applied Optics, 31, 4563-4568

[BETZIG, 1992]^c : BETZIG E., FINN P.L., WEINER J.S. [1992]

Combined shear force and near-field scanning optical microscopy

Appl. Phys. Lett., 60, 2484-2486

[BETZIG, 1993]^a : BETZIG E., CHICHESTER R.J. [1993]

Single molecule observed by near-field scanning optical microscopy

Science, 262, 1422-1425

[BETZIG, 1993]^b : BETZIG E., CHICHESTER R.J., LANNI F., TAYLOR D.L. [1993]

Near-field fluorescence imaging of cytoskeletal actin

Bioimaging, 1, 129-135

[**BINNIG, 1982**] : BINNIG G., ROHRER H., GERBER Ch., WEIBEL E. [1982]
Surface studies by scanning tunneling microscopy
Phys. Rev. Lett., 49, 57-61

[**BINNIG, 1986**] : BINNIG G., QUATE C.F., GERBER Ch. [1986]
Atomic force microscope
Phys. Rev. Lett., 56, 930-935

[**BORENSTAIN, 1993**] : BORENSTAIN V., BARENHOLZ Y. [1993]
Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization
Chem. Phys. Lipids, 64, 117-127

[**BORN, 1970**] : BORN M., WOLF E. [1970]
Principle of Optics
Pergamon Press

[**BOUCHY, 1982**] : BOUCHY M. [1982]
Dans "*Déconvolution - Reconvolution*", ENSIC - INPL, Nancy

[**BRETSCHER, 1985**] : BRETSCHER M. [1985]
Les molécules de la membrane cellulaire
Pour la science, 98, 66-78

[**BUTT, 1990**] : BUTT H.J., WOLFF E.K., GOULD S.A.G., DIXON NORHERN B., PETERSON C.M.,
HANSMA P.K. [1990]
Imaging cells with the atomic force microscope
J. Struct. Biol., 105, 54-61

C

[**CARMINATI, 1995**] : CARMINATI R., GREFFET J.J. [1995]
Influence of dielectric contrast and topography on the near field scattered by an inhomogeneous surface
Opt. Com., 116, 316-321

[**CARRE, 1998**] : CARRE M.C., GEOFFROY-CHAPOTOT C., ADIBNEJAD M., BERROY P., STOLTZ J.F.,
VIRIOT M.L. [1998]
Fluorescent molecular rotors with specific hydrophilic functions : glucosamine and inositol derivatives
J. Fluoresc., 8, 53-57

[**CAZEAU-DUBROCA, 1986**] : CAZEAU-DUBROCA C., LYAZIDI S.A., NOUCHI G., PEIRIGUA A.,
CAZEAU P [1986]
TICT fluorescence of p-substituted N,N-dialkylanilines solution origin : twisted hydrogen bonded complex in the ground state. Role of water trace impurities in solvents
Nouv. J. Chim., 10, 337-343

[**CHIPPENDALE, 1997**] : CHIPPENDALE K.E., IDDON B., SUSCHITZKY H., TAYLOR D.S. [1997]
Condensed thiophene ring systems. XV. Preparation and reactions of 2- and 3-(secondary amino) benzo[b]thiophenes
J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 10, 1168-1172

[**CLINE, 1995**] : CLINE J.A., ISAACSON M. [1995]
Probe-sample interactions in reflexion near-field scanning optical microscopy
Applied Optics, 34, 4869-4876

[**COURJON, 1989**] : COURJON D., SARAYEDDINE K., SPAJER M. [1989]
Scanning tunneling optical microscopy
Opt. Com., 71, 23-28

[**COOSEMANS, 1979**] : COOSEMANS L., DE SCHRYVER F.C., VAN DORMAEL A. [1979]
Influence of solvent properties on fluorescence probes. 7-amino and 7-N,N-dimethylamino-4-methylcoumarin
Chem. Phys. Letters, 65, 95-98

D

[DARDOIZE, 1989] : DARDOIZE F., GOASDOUE C., GOASDOUE N., LABORIT H.M., TOPALL G. [1989]
4-Hydroxybutyric acid (and analogues) derivatives of D-glucosamine
Tetrahedron, 45, 7783-7794

[DARNE, 1996] : DARNE R. [1996]
Etude photophysique des transferts parietaux
Thèse INPL, LSGC-TREP et DCPR-GRAPP, ENSIC, Nancy

[DENNY, 1990] : DENNY W.A., REWCASTLE G.W., BAGULEY B.C. [1990]
Potential antitumor agents. Structure-activity relationships for 2-phenylbenzimidazole-4-carboxamides, a act via topoisomerase II
J. Med. Chem., 33, 814-819

[DREXHAGE, 1973] : DREXHAGE K.H. [1973]
Structure and properties of laser dyes
Dans "Dye lasers"
Ed. F.P. Schäfer, Topics in applied physics, Berlin, 144

[DRUZHININ, 1995] : DRUZHININ S.I., BURSULAYA B.D., UZHINOV B.M. [1995]
Planar and twisted intramolecular charge transfer states of the excited proton transfer products of aminocoumarins
J. Photochem. Photobiol. A : Chemistry, 90, 53-56

