



HAL
open science

Optimisation de dérivés triphénylaminés pour le marquage d'ADN: de l'étude des propriétés de fluorescence à deux photons à l'analyse structurale de brins d'ADN

Germain Metgé

► **To cite this version:**

Germain Metgé. Optimisation de dérivés triphénylaminés pour le marquage d'ADN: de l'étude des propriétés de fluorescence à deux photons à l'analyse structurale de brins d'ADN. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : . tel-00592404

HAL Id: tel-00592404

<https://theses.hal.science/tel-00592404>

Submitted on 12 May 2011

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.



**UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11**



Faculté des
sciences
d'Orsay

N° d'ordre: 1234

THÈSE

Présentée pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI

Spécialité: Biophotonique

par

Germain METGÉ

Optimisation de dérivés triphénylaminés pour le marquage d'ADN: de l'étude des propriétés de fluorescence à deux photons à l'analyse structurale de brins d'ADN

Soutenue le 06 décembre 2010 devant la Commission d'examen:

Dr.	Patrice BALDECK	(Rapporteur)
Dr.	Céline FIORINI-DEBUSSCHERT	(Examinateur)
Dr.	Thomas GUSTAVSSON	(Examinateur)
Dr.	Eric LE CAM	(Examinateur)
Dr.	Robert PANSU	(Président du jury)
Dr.	Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	(Rapporteur)
Dr.	Marie-Paule TEULADE-FICHO	(Directeur de thèse)



Thèse préparée au
CEA
DSM/IRAMIS/SPCSI/LEPO, Bat. 466
91 191 Gif-sur-Yvette Cedex
Financement C'Nano IdF

Résumé

Les performances de la microscopie biphotonique sont fortement corrélées au développement de marqueurs fluorescents spécifiques. Dans le cadre d'un précédent travail, les dérivés Triphénylaminés (TP) substitués par des groupements cationiques vinyl-pyridinium, se sont révélés être des candidats particulièrement intéressants : bonne solubilité dans l'eau, taille réduite, photostabilité élevée, forte brillance moléculaire ($\sigma_{2p}\phi_f$), exaltation de fluorescence en présence d'ADN, émission dans le rouge ($\lambda_{em}=660-680\text{nm}$)... L'objectif du travail présenté a consisté à la fois à mieux comprendre l'origine de ces propriétés assez rarement réunies et à explorer les voies d'optimisation potentielles. Dans ce but, nous avons mis en place un banc de microscopie de fluorescence à deux photons résolue en temps. Différents dérivés ont été étudiés de façon à établir des corrélations entre leurs structures et leurs propriétés. De même, différents environnements ont été considérés (tampon, ADN naturel et de synthèse). Nous avons pu mettre en évidence que les dérivés TP interagissent spécifiquement avec l'ADN, vraisemblablement via une insertion dans le petit sillon du double brin d'ADN. Cette insertion entraîne une très forte restriction des mouvements intramoléculaires ainsi qu'un changement d'environnement du fluorophore (passage d'un environnement aqueux propice à des effets dits de « quenching » à un environnement organique) : il en résulte, à la fois, une réduction du taux de relaxation non radiative et une augmentation du taux de relaxation radiative. Afin de pouvoir caractériser ces interactions fluorophore-ADN à l'échelle nanométrique, des études complémentaires de microscopie à effet tunnel (STM) sous UHV ont également été entreprises sur ces dérivés. Nous avons par ailleurs essayé de tirer parti des interactions spécifiques TP-ADN pour immobiliser l'ADN sur des substrats d'or atomiquement plans.

Mots-clés : Fluorescence par absorption de deux photons, marquage de l'ADN, marqueur de petit sillon, durée de vie de fluorescence, interactions spécifiques fluorophores/ADN, STM.

OPTIMIZATION OF TRIPHENYLAMINE DERIVATIVES FOR DNA LABELING: FROM THE STUDY OF THEIR TWO-PHOTON FLUORESCENCE PROPERTIES TO THE STRUCTURAL ANALYSIS OF DNA

Abstract

Due to the rather poor properties of two-photon induced fluorescence (TPIF) emission of most endogenous biological substances, the performances of two-photon induced microscopy are strongly correlated to the development of specific fluorescent labels. In the frame of a previous work, vinyl-pyridinium substituted triphenylamines dyes (TP) have been shown to exhibit particularly interesting properties: good water solubility, small size, high photostability, high molecular brightness ($\sigma_{2p}\phi_f$), fluorescence intensity enhancement in the presence of DNA, red emission ($\lambda_{em}=660-680\text{nm}$)... Altogether such properties happen to be rarely met: the aim of the work presented here was to get a better understanding of the origin of such performances together with investigating potential optimization routes. Towards this objective, we have developed a specific time resolved two-photon fluorescent microscopy set-up. Various derivatives have been studied in order to establish structure-properties relationships. Similarly, different environments have been considered (buffer solution, natural and synthetic DNA). We could demonstrate that TP derivatives specifically interact with DNA, presumably via insertion into the minor groove of double stranded DNA. This insertion causes a very strong restriction of intramolecular motions together with a change in the fluorophore environment (experiencing a change from an aqueous environment leading to quenching, to an organic environment): there results both a reduction of the non-radiative relaxation rate and an increase of the radiative relaxation rate. In order to get complementary nanoscale characterization of TP dyes-DNA interactions, we have performed further scanning tunnelling microscopy studies at the UHV-solid interface. We have moreover tried to take advantage of the specific TP-DNA interactions to immobilize DNA onto atomically flat gold substrates.

Keywords : Optimization of triphenylamine derivatives for DNA labeling: from the study of their two-photon fluorescence properties to the structural analysis of DNA .

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les Drs. Patrice Baldek et Marie-Claire Schanne-Klein d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et les Drs. Eric Le Cam et Robert Pansu d'avoir accepté de juger ce travail. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'un travail d'équipe et je souhaite remercier tout particulièrement les personnes qui y ont contribué directement. Tout d'abord Marie-Paule Teulade Fichou, qui a dirigé cette thèse. Ensuite, Céline Fiorini-Debuisschert qui m'a dirigé au jour le jour, et qui m'a laissé une grande liberté pour mener à bien ces travaux. L'échange entre des physiciens et des chimistes m'a permis de comprendre les difficultés inhérentes à chaque spécialité. Ces trois années ont constitué une excellente formation par la recherche. Je remercie vivement Guillaume Bordeau qui m'a aidé à découvrir le sujet, et qui a réalisé la synthèse de la majeure partie des composés étudiés, et j'encourage son successeur Blaise Dumat pour la suite de cette recherche. Je tiens aussi à remercier Elodie Faurel pour la synthèse des composés thiolés pour l'étude par STM. Je remercie plus particulièrement Fabrice Charra de m'avoir accueilli au sein du groupe Nanophotonique du SPCSI au CEA Saclay, où j'ai appris, toujours dans la bonne humeur, la rigueur scientifique. La confiance qu'ils m'ont accordée m'a permis, je pense, d'arriver à ces résultats intéressants et prometteurs. Je tiens aussi à remercier "les petites mains", celles sans qui rien ne serait possible. Ainsi, tout mon respect et mon amitié vont vers Sylvain Foucquart, Brigitte Maouanda, Frédéric Merlet et Christophe Lubin, lesquels avaient beaucoup de travail par ma faute et ainsi vers la fin de la thèse ils fuyaient à chacune de mes apparitions. Je tiens aussi à fortement remercier les non permanents qui ont passé des périodes plus ou moins longues au laboratoire. Mes remerciements les plus chaleureux et amicaux vont vers Guillaume Laurent, Amandine Bocheux, lesquels ont toujours su me faire évoluer vers une plus grande conscience scientifique et humaine. A un degré moindre, je remercie Parwana Habibi, Sylvain Latil, Chawki Awada et Amandine Bellec pour nos discussions scientifiques autour d'un café ou d'une tasse de thé. Je remercie aussi Ludovic Douillard, qui a entrepris lors de ma thèse la rénovation de sa nouvelle maison, pour nos discussions sur les méthodes et les matériaux les plus intéressants pour la réalisation de cette tâche. Pour finir je remercie ma famille pour leur soutien tout au long de ces trois années. Mes pensées vont vers mon père qui aurait été fier de moi pour l'accomplissement de ce travail aussi bien personnel que collectif.