[DUFOR, 1981] : DUFOR J.P., NUNNALLY R., BUHLE L., TSONG T.Y. [1981]
Comparative study of an adenosine triphosphatase trigger-fused lipid vesicle and other vesicle forms of dimyristoylphosphatidylcholine
Biochemistry, 20, 5576-5586

[DUNCAN, 1996] : DUNCAN W.M. [1996]
Near-field scanning optical microscope for microelectronic materials and devices
J. Vac. Sci. Technol., A14, 1914-1918

[DUNN, 1994] : DUNN R.C., HOLTOM G.R., METS L., SUNNEY XIE X. [1994]
Near-field fluorescence imaging and fluorescence lifetime measurements of light harvesting complexes in intact photosynthetic membranes
J. Phys. Chem., 98, 3094-3098

[DUNN, 1995] : DUNN R.C., ALLEN E.V., JOYCE S.A., ANDERSON G.A., SUNNEY XIE X. [1995]
Near-field fluorescent imaging of single proteins
Ultramicroscopy, 27, 113-117

[DURIG, 1986] : DURIG U., POHL D.W., ROHNER F. [1986]
Near-field optical scanning microscopy
J. Appl. Phys., 59, 3318-3327

[DURKAN, 1995] : DURKAN C., SHVETS I.V. [1995]
40 nm resolution in reflection-mode SNOM with $\lambda = 685$ nm
Ultramicroscopy, 61, 227-231

E

[ENDERLE, 1997] : ENDERLE Th., HA T., OGLETREE D.F., CHEMLA D.S., MAGOWAN C., WEISS S. [1997]
Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy
Cell Biology, 94, 520-525

[EPAND, 1996] : EPAND R.F., KRAAYENHOF R., STERK G.J., WONG FONG SANG H.W., EPAND R.M. [1996]
Fluorescent probes of membrane surface properties
Biochim. Biophys. Acta, 1284, 191-195

F

[FISHER, 1987] : FISHER U.Ch., DURIG U.T., POHL D.W. [1987]
Near-field scanning microscopy in reflection
Appl. Phys. Lett., 52, 249-251

[de FORNEL, 1989] : de FORNEL F., GOUDONNET J.P., SALOMON L., LESNIEWSKA E. [1989]
An evanescent field optical microscope
EC02 Opt. Storage Scanning Technol., 1139, 77-84

[de FORNEL, 1992] : de FORNEL F., SALOMON L., ADAM P., BOURILLOT E., GOUDONNET J.P., NEVIERE M. [1992]
Resolution of the photon scanning tunneling microscope : influence of physical parameters
Ultramicroscopy, 42-44, 422-429

[de FORNEL, 1998] : de FORNEL F. [1998]
Les ondes évanescentes en optique et en optoélectronique
Collection Technique et Scientifique des Télécommunications, Ed. Eyrolles, Paris

G

[GABIZON, 1998] : GABIZON A., GOREN D., COHEN R., BARENHOLZ Y. [1998]
Development of liposomal anthracyclines : from basics to clinical applications
J. Controlled Release, 53, 275-279

[GABRIJELCIC, 1990] : GABRIJELCIC V., SENTJURC M., KRISTL J. [1990]
Evaluation of liposomes as drug carriers into the skin by one-dimensional EPR imaging
Int. J. Pharm., 62, 75-79

[GARCIA-PARAJO, 1994] : GARCIA-PARAJO M., CAMBRIL E., CHEN Y. [1994]
Simultaneous scanning tunneling microscope and collection mode scanning near-field optical microscope using gold coated optical fiber probes
Appl. Phys. Lett., 65, 1498-1504

[GIRI, 1992] : GIRI R. [1992]
Temperature effect study upon the fluorescence emission of substituted coumarins
Spectrochimica Acta, 48A, 843-848

[GRABOWSKI, 1979] : GRABOWSKI Z.R., ROTKIEWICZ K., SIEMIARCZUK A., COWLEY D.J., BAUMANN W. [1979]
Twisted intramolecular charge transfer states (TICT). A new class of excited states with a full charge separation
Nouv. J. Chim., 3, 443-454

[GRABOWSKI, 1983] : GRABOWSKI Z.R., DOBKOWSKI J. [1983]
Twisted intramolecular charge transfer (TICT) excited states : energy and molecular structure
Pure Appl. Chem., 55, 245-252

[GRIFFITHS, 1995] : GRIFFITHS J., MILLAR V., BAHRA G.S. [1995]
The influence of chain length and electron acceptor residues in 3-substituted 7-N,N-diethylaminocoumarin dyes
Dyes and Pigments, 28, 327-339

[GRONDIN, 1994] : GRONDIN O. [1994]
Vers un fluorimmunocapteur à fibre optique
Thèse INPL, DCPR-GRAPP, ENSIC, Nancy

[GRUNBERGER, 1982] : GRUNBERGER D., HAIMOVITZ R., SHINTZKY M. [1982]

Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene

Biochim. Biophys. Acta, 688, 764-774

[GUTMANNBAUER, 1995] : GUTMANNBAUER W., HUSER T., LACOSTE T., HEINZELMANN H., GÜNTHERODT H.-J. [1995]

Scanning near-field optical microscopy and its application in mineralogy

Schweiz. Mineral. Petrogr. Mitt., 75, 259-264

H

[HANSMA, 1994] : HANSMA P.K., CLEVELAND J.P., RADMACHER M., WALTERS D.A., HILLNER P.E., BEZANILLA M., FRITZ M., VIE D., HANSMA H.G., PRATER C.B., MASSIE J., FUKUNAGA L., GURLEY J., ELINGS V. [1994]

Tapping mode atomic force microscopy in liquids

Appl. Phys. Lett., 64, 1738-1740

[HARNISCH, 1975] : HARNISCH H., [1975]

Monomethine dyes

Bayer A.-G., Ger. Offen., P24 13 371.9, 16 Oct. 1975

[HAROOTUNIAN, 1986] : HAROOTUNIAN A., BETZIG E., ISAACSON M., LEWIS A. [1986]

Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy

Appl. Phys. Lett., 49, 674-676

[HAYASHI, 1987] : HAYASHI R., TAZUKE S., FRANK C.W. [1987]

Pressure effects on the twisted intramolecular charge transfer (TICT) phenomenon

Chem. Phys. Letters, 135, 123-127

[HICKS, 1985] : HICKS J., VANDERSALL M., BABAROGIC Z., EISENTHAL K.B. [1985]

The dynamics of barrier crossing in solution : the effect of a solvent polarity-dependent barrier

Chem. Phys. Letters, 116, 18-24

[HIGGINS, 1995] : HIGGINS D.A., BARBARA P.F. [1995]

Excitonic transitions in J-aggregates probed by near-field scanning optical microscopy

J. Phys. Chem., 99, 3-7

[HIGGINS, 1996]^a : HIGGINS D.A., KERIMO J., VANDEN BOUT D.A., BARBARA P.F. [1996]

A molecular yarn : near-field optical studies of self-assembled, flexible, fluorescent fibers

J. Am. Chem. Soc., 118, 4049-4058

[HIGGINS, 1996]^b : HIGGINS D.A., REID P.J., BARBARA P.F. [1996]

Structure and exciton dynamics in J-aggregates studied by polarization-dependent near-field scanning optical microscopy

J. Phys. Chem., 100, 1174-1180

[HIROYUKI, 1993] : HIROYUKI S. [1993]

Tip-induced anodization of titanium surfaces by scanning tunneling microscopy : a humidity effect on nanolithography

Appl. Phys. Lett., 63, 1288-1294

[HOULT, 1996] : HOULT J.R.S., PAYA M. [1996]

Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins : natural product with therapeutic potential

Gen. Pharmac., 24, 713-722

[HUANG, 1982] : HUANG C., LAPIDES J., LEVIN I. [1982]

Phase-transition behavior of saturated, symmetric chain phospholipid bilayer dispersions determined by raman spectroscopy, correlation between spectral and thermodynamic parameters

J. Am. Chem. Soc., 104, 5926-5930

[HWANG, 1995] : HWANG J., TAMM L.K., BÖHM C., RAMALINGAM T.S., BETZIG E., EDIDIN M. [1995]

Nanoscale complexity of phospholipid monolayers investigated by near-field scanning optical microscopy

Science, 270, 610-614

J

- [JALOCHA, 1995] : JALOCHA A., VAN HULS N.F. [1995]
Polarization contrast in fluorescence scanning near-field optical reflection microscopy
 J. Opt. Soc. Am. B, 12, 1577-1580
- [JEN, 1993] : JEN A.K.Y., PUSHKARA RAO V., WONG K.Y., DROST K.J. [1993]
Functionalized thiophenes : second-order non linear optical materials
 J. Chem. Soc., Chem. Commun., 91-93
- [JEN, 1994] : JEN A.K.Y., RAO V.P., DROST K.J., WONG K.Y., CAVA M.P. [1994]
Optimization of thermal stability and second-order nonlinear optical properties of thiophene derived chromophores
 J. Chem. Soc., Chem. Commun., 2057-2058
- [JONES, 1967] : JONES G. [1967]
The Knœvenagel condensation
 Dans "Organic reactions", vol.15, J. WILEY & Sons, New York, 204-582
- [JONES II, 1980]^a : JONES II G., JACKSON W.R., HALPERN A.M. [1980]
Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes
 Chem. Phys. Lett., 72, 391-395
- [JONES II, 1980]^b : JONES II G., JACKSON W.R., KANOKTANAPORN S. [1980]
Solvent effects on photophysical parameters for coumarin laser dyes
 Opt. Com., 33, 315-320
- [JONES II, 1985] : JONES II G., JACKSON W.R., CHOI-YOO C., BERGMARK W.R. [1985]
Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for rotatory decay mechanism
 J. Phys. Chem., 89, 294-300
- [JUNGEN, 1996] : JUNGEN M. [1996]
Rotors moléculaires fluorescents dérivés du stilbène : synthèse et étude photophysique
 Thèse d'Exercice en Pharmacie, Université Henri Poincaré, DCPR-GRAPP, ENSIC, Nancy