Table des matières

Introduction générale	13
I La fluorescence : Rappels des principales caractéristiques	18
1 Principe de la fluorescence	19
2 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence	21
3 Propriétés des fluorophores	21
3.1 Le coefficient d'extinction molaire	22
3.2 Le rendement quantique de fluorescence	22
3.3 La durée de vie de fluorescence	23
4 La fluorescence par absorption de deux photons	25
4.1 Principe de l'absorption biphotonique	25
4.2 La section efficace d'absorption à deux photons	27
5 Les facteurs limitant la fluorescence	30
5.1 Photoblanchiment ("photobleaching")	30
5.2 Inhibition de la fluorescence	31
II La microscopie de fluorescence	34
1 La microscopie en épifluorescence	36
1.1 Principe	36
1.2 Résolution	37
2 La microscopie confocale	38
2.1 Principe	38
2.2 Résolution	38
2.3 Limites	39
3 La microscopie biphotonique	40
3.1 Principe	40
3.2 Résolution	40

3.3	Avantages et inconvénients	41
4	Montage du banc de microscopie de fluorescence à deux photons résolue en temps.	43
4.1	Composition du système	43
4.2	L'excitation	44
4.3	Le statif de microscope Olympus IX-71	46
4.4	L'émission	49
4.5	Principe et Réalisation	52
4.6	Logiciel d'acquisition	55
4.7	Réponse instrumentale	56
4.8	Validation expérimentale du banc de mesure	57
5	Anisotropie de fluorescence	62
5.1	Origine de l'anisotropie de fluorescence : la photoselection	62
5.2	Dépolarisation de la fluorescence	65
5.3	Mesure de l'anisotropie de fluorescence	66
III	Ingénierie moléculaire	70
1	Fluorophores pour l'absorption à deux photons	71
1.1	Structure quadrupolaire	71
1.2	Structure octupolaire de symétrie C_3	73
1.3	Autres systèmes	74
1.4	Le marqueur idéal à deux photons ?	75
2	État de l'art des fluorophores développés pour la fluorescence à deux photons en milieu biologique	76
3	Études engagées au laboratoire	76
3.1	Études préliminaires en solvant organique	77
3.2	Étude de composés ioniques correspondants	79
4	Voies d'interactions fluorophore/ADN pour le marquage non-covalent	82
4.1	Généralités	82
4.2	Voies potentielles d'optimisation des marqueurs	84

5 Conclusion	86
IV Étude de l'interaction fluorophore/ADN	88
1 Les dérivés TPs dans l'ADN naturel (ADN de hareng)	89
1.1 A saturation	90
1.2 A différents équivalents d'ADN	92
1.3 Conclusion	93
2 Les TP-Pys dans un ADN synthétique (DrewAT)	94
2.1 A saturation	95
2.2 Évolution de la durée de vie des fluorophores à deux branches dans le DrewAT	96
2.3 Conclusion	97
3 Variation de la section efficace d'absorption à deux photons	98
3.1 Exaltation dans le DrewAT	98
3.2 Conclusion	100
V Le microscope à effet Tunnel (STM)	102
1 Principe de fonctionnement	103
1.1 L'effet Tunnel	103
1.2 STM mis en œuvre au laboratoire	105
2 Le Substrat	108
2.1 La face (111) de l'or	109
2.2 Préparation du substrat	109
2.3 Maîtrise des paramètres de dépôts	110
3 Conclusion	113
VI Visualisation de l'ADN	114
1 La vanne pulsée	115
1.1 Principe de fonctionnement	115
1.2 Paramètres de dépôt	116

2	Dépôt sur Au	117
2.1	ADN	117
2.2	ADN marqué par TP-2Py	120
3	Déplacement et accrochage de l'ADN par la pointe	121
3.1	Déplacement de l'ADN par la pointe	121
3.2	Accrochage de l'ADN par la pointe	122
4	Ancrage d'ADN par interaction avec des dérivés thiolés	123
4.1	Mesures optiques	123
4.2	Mesures STM	125
5	Dépôt d'ADN par polarisation de la surface	126
6	Molécules chimisorbées sur Au(111)	128
6.1	Principe	128
6.2	Préparation	129
6.3	Structure	129
7	Monocouche de Bisphenylamines pyridinium thiolanes et thiols	130
7.1	Bisphenylamines pyridinium thiolanes	130
7.2	Bisphenylamines pyridinium thiol	133
8	Hypochlorure de de 11-amino-1-undecanethiol	134
8.1	Organisation sur Au	135
8.2	Interaction ADN/hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol	136
9	Conclusion	137
	Conclusion générale	138
VII	Annexe	142
A	Caractérisation de l'instrumentation	143
A.1	Montage électrique de la photodiode rapide	143
A.2	Les dicrisminateurs : Principe de fonctionnement	143
A.3	Traitement des données	145

A.4	Traitement des données pour le calcul des sections efficaces d'absorption à deux photons	147
A.5	Section efficace d'absorption à deux photons des composés étudiés	149
B	Propriétés des fluorophores	151
B.1	Spectres d'absorption et d'émission des composés étudiés	151
B.2	Mesures de durées de vie de fluorescence	153
B.3	Influence de la concentration en sel	160
B.4	Anisotropie de fluorescence	162
	Références	164

Introduction générale

Les nanobiotechnologies sont un domaine interdisciplinaire de recherche en plein essor. Elles désignent l'ensemble des savoir-faire théoriques et appliqués permettant de produire et manipuler des objets de taille nanométrique (10^{-9} mètre) en vue de les mettre à profit pour l'étude ou le traitement du vivant. De la même façon, une des thématiques considérées consiste à étudier les mécanismes du vivant et à s'inspirer de ceux-ci pour créer de nouveaux nano-objets aux propriétés remarquables.

Par ailleurs, dans le cadre thérapeutique, l'un des principaux enjeux est, aujourd'hui, de pouvoir suivre de manière dynamique les événements moléculaires se produisant à l'intérieur de la cellule vivante de façon à mieux comprendre son fonctionnement. Présent dans toutes les cellules d'un même organisme (figure 1), l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) apparaît comme un élément central, pilotant de nombreux processus biologiques.

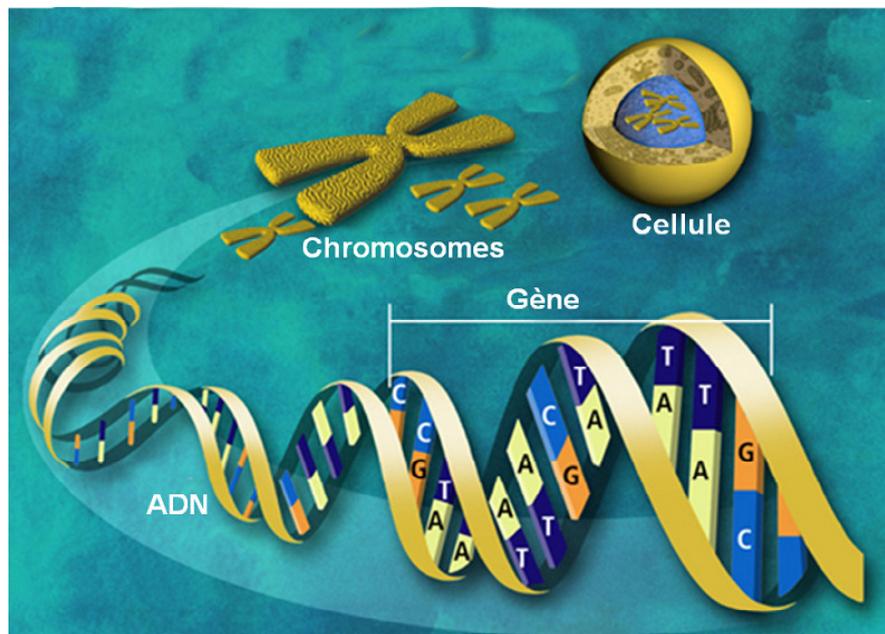


FIGURE 1 – L'ADN : la molécule du vivant.

L'Acide Désoxyribonucléique (ADN) est un acide nucléique (bio-molécule) qui contient les instructions génétiques spécifiques à toute forme de vie. L'ADN est souvent référencé comme étant la molécule de l'hérédité, car celui-ci est responsable de la propagation génétique des traits communs à une même espèce (gènes) [1–3]. Durant la reproduction, l'ADN est répliqué et transmis à la descendance. Une séquence d'ADN est constituée d'un ensemble de nucléotides, lesquels sont composés d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate.

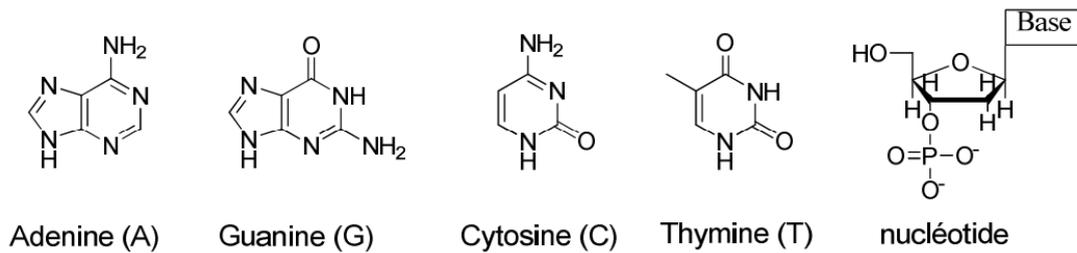


FIGURE 2 – Bases présentes dans l'ADN et structure d'un nucléotide.

Ce sucre présent dans l'ADN est le D-désoxyribose; les quatre bases sont l'Adénine (A); la Guanine (G); la Cytosine (C) et la Thymine (T) (voir figure 2). Un brin d'ADN est formé de nucléotides liés par une liaison phosphodiester entre le phosphate en 5' d'un nucléotide et le OH en 3' du nucléotide suivant. C'est l'ordre de l'enchaînement des bases qui va coder l'information génétique.

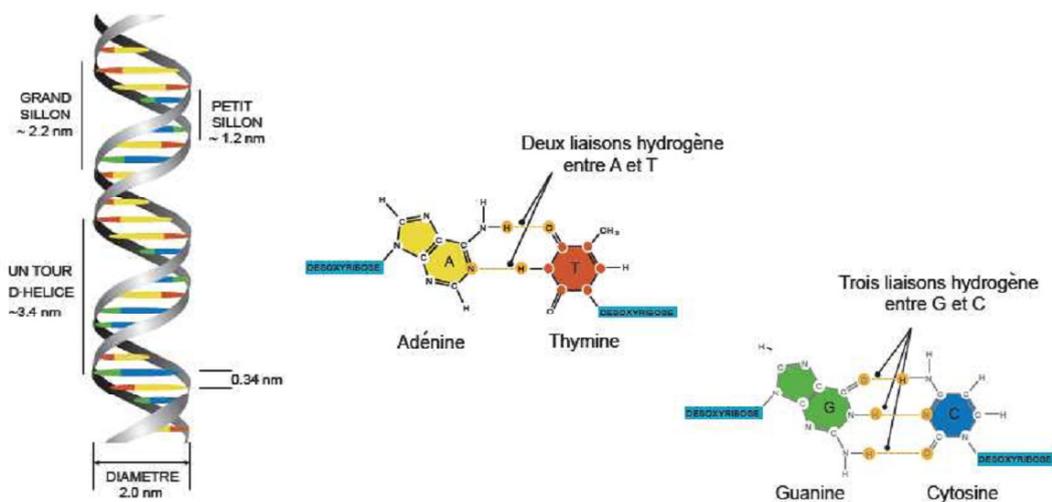


FIGURE 3 – Structure en double hélice de l'ADN et formules chimiques des bases de l'ADN.

La structure en double hélice de l'ADN fut mise en évidence en 1953 par Watson* et Crick† [4]. Les deux hélices antiparallèles sont reliées par des liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires (A-T et G-C). Ces liaisons hydrogène ainsi que l'empilement des bases (interaction entre les électrons π -conjugués, forces de Van der Waals) stabilisent fortement cette structure [5]. La double hélice d'ADN est extrêmement flexible. A partir d'études de diffraction sur des polynucléotides synthétiques et naturels, plusieurs familles de polymorphes ont été caractérisées. Ce polymorphisme est défini à partir des différences dans le déplacement et l'orientation des paires de bases par rapport à l'axe de l'hélice centrale. L'ADN peut avoir plusieurs conformations, lesquelles sont définies localement et macroscopiquement par divers paramètres structuraux. De par cette structure en double hélice, la molécule d'ADN dispose d'un petit et d'un grand sillon, dont les tailles diffèrent selon la conformation de la molécule. On peut trouver l'ADN sous trois formes [6–8] (voir figure 4) :

*, James Dewey Watson (1828-)

†, Francis Harry Compton Crick (1916-2004)

ADN B la structure est une hélice droite, c'est la forme naturelle de l'ADN (la plus commune) ; les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice, et globalement les paires ont leurs centres de gravité qui passent par l'axe. La répartition spatiale des paires de bases est homogène. Le pas de l'hélice est de 3.5-3.6 nm. Le petit sillon a une largeur de 6,0 Å, et une profondeur de 8.2 Å. Le grand sillon a une largeur de 11.6 Å, et une profondeur de 8.5 Å [9].

ADN A la structure est une hélice droite, cette forme est spécifique à la transcription de l'ADN, celle-ci est fortement présente si le taux d'hydratation est supérieur à 75%. L'axe de l'hélice passe par le grand sillon, lequel est plus grand que dans l'ADN B alors que le petit sillon est moins profond que dans l'ADN B. Les bases sont inclinées et décalées par rapport à l'axe, laissant un trou central dans l'hélice. La molécule est plus compacte, le pas est de 2.8 nm.

ADN Z la structure est une hélice gauche, l'ADN prend cette forme lorsque l'interaction des bases avec les protéines régulatrices est favorisée et lorsque les forces ioniques sont importantes. Comme l'ADN B, les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice, et globalement les paires ont leur centre de gravité qui passent par l'axe. Dans cette conformation, l'ADN Z n'a qu'un seul sillon ; lequel ressemble au petit sillon de l'ADN B. La conformation Z est favorisée par une forte proportion de paires de base G-C.

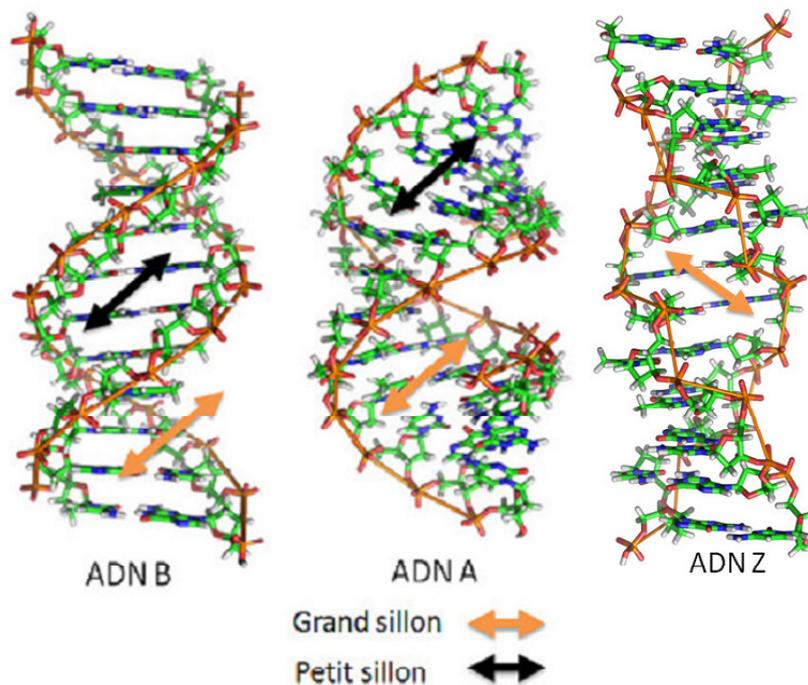


FIGURE 4 – Polymorphisme des doubles hélices d'ADN [10] et la position du petit et du grand sillon.

En plus de ces conformations, les brins d'ADN riches en Guanine peuvent former des structures à quatre brins appelées quadruplexes de guanine ou G-quadruplexe [11], résultant de l'empilement de plusieurs "G-quartets". Cet empilement est stabilisé par des interactions de recouvrement- π . Dans ce manuscrit, lorsque nous parlerons d'ADN, nous considérerons l'ADN B.

Au cours des divers processus intracellulaires, la structure et la forme de l'ADN peuvent varier. Ces changements de conformation peuvent être révélateurs de l'insertion de molécules dans l'ADN. Malheureusement, le signal de fluorescence endogène lié à l'ADN étant relativement faible [12,13], la caractérisation de l'ADN se fait généralement de façon indirecte, notamment via l'observation

de signaux issus de molécules greffées ou en interaction non covalente avec l'ADN. Historiquement, les premiers marqueurs utilisés furent les marqueurs radiologiques. Malgré leur bonne sensibilité, ceux-ci disposent d'une durée de vie courte et d'une toxicité importante. D'autres types d'imageries ont ensuite été développées comme par exemple : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la microscopie de fluorescence...

Aujourd'hui, le marquage fluorescent s'est très largement répandu dans les laboratoires de biologie. La fluorescence est une technique extrêmement sensible pour l'imagerie de l'ADN. Malgré un grand nombre de marqueurs déjà commercialisés, le développement de marqueurs fluorescents pour l'ADN est un domaine de recherche très actif. Il existe un grand nombre de marqueurs (plus ou moins stables) mais ceux-ci sont essentiellement dédiés à la microscopie en épifluorescence ou à la microscopie confocale. En dépit de nombreuses limites (photoblanchiment, dégradation, absorption des tissus...), la microscopie confocale de fluorescence est toujours utilisée. Au début des années quatre-vingt dix, pour remédier aux limites de la microscopie à un photon et notamment permettre l'imagerie en profondeur, une nouvelle technique de microscopie fut mise au point : la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons ou microscopie biphotonique [14]. Depuis cette date, cette technique a connu un développement extrêmement important, comme en témoigne la forte augmentation du nombre de publications qui y sont liées (voir figure 5).