K

- [KAHOLEK, 1997] : KAHOLEK M., HRDLOVIC P. [1997]
Spectral properties of coumarin derivatives substituted at position-3. Effect of polymer matrix
 J. Photochem. Photobiol., 108, 283-288
- [KASTEN, 1996] : KASTEN F.H. [1996]
 Dans "Cell structure and function by microspectrofluorimetry"
 Ed. Academic press, New York, Etats-Unis, 34
- [KHALIL, 1976] : KHALIL O.S., MEEKS J.L., McGLYNN S.P. [1976]
Electronic states and geometric isomerism of para-disubstituted cyanoanilines
 Chem. Phys. Letters, 39, 457-461
- [KOSOWER, 1958] : KOSOWER E.M., DODIUK H. [1958]
The effect of solvent on spectra. I. A new empirical measure of solvent polarity-Z values
 J. Am. Chem. Soc., 80, 3253-3260
- [KOSOWER, 1976] : KOSOWER E.M., DODIUK H. [1976]
Multiple fluorescences. II. A new scheme for 4-(N,N-dimethylamino)benzonitrile including proton transfer
 J. Am. Chem. Soc., 98, 924-929
- [KOSOWER, 1983] : KOSOWER E.M., HUPPERT D. [1983]
Solvent motion controls the rate of intramolecular electron transfer in solution
 Chem. Phys. Letters, 96, 433-435

[KOSOWER, 1985] : KOSOWER E.M. [1985]

Mechanism of fast intramolecular electron-transfer reactions

J. Am. Chem. Soc., 107, 1114-1118

[KRAUSCH, 1995] : KRAUSCH G., WEGSCHEIDER S., KIRSCH A., BIELEFELDT H., MEINERS J.C., MLYNEK J. [1995]

Near-field microscopy and lithography with uncoated fiber tips : a comparison

Opt. Com., 119, 283-288

[KUHRY, 1983] : KUHRY J.G., FONTENEAU P., DUPORTAIL G., MAECHLING C., LAUSTRIAT G. [1983]
TMA-DPH : a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells

Cell. Biophys., 5, 129-140

[KUZNETSOV, 1996] : KUZNETSOV Y.G., MALKIN A.J., GLANTZ W., McPHERSON A. [1996]

In situ atomic force microscopy studies of protein and virus crystal growth mechanisms

J. Cryst. Growth, 168, 63-73

L

[LAPOUYADE, 1992] : LAPOUYADE R., CZESCHKA K., MAJENZ W., RETTIG W., GILABERT E., RULLIERE C. [1992]

Photophysics of donor-acceptor substituted stilbenes. A time-resolved fluorescence study using selectively bridged dimethylamino cyano model compounds

J. Phys. Chem., 96, 9643-9650

[LASIC, 1989] : LASIC D.D. [1989]

Les liposomes

La Recherche, 20, 904-913

[LASIC, 1998] : LASIC D.D. [1998]

Novel applications of liposomes

Trends Biotechnol, 16, 307-321

[LEBRETON, 1994] : LEBRETON C., WANG Z.Z. [1994]

Nanowriting on an atomically flat gold surface with scanning tunneling microscope

Scanning Micros., 8, 441-448

[LETARD, 1993] : LETARD J.F., LAPOUYADE R., RETTIG W. [1993]

Structure-photophysics correlations in a series of 4-(dialkylamino)stilbenes : intramolecular charge transfer in the excited state as related to the twist around the single bonds

J. Am. Chem. Soc., 115, 2441-2447

[LETARD, 1994] : LETARD J.F., LAPOUYADE R., RETTIG W. [1994]

Multidimensional photochemistry in 4-(N,N-dimethylamino) stilbene

Chem. Phys., 186, 119-131

[LETERRIER, 1989] : LETERRIER F., GARY-BOBO C. [1989]

Dans "*Biologie membranaire : structure et dynamique des membranes biologiques*"

Hermann, Paris

[LIEBERMAN, 1993] : LIEBERMAN K., LEWIS A.

Simultaneous scanning tunneling and optical near-field imaging with a micropipette

Appl. Phys. Lett., 62, 1335-1341

[LIPPERT, 1962] : LIPPERT E., LÜDER W., BOOS H. [1962]