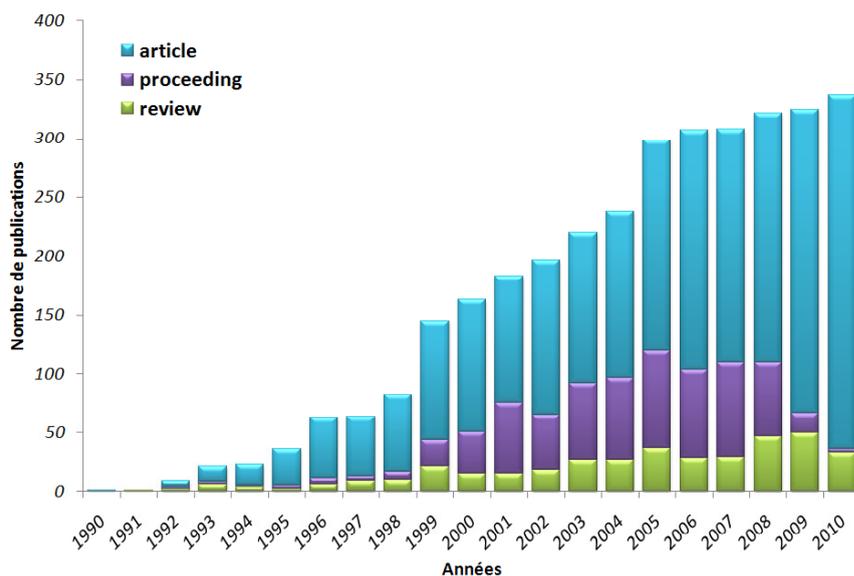


FIGURE 5 – Nombre de publications référencées par année par le moteur de recherche "Web of Science", ayant pour citation l'article de Denk & al. [14].

De nos jours, des microscopes à deux photons sont disponibles commercialement mais il n'existe aucun marqueur à deux photons spécifiques. Ainsi, la plupart des études de microscopie à deux photons sont réalisées avec des marqueurs non adaptés et peu efficaces ce qui entraîne de nombreux problèmes de destruction des tissus lors de l'acquisition.

L'étude des relations structure moléculaire/propriétés d'absorption à deux photons a mis en évidence des règles d'ingénierie et des géométries types. Parmi ces géométries, la géométrie octupolaire a été étudiée, particulièrement les dérivés de triphénylaminés (TP). Cependant, les travaux concernant l'obtention de molécules possédant à la fois une forte absorption à deux photons et pou-

vant être utilisées efficacement en milieu biologique restent rares. Dans ce contexte, la mise au point de fluorophores optimisés pour l'absorption à deux photons et utilisables en milieu biologique pour le marquage covalent et non covalent de biomolécules apparaît comme un objectif majeur auquel le CEA travaille depuis quelques années, en collaboration avec le laboratoire Raymond Latarjet de l'Institut Curie. Dans le cadre d'un précédent travail de thèse [15], les propriétés intéressantes des triphénylaminés substitués par des groupements cationiques vinylpyridinium (**TP-2Py** et **TP-3Py**, voir figure 6) ont été mises en évidence [16] (brevet WO 2008/055969).

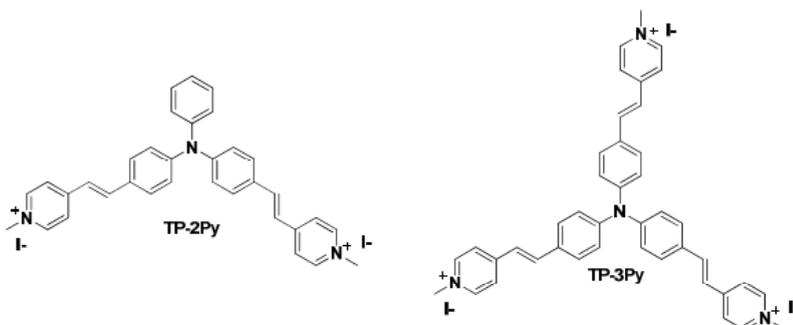


FIGURE 6 – Molécules *TP-2Py* et *TP-3Py* mises au point lors de la thèse de Clémence Allain.

Ces fluorophores disposent d'une forte section efficace d'absorption à deux photons, d'une excellente photostabilité, d'une émission dans le rouge et d'une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN, ce qui en fait d'excellents marqueurs non covalents d'ADN.

Dans la continuité de ces résultats, les études rapportées dans ce manuscrit ont visé à explorer les voies d'amélioration des performances de ces composés et à comprendre l'origine de l'exaltation de la fluorescence de ces composés en présence d'ADN. Afin d'y parvenir, nous avons monté un banc de microscopie biphotonique permettant de faire des mesures d'intensité et d'anisotropie de fluorescence résolues en temps, les objectifs du travail réalisé ont ensuite été de :

- ⇒ Revenir sur les mécanismes caractérisant l'exaltation de fluorescence des *TP-2Py* en présence d'ADN,
- ⇒ Étudier divers analogues des *TP-2Py* et *TP-3Py*, en apportant des modifications sur le cœur triphénylamine ou sur les groupements accepteurs. Mesurer leurs durées de vie de fluorescence afin de déduire des informations sur les interactions fluorophore/ADN.
- ⇒ Réaliser des caractérisations complémentaires à haute résolution, du complexe fluorophore/ADN par microscopie à effet tunnel (STM).

Dans une première partie, nous rappellerons les origines et les caractéristiques de la fluorescence. Puis, nous décrirons le banc expérimental de microscopie biphotonique résolues en temps. Dans la troisième partie, nous étudierons les principales caractéristiques de l'interaction spécifique fluorophore/ADN. Pour finir ce manuscrit, nous décrirons les expériences complémentaires effectuées par microscopie à sonde locale, de caractérisation à "haute résolution" du complexe ADN/fluorophore.

Première partie

La fluorescence : Rappels des principales caractéristiques

Table des matières

1	Principe de la fluorescence	19
2	Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence	21
3	Propriétés des fluorophores	21
3.1	Le coefficient d'extinction molaire	22
3.2	Le rendement quantique de fluorescence	22
3.3	La durée de vie de fluorescence	23
4	La fluorescence par absorption de deux photons	25
4.1	Principe de l'absorption biphotonique	25
4.2	La section efficace d'absorption à deux photons	27
5	Les facteurs limitant la fluorescence	30
5.1	Photoblanchiment ("photobleaching")	30
5.2	Inhibition de la fluorescence	31

Il existe deux voies d'émission de lumière. Lorsque la lumière est émise par le rayonnement d'un corps chauffé à haute température, comme le soleil, on parle d'incandescence. L'émission par incandescence va du rouge au blanc-bleu, selon la température du corps. Elle est indépendante de la nature du corps. La lumière peut également résulter d'autres phénomènes qui ne sont pas d'origine thermique : l'émission d'une telle lumière est dite froide par opposition à la lumière chaude provenant de l'incandescence. L'émission froide correspond à la luminescence. La luminescence fut découverte par le physicien allemand E. Wiedemann* en 1888. Contrairement à l'incandescence, la luminescence dépend de la nature du corps. La luminescence est la propriété qu'ont certaines substances de restituer sous forme de photons ($q = h\nu$) l'énergie absorbée d'origine non thermique. Selon les voies d'excitation mises en œuvre, il existe différents types de luminescence :

- la photoluminescence,
- la bioluminescence,
- la chimiluminescence,
- l'électroluminescence,
- la triboluminescence,
- la radioluminescence,
- la sonoluminescence, etc...

Dans ce manuscrit, nous nous limiterons à la photoluminescence.

1 Principe de la fluorescence

La photoluminescence englobe trois processus : la fluorescence, la phosphorescence et l'émission par effet Raman ; qui dépendent de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée. Sur la figure 7 qui est un diagramme de Perrin[†]-Jablonski[‡] [17] sont représentés les différents niveaux d'énergie d'une molécule et les différents phénomènes liés à la photoluminescence.

Lorsqu'une molécule est à l'état fondamental ; les niveaux d'énergies de ses électrons ont une valeur minimale. Si une quantité appropriée d'énergie électromagnétique est fournie à cette molécule, elle peut passer de l'état stable singulet[§] S_0 à un état excité supérieur en énergie S_1 ou S_2 . L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ va permettre le peuplement de ces états excités. Le temps nécessaire à l'absorption est immédiat, de l'ordre de 10^{-15} s (fs). Après un certain temps, au cours duquel la molécule est le siège de divers processus de relaxation vibrationnels, l'électron quitte l'état excité de plus basse énergie pour retourner à son état initial. Ceci a été démontré empiriquement par Kasha[¶] [18]. Ce retour peut se produire suivant différentes voies :

1. Soit ce retour se fait directement vers l'état fondamental S_0 et on a l'émission d'un photon de fluorescence. Selon les molécules considérées, la durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-7} s. On notera cependant qu'il existe d'autres cas de fluorescence dite anormale où la relaxation s'effectue entre les états S_2 et S_0 (exemple : molécule d'azulène).
2. Soit ce retour se fait par étapes successives avec passage pendant un certain intervalle de temps à des niveaux d'énergie intermédiaires. Ainsi, une molécule excitée à un niveau élevé (état S_2 ou supérieur) est rapidement désexcitée suivant un processus non radiatif (conversion interne : ci sur la figure 7) et atteint l'état excité métastable S_1 . A partir de ce niveau,

*. Eilhard Wiedemann (1882-1928)

†. Jean Perrin (1870-1942)

‡. Alexander Jablonski(1898-1980)

§. même spin que l'état fondamental ; $2S + 1 = 1$

¶. Michael Kasha (1920-)

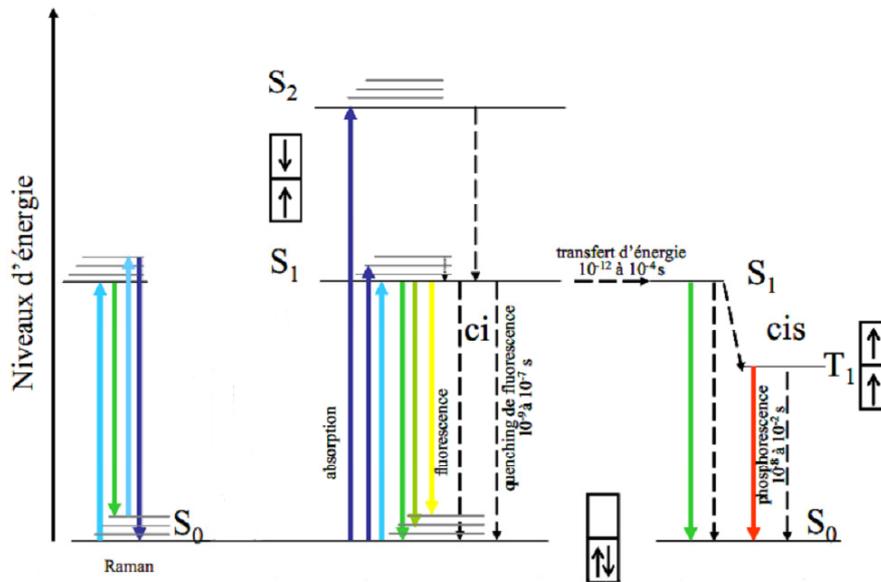


FIGURE 7 – Diagramme de Perrin-Jablonski. État fondamental singulet S_0 , États excités singulet S_1 et S_2 , l'État excité triplet T_1 , cis : conversion inter-système, ci : conversion interne.

une conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$ peut se produire rapidement, comme décrit précédemment. Cependant, la fluorescence est aussi en compétition avec des conversions intersystèmes : état singulet $S_1 \rightarrow$ état triplet* T_1 . En général, La probabilité de passage de S_1 vers T_1 est au moins un ordre de grandeur plus faible que la désexcitation radiative S_1 vers S_0 . Le passage d'un état triplet T_1 vers un état singulet S_0 est caractérisé par l'émission d'un photon dit de phosphorescence. La phosphorescence est un type de photoluminescence qui persiste après l'arrêt de l'excitation lumineuse. En effet, la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est a priori une transition interdite. Ainsi, la durée de vie moyenne de l'état excité est plus longue, elle s'échelonne typiquement de 10^{-4} s ($100\mu s$) à 10^{-8} s ($10ns$)

3. Soit la molécule revient dans son état fondamental sans émission de photons. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule et à la présence d'inhibiteur ("quencher").

*. Atome ou molécule possédant des électrons non appariés de spin parallèle; $2S + 1 = 3$

2 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence

Chaque molécule peut être caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent la distribution de probabilités des transitions énergétiques. Lorsqu'une molécule absorbe un photon d'énergie $h\nu$, une partie de l'énergie absorbée est perdue par relaxation vibronique. Ainsi, l'énergie du photon émis est plus faible que l'énergie du photon absorbé.

D'où $h\nu_{max_{absorption}} > h\nu_{max_{émission}}$ et donc $\lambda_{max_{absorption}} < \lambda_{max_{émission}}$.

Cette différence d'énergie entre les maxima d'excitation et d'émission s'appelle le déplacement de Stoke* (ou "Stoke's Shift"). A titre d'illustration, la figure 8 présente un exemple de spectre d'absorption et d'émission d'une molécule de référence : la Fluoresceine. Le déplacement de Stoke est un élément important pour qualifier un fluorophore. Plus cet écart est important, plus la distinction du signal d'émission par rapport au signal d'excitation est aisée (utilisation de filtres). Par la même occasion, on limite les risques de transfert énergétique entre les molécules.

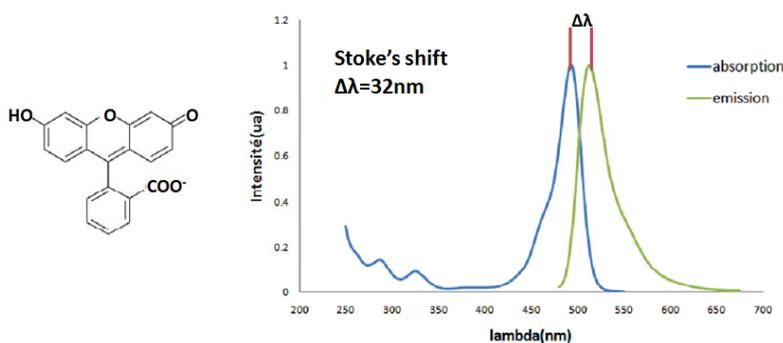


FIGURE 8 – Spectres d'excitation et d'émission de la Fluoresceine dans l'eau à pH 11, $\Delta\lambda$ est la déplacement de Stokes.

On remarque que le spectre d'émission de la fluoresceine est approximativement l'image miroir décalée vers le rouge de la bande d'absorption située vers les plus courtes longueurs d'onde. Selon les cas, l'interaction molécule-solvant (effets de solvation) peut entraîner un déplacement de l'absorption (solvatochromisme) ou de l'émission vers les plus grandes longueurs d'onde (bathochromisme) ou vers les plus faibles longueurs d'onde (hypsochromisme).

3 Propriétés des fluorophores

Au delà de leurs spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, les quatre principaux paramètres utilisés pour caractériser un fluorophore sont :

- le coefficient d'extinction molaire (ϵ) lié à l'absorption,
- la durée de vie de fluorescence (τ_f),
- le rendement quantique (ϕ_f),
- la photostabilité.

La durée de vie de fluorescence et le rendement quantique de fluorescence sont intimement liés. La stabilité photochimique est un point important en vue d'applications (en milieu biologique). Nous

*. George Gabriel Stoke (1819-1903)

discuterons de cette propriété plus en détail ultérieurement (section 4.2.2).

La figure 9 précise les différents processus impliqués lors de la relaxation d'une molécule de son état excité S_1 à l'état S_0 .

- désexcitation radiative caractérisée par son taux k_r ,
- désexcitation non radiative caractérisée par son taux k_{nr} (mouvements intramoléculaires, diffusion d'orientation, effets de quenching, transfert de charges ou d'électrons),

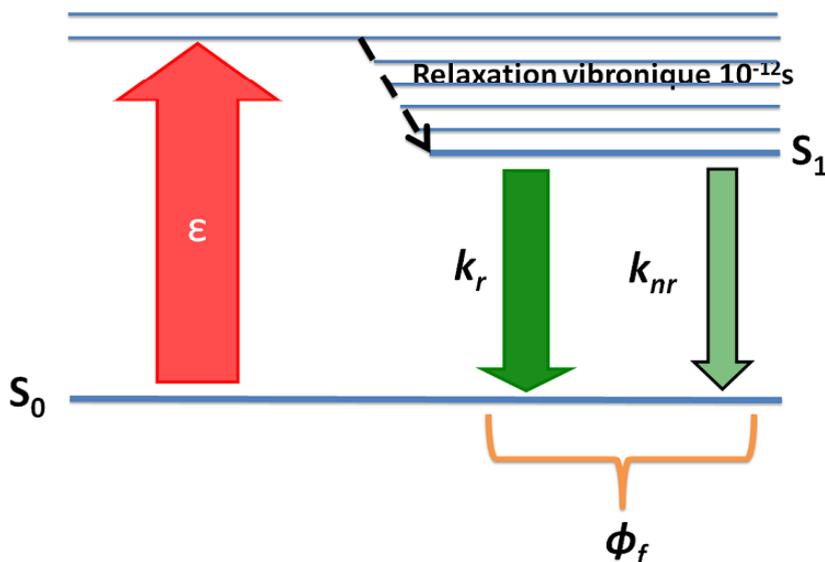


FIGURE 9 – Schéma simplifié du diagramme de Perrin-Jablonski représentant les niveaux excité S_1 et fondamental S_0 d'un fluorophore, ainsi que les transitions entre ces niveaux.