Dans "*Advances in molecular spectroscopy*",

Pergamon Press, Oxford, 443

- [LIPPERT, 1987] : LIPPERT E., RETTIG W., BONACIC-KOUTECKY V., HEISEL F., MIEHE J.A. [1987]
Photophysics of internal twisting
Dans "Advances in Chemical Physics",
I. Prigogine, S.A. Rice, Ed., John Wiley & Sons, Inc., 68, 1-173
- [LIU, 1997] : LIU S.X.L., KAPINGU M.C., WANG M-S., CHIOU G.C.Y. [1997]
Facilitation of retinal function recovery by coumarin derivatives
J. Ocular Pharmacol. Ther., 13, 69-79
- [LOPEZ-ARBELOA, 1993] : LOPEZ ARBELOA T., LOPEZ-ARBELOA F., TAPIA M.J.,
LOPEZ ARBELOA I. [1993]
Hydrogen bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives
J. Phys. Chem., 97, 4704-4707
- [LOUTFY, 1982] : LOUTFY R.O., ARNOLD B.A. [1982]
Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors
J. Phys. Chem., 86, 4205-4211
- [LOUTFY, 1986] : LOUTFY R.O. [1986]
Fluorescence probes for polymer free-volume
Dans "Photophysical and Photochemical Tools in Polymer Science", M.A. Winnik, Ed., D. Reidel Publishing
Company, Dordrecht, Hollande, 429-448
- [LUKAC, 1984] : LUKAC S. [1984]
Thermally induced variations in polarity and microviscosity of phospholipid and surfactant vesicles monitored with a probe forming an intramolecular charge-transfer complex
J. Am. Chem. Soc., 106, 4386-4392
- ## M
- [MACHY, 1987] : MACHY P., LESERMAN L. [1987]
Dans "Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie"
Ed. INSERM, John Libbey Eurotex, 1-25
- [MARTIN, 1987] : MARTIN Y., WILLIAMS C.C., WICKRAMASINGHE H.K. [1987]
Atomic force microscope-force mapping and profiling on sub 100 Å scale
J. Appl. Phys., 61, 4723-4727
- [MASSEY, 1984] : MASSEY G.A. [1984]
Microscopy and pattern generation with scanned evanescent waves
Appl. Opt., 23, 658-660
- [MATAGA, 1956] : MATAGA N., KAIFU Y., KOIZUMI M. [1956]
The base strength of some nitrogen heterocycles in the excited state
Bull. Chem. Soc. Jp, 29, 373-379
- [MAURER, 1998] : MAURER N., WONG K.F., HOPE M.J., CULLIS P.R. [1998]
Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes : a 1H-NMR study
Biochim. Biophys. Acta, 1374, 9-20
- [MICOLLI, 1993] : MICOLLI L., SZCZEPANIAK C., DUMAS D., SAVONNIERE S., MULLER S.,
CARRE M.C., DONNER M. [1993]
Interaction of a phosphatidylcholine derivative of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with intact living cells : steady-state fluorescence polarization and phase fluorometry studies
J. Fluoresc., 3, 251-255
- [MOERS, 1996] : MOERS M.H.P., KALLE W.H.J., RUITER A.G.T., WIEGANT J.C.A.G., RAAP A.K.,
GREVE J., DE GROOTH B.G., VAN HULST N.F. [1996]
Fluorescence in situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field scanning optical microscopy
J. Microscopy, 182, 40-45
-

[**MOISON, 1987**] : MOISON H., TEXIER-BOULLET F., FOUCAUD A. [1987]
Knävenagel, Wittig and Wittig-Horner reactions in the presence of magnesium oxide or zinc oxide
Tetrahedron, 43, 537-542

[**MORGAN, 1982**] : MORGAN C.G., THOMAS E.W., MORAS T.S., YIANNI Y.P. [1982]
The use of a phospholipid analogue of diphenyl-1,3,5-hexatriene to study melittin-induced fusion of small unilamellar phospholipid vesicles
Biochim. Biophys. Acta, 692, 196-201

[**MOSSIERE, 1992**] : MOSSIERE M.L. [1992]
Rotors moléculaires fluorescents
DEA "Génie des Procédés", DCPR (GRAPP)-ENSIC-INPL, Nancy

[**MOYER, 1995**] : MOYER P.J., WALZER K., HIETSCHOLD M. [1995]
Modification of the optical properties of liquid crystals using near-field scanning optical microscopy
Appl. Phys. Lett., 67, 2129-2131

[**MOYER, 1996**] : MOYER P., KÄMMER S. [1996]
High-resolution imaging using near-field scanning optical microscopy and shear force feedback in water
Appl. Phys. Lett., 68, 3380-3382

[**MURAMATSU, 1996**] : MURAMATSU H., CHIBA N., HOMMA K., NAKAJIMA K., ATAKA T., OHTA S., KUSUMI A., FUJIHIRA M. [1996]
Scanning near-field optical/atomic force microscopy in liquids
Thin Solid Films, 273, 335-338

N

[**NOLLERT, 1989**] : NOLLERT M.U., HALL E.R., ESKIN S.G., McINTIRE L.V. [1989]
The effect of shear stress on the uptake and metabolism of arachidonic acid by human endothelial cells
Biochim. Biophys. Acta, 1005, 72-78

O

[**ONSAGER, 1936**] : ONSAGER L. [1936]
Electric moments of molecules in liquids
J. Am. Chem. Soc., 58, 1486-1493

P

[**PADMANABHAN, 1996**] : PADMANABHAN S., PERI R., TRIGGLE D.J. [1996]
Formation of chromenes and coumarine derivatives from salicylaldehydes and 2-pentenedioate : facile route to 3-formylcoumarins
Synth. Com., 26, 827-831

[**PAESLER, 1996**] : PAESLER M.A., MOYER P.J. [1996]
Dans "*Near-field optics : theory, instrumentation, and applications*"
Ed., John Wiley & Sons Inc., New-York, USA, Color Plate 2, 221