3.1 Le coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) reflète la probabilité d'absorption. Plus ϵ est grand, plus l'absorption est forte (ϵ s'exprime en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$).

L'intensité du signal lumineux absorbé dépend à la fois du coefficient d'extinction molaire et de la concentration en molécules. Cette relation est la loi d'absorption de Beer *-Lambert †-Bouguert ‡ :

$$I_{abs} = I_{inc} - I_{trans} = I_{inc}(1 - 10^{-\epsilon \cdot C \cdot l}) \quad (1)$$

Où I_{inc} est l'intensité lumineuse incidente, I_{trans} l'intensité lumineuse transmise, l , l'épaisseur du milieu traversé en cm et C la concentration moléculaire, en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.2 Le rendement quantique de fluorescence

L'efficacité de l'émission de fluorescence pour une molécule donnée est déterminée par le rendement quantique (ϕ_f), défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés. Cette valeur est comprise entre 0 et 1.

*. August Beer(1825-1863)

†. Johann Heinrich Lambert (1728-1777)

‡. Pierre Bouguert (1698-1758)

$$I_f = \phi_f * I_{abs} \quad (2)$$

I_f et I_{abs} = nombre de photons par unité de temps et de surface absorbés (abs) et émettant (f) la lumière ($\phi_f = 0.90$ pour la Fluorescéine dans une basique). Dans le cas d'un milieu faiblement absorbant, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à l'intensité incidente. Un développement limité de l'équation 1 permet en effet d'aboutir à :

$$I_f = 2,3 \phi_f \cdot I_{inc} \cdot \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (3)$$

soit une relation linéaire entre C, la concentration en fluorophores ; I_f , l'intensité d'émission et ϕ_f , le rendement quantique de fluorescence.

En considérant k_r et k_{nr} , respectivement les taux de désexcitation radiative et non radiative de la molécule, le rendement quantique de fluorescence est aussi défini par :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

3.3 La durée de vie de fluorescence

La troisième caractéristique importante d'une molécule fluorescente est le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence, τ_f . Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité c'est à dire au temps moyen passé par la molécule dans son état excité.

D'un point de vue cinétique, on définit la variation du nombre de molécules à l'état excité (N_1) par l'équation suivante :

$$-\frac{dN_1}{dt} = (k_r + k_{nr}) N_1 \quad (5)$$

En résolvant cette équation on trouve :

$$N_1(t) = (N_1)_0 \exp\left(\frac{-t}{k_r + k_{nr}}\right) \quad (6)$$

Or N_1 peut aussi être défini par :

$$N_1(t) = (N_1)_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau_f}\right) \quad (7)$$

D'où

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{\phi_f}{k_r} \quad (8)$$

Sur l'équation 7, on remarque que la population de l'état excité suit une décroissance exponentielle.

A titre d'exemple, la molécule de Fluorescéine dans l'eau (pH=11) a une durée de vie d'environ 4 ns. En pratique, les déclin de fluorescence couramment observés sont souvent multiexponentiels. En effet, l'environnement proche de la molécule peut fortement varier impliquant des contraintes

différentes sur les molécules et donc de multiples contributions dans le déclin de fluorescence.

La connaissance de la dynamique des états excités est de première importance dans la compréhension des processus photo-physiques, photo-chimiques et photo-biologiques. Pour cela, il apparaît primordial de coupler mesures d'intensité et mesures de durée de vie de fluorescence. Il existe deux techniques résolues en temps, la fluorescence impulsionnelle et la fluorescence de modulation de phase. Dans ces deux méthodes, on excite le fluorophore par une onde lumineuse. La différence entre ces deux méthodes vient du domaine étudié. Pour la fluorescence impulsionnelle, on travaille dans le domaine temporel, alors que pour la fluorescence de modulation de phase, on travaille dans le domaine des fréquences.

Dans le cas des mesures de fluorescence impulsionnelle, l'échantillon est excité par une impulsion lumineuse brève. La fluorescence induite est enregistrée en fonction du temps (voir figure 10). Plus précisément, on mesure, sur un grand nombre de cycles excitation/émission, le temps séparant l'absorption et l'émission d'un photon. On règle les conditions d'excitation de façon à pouvoir considérer qu'il y a, au plus, un photon émis par molécule excitée pour une impulsion excitatrice donnée. Après un grand nombre d'excitations et d'émissions, on peut recréer la décroissance de fluorescence du fluorophore.

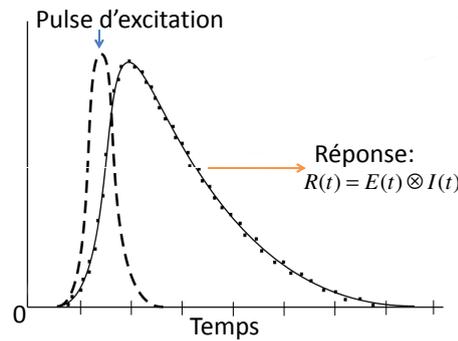


FIGURE 10 – Principe de la fluorescence impulsionnelle.

La réponse $I(t)$ du fluorophore peut se mettre sous la forme d'une exponentielle décroissante, $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_f)$ (où la constante de temps est la durée de vie de fluorescence) ou sous la forme d'une somme de plusieurs exponentielles décroissantes. Pour chaque fonction excitatrice $E(t)$, la réponse $R(t)$ de l'échantillon est le produit de convolution de cette fonction avec la réponse réelle de l'échantillon $I(t)$.

$$R(t) = E(t) \otimes I(t) = \int E(t') I(t - t') dt' \quad (9)$$

Nous reviendrons plus en détails sur la mise en œuvre pratique de ces mesures au chapitre II. Cette méthode nécessite l'utilisation d'algorithmes complexes d'ajustement et de déconvolution [19–22]. La décroissance d'intensité de fluorescence est souvent mesurée à travers un polariseur orienté à un angle de 54.7° de l'axe vertical z . Cette condition est utilisée pour s'affranchir des effets de la diffusion rotationnelle et/ou d'anisotropie dans la décroissance d'intensité de fluorescence. On nomme cet angle : l'angle "magique". La mise en œuvre pratique des mesures de la durée de vie de fluorescence sera développée dans le chapitre portant sur le montage de l'expérience.

Dans le cas de la fluorescence à modulation de phase, l'échantillon est excité par un champ à modulation sinusoïdale à haute fréquence. La réponse de fluorescence, qui est le produit de

convolution de la réponse réelle et de la fonction sinusoïdale d'excitation, est une sinusoïde dont les modulations sont à la même fréquence que la fonction excitatrice. Cependant, celle-ci est retardée en phase et partiellement démodulée. Le retard de phase Φ et le taux de modulation M caractérisent la réponse harmonique du système. Ces paramètres sont mesurés en fonction de la fréquence de modulation.

On utilise le retard de phase Φ et le taux de modulation M pour calculer la durée de vie, par les équations suivantes [23] :

$$\tan \phi = \omega \tau_\phi, \quad \tau_\phi = \omega^{-1} \tan \phi \quad (10)$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_m^2}}, \quad \tau_M = \frac{1}{\omega} \left[\frac{1}{M^2} - 1 \right]^{1/2} \quad (11)$$

Les mesures de durées de vie de fluorescence peuvent également être mises à profit en tant que techniques d'imagerie. La microscopie FLIM (Fluorescence Life time Imaging Microscopy) consiste à acquérir, en chaque point de l'image le déclin de la fluorescence et à faire une image de ce taux de déclin, pour mettre en évidence des changements du milieu environnant ou des interactions localisées dans telle ou telle partie de la cellule.

4 La fluorescence par absorption de deux photons

4.1 Principe de l'absorption biphotonique

En 1931, Maria Göppert-Mayer* [24] démontra lors de sa thèse, la théorie du processus non linéaire d'absorption à deux photons. Göppert-Mayer décrit les processus d'absorption, d'émission et de dispersion de la lumière dans un modèle d'interaction photon-atome. Göppert-Mayer rapporta l'existence d'un niveau virtuel lors de l'absorption par un atome de deux photons. Le premier photon induit une transition de l'état fondamental stable vers l'état virtuel, et le deuxième photon induit une transition de l'état virtuel vers l'état excité (voir figure 11). Ce type d'interaction doit intervenir lors de la durée de vie de l'état virtuel, environ quelques attosecondes (10^{-18} s) [25]. Ce ne fut qu'en 1960, avec l'invention du LASER, que les premières observations expérimentales furent réalisées.

Dans le cas des molécules centrosymétriques, on notera cependant que les états à deux photons sont différents des états à un photon. Selon le processus d'absorption, on peut donc peupler des niveaux d'énergie différents.

Pour comprendre plus précisément les mécanismes de l'absorption biphotonique, il faut revenir aux équations décrivant l'interaction d'un ensemble de molécules organiques avec un champ électrique [26]. Dans l'approximation la plus simple, on considère le milieu comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques et anharmoniques forcés guidés par la fréquence du champ optique incident.

*. Maria Göppert-Mayer (1906-1972)

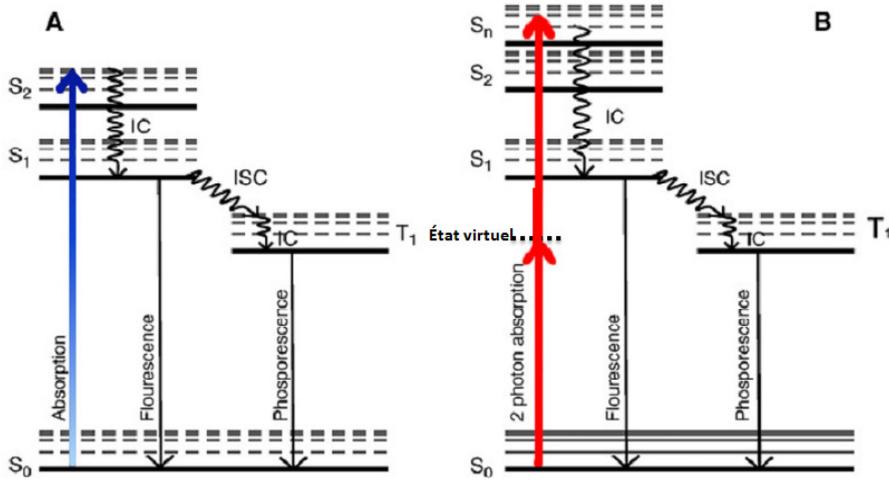


FIGURE 11 – Diagramme montrant les processus d'absorption pour une molécule représentés par un système à trois niveaux, (a) absorption monophotonique, (b) absorption biphotonique.

La polarisation induite peut être développée sous forme d'une série de puissances de champ E .

$$P = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots \quad (12)$$

Où $\chi^{(1)}$ est le tenseur de susceptibilité d'ordre un, $\chi^{(2)}$ est le tenseur de susceptibilité d'ordre deux et $\chi^{(3)}$ est le tenseur de susceptibilité d'ordre trois et ainsi de suite.

Sous l'action d'un champ électrique intense comme celui généré par un laser à forte puissance, les termes de polarisation d'ordre le plus élevé ne sont plus négligeables et doivent être pris en compte dans les calculs. En général, le n -ième tenseur $\chi^{(n)}$ est responsable de l'effet non-linéaire optique d'ordre n . Par exemple, $\chi^{(2)}$ est responsable d'effets non-linéaires d'ordre deux comme la génération de seconde harmonique (SHG), l'effet électro-optique linéaire. De même, $\chi^{(3)}$ permet de déduire des effets non-linéaires d'ordre trois comme l'effet Kerr* optique, la génération de troisième harmonique (THG), l'absorption biphotonique.

Les systèmes moléculaires peuvent interagir avec un champ optique de deux façons différentes : soit par des processus dissipatifs, soit par des processus paramétriques. Dans les processus paramétriques, il n'y a pas d'échange d'énergie. A l'inverse, les processus dissipatifs permettent l'échange d'énergie entre les molécules et le champ optique lors de l'absorption et de l'émission. L'échange d'énergie entre le milieu et le faisceau de lumière, par unité de temps et de volume, est donné par la formule [8] suivante :

$$\frac{dW}{dt} = \langle E \cdot \frac{dP}{dt} \rangle_t \quad (13)$$

Où E et P sont le champ électrique et le vecteur de polarisation et le $\langle \rangle_t$ représente la valeur moyenne.

L'ordre le plus bas d'absorption non-linéaire, c'est à dire l'absorption de deux photons est décrite par la partie imaginaire de $\chi^{(3)}$. Ainsi, on montre que ;

*. John Kerr (1828-1907)

$$\frac{dW}{dt} = \frac{8 \pi^2 \omega}{n^2 c^2} I^2 \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (14)$$

Dans cette équation, l'intensité I de la lumière est définie comme $I = EE^*nc/8\pi$.

Il est important de noter que le taux d'absorption en énergie a une dépendance quadratique avec l'intensité du laser car l'absorption biphotonique est un phénomène non-linéaire.

4.2 La section efficace d'absorption à deux photons

Pour caractériser l'absorption de deux photons d'un composé, on mesure la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}) décrite par :

$$\frac{dn_p}{dt} = \sigma_{2p} N F^2 \quad (15)$$

Où dn_p/dt est le nombre de photons absorbés par unité de temps, N est le nombre de molécules par unité de volume et $F = I/h\nu$, le flux de photons.

En combinant les équations 14 et 15 on obtient :

$$\sigma_{2p} = \frac{8 \pi^2 h v^2}{n^2 c^2 N} \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (16)$$

σ_{2p} est la section efficace d'absorption à deux photons et s'exprime en $cm^4 s \text{ photon}^{-1}$.

Celle-ci est généralement relativement faible, de l'ordre de $10^{-50} cm^4 s \text{ photon}^{-1}$. Par égard au travail effectué par Maria Göppert-Mayer, une unité spécifique a été définie : le GM (Göppert-Mayer) qui vaut $10^{-50} cm^4 \text{ photon}^{-1}$.

Si l'on considère l'énergie de transition à 1 photon, $h\nu$ alors l'énergie de transition à 2 photons est de $h\nu/2$. Cependant, on constate expérimentalement que de nombreuses molécules ont leur longueur d'onde maximale d'absorption à deux photons qui est décalée vers les faibles longueurs d'onde par rapport au double de la longueur d'onde d'absorption à un photon. En effet, les règles qui régissent les processus d'absorption à deux photons sont différentes de celles à un photon. Ainsi, pour les molécules symétriques, le premier état excité issu de l'absorption à un photon est un état interdit lors des processus d'absorption à deux photons [27] et il y a, en plus, le peuplement d'états excités de plus haute énergie $S_1 \rightarrow S_n$.

Expérimentalement, la détermination de la section efficace d'absorption à deux photons s'effectue généralement en référence à une molécule donnée, suivant la méthode développée par Xu et Webb [28]. Lors d'une mesure de fluorescence excitée à deux photons, le nombre moyen de photons de fluorescence collectés par unité de temps $\langle F(t) \rangle_t$ [29] est donné par l'équation suivante :

$$\langle F(t) \rangle_t = \frac{1}{2} \phi_f \eta_{sys} C \sigma_{2p} \frac{g_p}{f\tau} \frac{8n \langle P(t) \rangle_t^2}{\pi \lambda} \quad (17)$$

Où ϕ_f est le rendement quantique de fluorescence du fluorophore ; η_{sys} , l'efficacité de collection du système ; C , la concentration ; σ_{2p} , la section efficace d'absorption à deux photons du fluorophore ; $\frac{g_p}{f\tau}$ est un terme dépendant du laser, où g_p dépend de la forme de l'impulsion, f correspond

à la fréquence du laser et τ à la durée d'impulsion du laser (dans le cas d'un laser Ti :saphir, $\frac{g_p}{f\tau} \sim 10^5$) et $\langle P(t) \rangle_t$, la puissance moyenne incidente.

Lors de ces expériences, on considère qu'il n'y a pas de relaxation de fluorescence dite "anormale" ($S_2 \rightarrow S_0$) et que l'émission de fluorescence a lieu à partir du même état excité que l'absorption mono-photonique. Les processus d'émission sont indépendants du processus d'absorption (1 ou 2 photons), on utilise le rendement quantique de fluorescence déterminé à un photon.

Le principe de l'expérience consiste à comparer l'intensité de fluorescence émise par une molécule référence (usuellement la fluorescéine dans de l'eau à pH=11) à l'intensité de la molécule (A) à caractériser. La section efficace d'absorption à deux photons est donnée par le formule suivante :

$$\sigma_{2p_A}(\lambda) \phi_{f_A} = \frac{\eta_{Ref} \sigma_{2p_{Ref}}(\lambda) C_{Ref} \langle P_{Ref}(t) \rangle^2 \langle F(t) \rangle_A \phi_{f_{Ref}}}{\eta_A C_A \langle P_A(t) \rangle^2 \langle F(t) \rangle_{Ref} \phi_{f_A}} \quad (18)$$

Où $\langle F(t) \rangle_A$ est l'émission de fluorescence moyenne du fluorophore et $\langle F(t) \rangle_{ref}$ est l'émission de fluorescence moyenne de la référence. $\langle P_{ref}(t) \rangle$ est la puissance d'excitation incidente moyenne de la référence et $\langle P_A(t) \rangle$ est la puissance d'excitation incidente moyenne du fluorophore, η_{f_A} est l'efficacité de collection du système pour le fluorophore A et η_{Ref} est l'efficacité de collection du système pour la référence.