[**POHL, 1984**] : POHL D.W., DENK W., LANZ M. [1984]
Optical stethoscopy : image recording $\lambda/20$
Appl. Phys. Lett., 44, 651-656

[**PUISIEUX, 1985**] : PUISIEUX F. [1985]
Les liposomes et leur emploi en thérapeutique. Bilan des recherches réalisées
Dans "*Liposomes, applications thérapeutiques*".
Lavoisier, Paris, 205-253

R

- [REDDICK, 1989] : REDDICK R.C., WARMACK R.J., FERRELL T.L. [1989]
New form of scanning optical microscopy
 Phys. Rev. B, 39, 767-770
- [REICHARDT, 1979] : REICHARDT C. [1979]
Empirical parameters of solvent polarity as linear free-energy relationships
 Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 18, 98-110
- [RETTIG, 1985] : RETTIG W., WERMUTH G. [1985]
The kinetics of formation of twisted intramolecular charge transfer (TICT) states in p-substituted dialkylanilines : consequences of conical intersections along the reaction coordinate
 J. Photochem., 28, 351-366
- [RETTIG, 1986] : RETTIG W. [1986]
Charge separation in excited states of decoupled systems-TICT compounds and implications regarding the development of new laser dyes and the primary processes of vision and photosynthesis
 Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 25, 971-988
- [RETTIG, 1989] : RETTIG W., MAJENZ W. [1989]
Competing adiabatic photoreaction channels in stilbene derivatives
 Chem. Phys. Letters, 154, 335-341
- [RETTIG, 1994] : RETTIG W. [1994]
Photoinduced charge separation via twisted intramolecular charge transfer states
 Dans "Topics in current chemistry"
 Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 169, 253-299
- [REYNOLDS, 1975] : REYNOLDS G.A., DREXHAGE K.H. [1975]
New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers
 Opt. Commun., 13, 222-225
- [RATANASAVANH, 1996] : RATANASAVANH D., LAMIABLE D., BIOUR M., GUEDES Y., GERSBERG M., LEUTENEGGER E., RICHE C. [1996]
Metabolism and toxicity of coumarin on cultured human, rat, mouse and rabbit hepatocytes
 Fundam. Clin. Pharmacol., 10, 504-510
- [ROTHMUND, 1997] : ROTHMUND B., RETTIG W. [1997]
Emissive solute-solvent exciplexes in derivatives of DMABN
 XVIIIth International Conference on Photochemistry, 3-8 août, Varsovie, Pologne
- [ROTKIEWICZ, 1980] : ROTKIEWICZ K., RUBASZEWSKA W. [1980]
Intramolecular electron transfer excited state in 6-cyanobenzoquinuclidine
 Chem. Phys. Letters, 70, 444-448
- [RÜCKER, 1997] : RÜCKER M., DE SCHRYVER F.C., VANOPPEN P., JEURIS K., DE FEYTER S., HOTTA J., MASUHARA H. [1997]
Near-field scanning optical microscopy and polymers
 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B 131, 30-37

S

- [SEAVER, 1995] : SEAVER M., DUNCAN M.D., FROST A.E. [1995]
Near-field optical microscopy at the liquid/air interface
 Ultramicroscopy, 57, 219-222
- [SCHIMITSCHEK, 1974] : SCHIMITSCHEK E.J., TRIAS J.A., HAMMOND P.R., ATKINS R.L. [1974]
Laser performance and stability of fluorinated coumarin dyes
 Opt. Comm., 11, 352-355

[SCHUDEBOOM, 1992] : SCHUDEBOOM W., JONKER S.A., WARMAN J.M., LEINHOS U., KUEHNLE W., ZACHARIASSE K.A. [1992]

Excited-state dipole moments of dual fluorescent 4-(dialkylamino)benzonitriles : influence of alkyl chain length and effective solvent polarity

J. Phys. Chem., 96, 10809-10819

[SHECHTER, 1990] : SHECHTER E. [1990]

Dans "Biochimie et Biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels"

Masson, Paris, 11-139

[SHEW, 1985] : SHEW R.L., DEAMER D.W. [1985]

A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes

Biochim. Biophys. Acta, 816, 1-18

[SOROKIN, 1969] : SOROKIN P.P. [1969]

Organic lasers

Sci. Amer., 220, 30-40

[SPAJER, 1989] : SPAJER M., COURJON D., SARAYEDINE K., JALOCHA A., VIGOUREUX J.M. [1989]

Microscopie optique en champ proche par réflexion

J. Phys. III, 1, 1-12

[SPAJER, 1992] : SPAJER M., JALOCHA A. [1992]

The reflection near-field optical microscopy : an alternative to STOM

Near Field Optics, Ed. D.W. Pohl and D. Courjon, NATO ASI Series, 232, 87-96

[SRINIVASAN, 1969] : SRINIVASAN R. [1969]

IEEE J. Quant. Electron., 5, 552

[SYNGE, 1928] : SYNGE E.H. [1928]

Suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region

Phil. Mag., 6, 356-363

T

[TANEJA, 1995] : TANEJA L., SHARMA A.K., SINGH R.D. [1995]

Study of photophysical properties of coumarins : substituent and concentration dependence

J. of Luminesc., 63, 203-214

[TAZUKE, 1989] : TAZUKE S., GUO R.K., HAYASHI R. [1989]

Influence of polymer side chains on the adjacent microenvironment. A fluorescence probe study by means of twisted intramolecular charge-transfer phenomena

Macromolecules, 22, 729-734

[TAZUKE, 1990]^a : TAZUKE S., GUO R.K., IKEDA T. [1990]

Time-resolved fluorescence spectroscopy of a twisted intramolecular charge transfer compound bonded to polymers

J. Phys. Chem., 94, 1408-1413

[TAZUKE, 1990]^b : TAZUKE S., GUO R.K., IKEDA T. [1990]

High terminal segment mobility in poly(methyl methacrylate) as studied by fluorescence probe method

Macromolecules, 23, 1208-1211

[THAUVIN, 1991] : THAUVIN F. [1991]

Les rotors moléculaires fluorescents pour l'étude des polymères

DEA "Génie des Procédés", DCPR-GRAPP, ENSIC-INPL, Nancy

[TOLEDO-CROW, 1992] : TOLEDO-CROW R., YANG P.C., CHEN Y., VAEZ-IRAVANI M. [1992]

Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation

Appl. Phys. Lett., 60, 2957-2959

[TRAUTMAN, 1992] : TRAUTMAN J.K, BETZIG E., WEINER J.S., DIGIOVANNI D.J., HARRIS T.D., HELLMAN F. [1992]
Image contrast in near field optics
J. Appl. Phys., 71, 4659-4663

V

[VALEUR, 1993] : VALEUR B. [1993]
Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters
Dans "Molecular Luminescence Spectroscopy"
Part 3, Vol. 77, Ed. Stephen G. Schulman

[VAN GOMPEL, 1987] : VAN GOMPEL J., SCHUSTER G.B. [1987]
Chemiluminescence of organic peroxides : intramolecular electron-exchange luminescence from a secondary perester
J. Org. Chem., 52, 1465-1468

[VAN HULST, 1992] : VAN HULST N., SEGERINK F.B., ACHTEN F., BÖLGER B. [1992]
Evanescent-field optical microscopy : effect of polarisation, tip shape and radiative waves
Ultramicroscopy, 42-44, 416-421

[VAN LABEKE, 1997] : VAN LABEKE D. [1997]
La microscopie optique à sonde locale
Dans "Optique Instrumentale, Collection de la Société Française d'Optique"
Les éditions de physique, Les Ulis, Tome 5, 151-177

[VIRIOT, 1989] : VIRIOT M.L., ANDRE J.C. [1989]
Fluorescent dyes : a search for new tracers for hydrology
Analisis, 17, 97-111

[VISSER, 1985] : VISSER R.J., WEISENBORN P.C.M., VARMA C.A.G.O. [1985]
Solute-solvent exciplexes as the source of anomalous fluorescence from 4-N,N-dimethylamino-ethylbenzoate in 1,4 dioxane and in polar solvents
Chem. Phys. Let., 113, 330-336

W

[WEISENBORN, 1989] : WEISENBORN P.C.M., HUIZER A.H., VARMA C.A.G.O. [1989]
Excited-state dynamics of ethyl 4-(N,N-dimethylamino)benzoate and ethyl 4-(N,N-diethylamino)benzoate in apolar and polar solvents
J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 85, 1895-1912

[WERMUTH, 1981] : WERMUTH G., RETTIG W., LIPPERT E. [1981]
The dual fluorescence of p-substituted dialkylanilines : the twist mechanism occurs even in inert solvents
Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 85, 64-70

[WERMUTH, 1983] : WERMUTH G. [1983]
Einfluß der reaktionsenthalpie auf die bildung von "twisted intramolecular charge transfer" (TICT). Anregungszustände in unpolaren lösungsmitteln : p-substituierte N,N-dimethylaniline
Z. Naturforsch., Teil A, 38 a, 641-647

X

[XUEREB, 1991] : XUEREB C. [1991]
Les rotors moléculaires pour l'étude des polymères
Rapport de stage Ingénieur HEI-Lille, DCPR-GRAPP, ENSIC-INPL, Nancy

Y

[YARBOROUGH, 1974] : YARBOROUGH J.M. [1974]

A continuous wave dye laser emission spanning the visible spectrum

Appl. Phys., 24, 629-630

[YASUDA, 1984] : YASUDA M., BABA K., KOSAWA M. [1984]

Biological actions of the natural coumarins. I. Changes of lipids and glucose levels in rat plasma after intraperitoneal administration of various linear-type furanocoumarins

Chem. Pharm. Bull., 32, 4650-4652

[YIP, 1990] : YIP R.W., WEN Y-X. [1990]

Photophysics of 7-(diethylamino)-4-methylcoumarin : picosecond time-resolved absorption and amplified emission study

J. Photochem. Photobiol., A : Chem, 54, 263-270

Z

[ZACHARIASSE, 1994] : ZACHARIASSE K.A., VON DER HAAR Th., LEINHOS U., KÜHNLE W. [1994]

Solvent-induced pseudo-jahn-teller coupling in dual fluorescence. Evidence against the TICT hypothesis

J. Inf. Rec. Mats., 21, 501-506

[ZEISIG, 1998] : ZEISIG R., ARNDT D., STAHN R., FICHTNER I. [1998]

Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid

Biochim. Biophys. Acta, 1414, 238-248

[ZHONG, 1993] : ZHONG Q., INNIS D., KJOLLER K., ELINGS V.B. [1993]

Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy

Surf. Sci. Lett., 290 (1-2), 688-692

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DESCHRYVER Frans, Professeur, KU Leuven - Heverlee (Belgique),
Monsieur LETOURNEUR Didier, Chargé de Recherches CNRS, Université de Paris 13.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame CHAPOTOT - GEOFFROY Christelle

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une
thèse intitulée :

**"Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt
biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proche."**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"GÉNIE DES PROCÉDÉS"**

Fait à Vandoeuvre le, **29 Septembre 1998**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

RESUME

ELABORATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR DES APPLICATIONS D'INTERET BIOLOGIQUE, ET IMAGERIE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE EN CHAMP PROCHE

Avec l'objectif de développer de nouveaux rotors moléculaires fluorescents, ayant un domaine d'absorption proche de 490 nm, nous avons synthétisé six dérivés de la 7-N,N-diéthylaminocoumarine substitués en position-3 par diverses fonctions (acides, esters et amides). L'intérêt de ces nouveaux traceurs est de répondre à au moins deux critères :

- permettre des études dans des milieux biologiques en utilisant une lumière excitatrice au-delà des domaines d'absorption des composants cellulaires et,
- développer des observations en microscopie optique en champ proche (source laser à 488 nm).

L'étude photophysique des nouveaux fluorophores (fluorescence stationnaire et dynamique) met en évidence une modification des caractéristiques d'émission de fluorescence en fonction des paramètres d'environnement : (i) l'augmentation de la polarité entraîne un déplacement bathochrome et (ii) l'augmentation de la viscosité conduit à un rendement quantique de fluorescence plus élevé.

Nous décrivons ensuite les trois applications principales qui ont été développées :

- l'incorporation de ces traceurs dans des liposomes de DPPC (modèles de systèmes biologiques), permet de détecter la température de transition de phase des phospholipides ;
- à partir de cellules vivantes intactes (cellules endothéliales), nous avons montré grâce à une technique récente de microscopie 3D (CELLScanTM) que l'un des traceurs fluorescents se révèle être un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique (même comportement que le dérivé cyanine DiOC₆) ;
- pour la première fois dans notre laboratoire, l'observation par microscopie optique en champ proche (SNOM) d'échantillons biologiques a permis de mettre en avant les potentialités de cette technique pour la réalisation d'images topographiques et optiques avec une résolution latérale pouvant atteindre 50 nm. De plus, nous avons obtenu les premières images en émission de fluorescence pour des cellules biologiques marquées avec un dérivé coumarine.

MOTS-CLES : Rotors moléculaires fluorescents - 7-(N,N-diéthylamino)coumarines - photophysique liposomes - cellules endothéliales - microscopie optique en champ proche.

ABSTRACT

ELABORATION OF FLUORESCENT PROBES FOR APPLICATIONS WITH BIOLOGICAL INTEREST, AND SCANNING NEAR-FIELD OPTICAL MICROSCOPY MAPPING

With the aim to develop new fluorescent molecular rotors, having absorption wavelength around 490 nm, we have synthesized six derivatives of the 7-N,N-diethylaminocoumarin substituted in the third position with acid, ester and amide functions. The interest of these new tracers is to answer at least to two criterions :

- to allow studies in biological media using exciting light beyond the absorption domain of cellular components and,
- to develop observations with scanning near-field optical microscopy (laser radiation at 488 nm).

The photophysical study of the new probes (stationary and dynamic fluorescence) indicates a modification of the features of fluorescence emission as a function of the environment parameters : (i) the polarity increase involves a bathochromic shift and (ii) the increase of viscosity leads to a higher fluorescence quantum yield.

Then, we describe the three main applications which have been developed :

- the incorporation of these probes in DPPC vesicles (models for biological systems) allows to detect the main transition temperature of phospholipids ;
- from living cells (endothelial cells), we have shown thanks to a new 3D microscopy (CELLScanTM) that one of the probes proves to be a specific endoplasmic reticulum tracer (same behaviour than the cyanine derivative DiOC₆) ;
- for the first time in our laboratory, the observation of biological samples with scanning near-field optical microscopy (SNOM) allows to put forward the potentialities of this technology for carrying out topographic and optical images, with a 50 nm lateral resolution. Moreover we have obtained the first fluorescence images of biological cells labelled with a coumarin derivative.

KEY-WORDS : fluorescent molecular rotors - 7-(N,N-diethylamino)coumarin - photophysics - liposomes - endothelial cells - scanning near-field optical microscopy.