Si l'on considère que l'efficacité de collection de la lumière émise est similaire d'une molécule à l'autre et si l'on utilise la fluorescéine (dans l'eau à pH basique, $\phi_f=0.9$) comme référence alors l'équation 18 devient :

$$\sigma_{2p_A}(\lambda) \phi_{f_A} = \frac{0.9 \sigma_{2p_{FL}}(\lambda) C_{FL} \langle F(t) \rangle_A}{C_A \langle F(t) \rangle_{FL}} \quad (19)$$

Le banc expérimental utilisé est schématisé sur la figure 12.

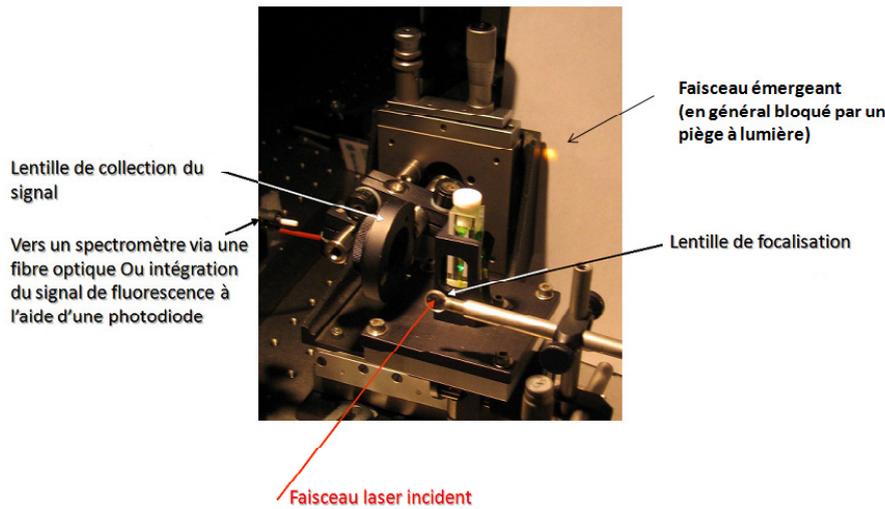


FIGURE 12 – Montage utilisé pour les mesures de section efficace d'absorption à deux photons. Les solutions de fluorescéine et celles étudiées sont disposées dans des cuves en quartz poli (1cm de long et 2mm de large). La source laser est un laser Ti :saphir ($P_{moyenne} = 1.3$ W, $f=80$ Mhz et $f_\tau=100$ fs), accordable de 730 à 930nm.

La source d'excitation utilisée est un laser Ti :saphir ($P_{moyenne} = 1.3$ mW, $f=80$ Mhz et

$f_{\tau}=100$ fs). Celui-ci est accordable de 730 à 930nm. On mesure l'intensité de fluorescence à 90° du faisceau d'excitation. Pour éviter tout risque de réabsorption ou de quenching, nous utilisons des solutions diluées ($C = 50 \rightarrow 100 \mu M$) de sorte que la densité optique (DO) soit inférieure à 1 (sur une épaisseur de 2mm). Le détecteur utilisé est une photodiode Hamamatsu C9329 qui permet de mesurer l'intensité totale de la fluorescence émise. La tension aux bornes de la photodiode, mesurée à l'aide d'un oscilloscope, est proportionnelle au nombre de photons détectés. Pour ne pas fausser la mesure du signal de fluorescence, il faut éliminer au maximum le bruit provenant de la diffusion du faisceau d'excitation. On utilise un filtre passe-bas (CVI 800, DO=4 à 800nm) et deux filtres colorés Schott (BG-40, DO=10, e=5mm), dont les spectres de transmission sont donnés à la figure 13.

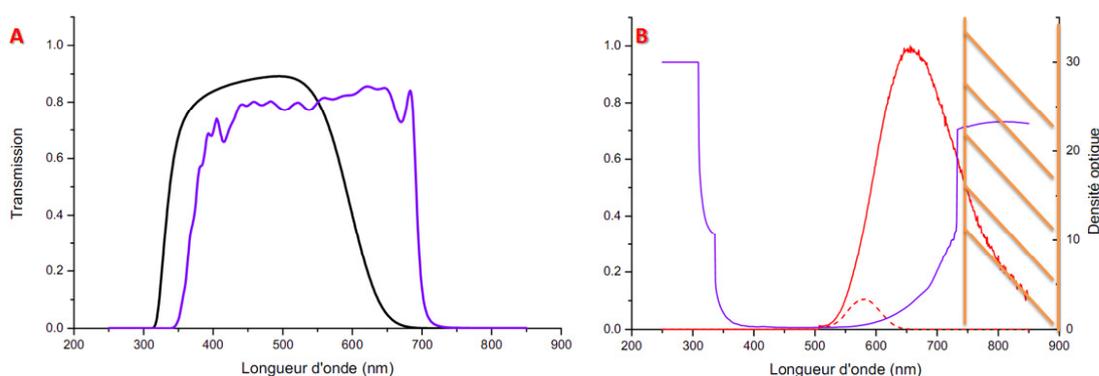


FIGURE 13 – A : Spectres de transmission des filtres utilisés pour couper toute contribution pouvant provenir de la diffusion du faisceau incident (passe-bas CVI800, en violet; le filtre BG-40, en noir). B : Spectre global du CVI800 et des deux BG40 (en violet). La gamme de longueur d'onde produite par le laser est hachurée. Spectres de transmission de la molécule TP-2Py sans filtres dans une solution d'ADN [40 équivalents] (en rouge, trait continu) et avec filtres dans une solution d'ADN [40 équivalents] (en rouge, en trait pointillés).

Cependant, selon les composés testés, ces filtres peuvent couper aussi une partie du signal de fluorescence émis. Afin de s'affranchir de ce problème, on estime pour chacun des composés testés, la proportion de signal absorbée par les filtres. Pour ce faire, nous considérons les différents spectres de fluorescence des composés testés et le spectre d'absorption total de tous les filtres utilisés. Un taux de collection à appliquer à la mesure directe du signal est alors déterminé. A titre d'exemple, nous avons mis le spectre d'une molécule étudiée notée : TP-2Py sans filtre dans une solution d'ADN [40 équivalents en paires de bases] (en rouge, trait continu) et le spectre de la même solution mesuré par le détecteur (en rouge, en trait pointillés). Le pourcentage de l'émission de fluorescence de la TP-2Py collecté par détecteur est de 4%. Pour chacun des composés testés, ces taux de collection sont explicités en annexe B.1.

On remarque que seulement une petite partie de la fluorescence émise par le fluorophore est détectée par le détecteur. Le taux de signal collecté étant particulièrement faible, nous avons veillé à éliminer toutes les sources de bruit éventuelles (bruit ambiant, diffusion du faisceau laser). Le niveau de bruit est évalué à partir du signal mesuré sur une cuve ne contenant que le solvant de la molécule considérée. Ce niveau de bruit est ensuite soustrait à chaque mesure de fluorescence effectuée. Enfin, au cours de chaque campagne de test, la validité des mesures effectuées est estimée à partir de mesures systématiques effectuées sur une autre molécule de référence : la Rhodamine

6G. Si les valeurs déterminées correspondent à celles de la littérature (voir tableau 1), la campagne de mesures est validée. Malgré l'ensemble de ce protocole, les barres d'erreur évaluées sur chacune des mesures de section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}) sont estimées à 30% environ.

TABLE 1 – *Tableau des valeurs des sections efficaces d'absorption à deux photons de la fluorescéine (eau, pH 11) et de la rhodamine 6G (éthanol) [28]*

λ (nm)	σ_{2p} fluoresceine H ₂ O pH 11 (GM)	σ_{2p} Rhodamine6G dans éthanol (GM)
691	16	106
700	19	160
720	19	34
740	30	21
760	36	30
780	37	36
800	36	40
820	29	43
840	13	20
860	8	30
880	11	17
900	16	15
920	26	34
940	21	43
960	15	53

5 Les facteurs limitant la fluorescence

L'inhibition ("quenching") et le photoblanchiment sont deux processus qui impliquent un affaiblissement de l'émission de fluorescence. Les deux phénomènes se distinguent par le fait que l'inhibition est souvent réversible, alors que le photoblanchiment ne l'est pas. Ces deux facteurs sont les causes principales de dégradation du signal de fluorescence.

5.1 Photoblanchiment ("photobleaching")

Un bon fluorophore doit pouvoir réaliser un grand nombre de cycles sans dégradation [30]. A titre d'exemple, la fluorescéine peut subir entre 10^4 et 10^5 excitations avant d'être détruite [31] alors que les quantum dots ne subissent que très peu l'effet de la photodégradation. Cependant, les quantum dots ont des fluctuations importantes d'émission de fluorescence (clignotement : blinking).

La photoblanchiment se produit lorsqu'un fluorophore est excité en présence d'oxygène. Le photoblanchiment correspond à une dégradation chimique de la molécule suite à l'interaction avec des molécules environnantes (par exemple l'interaction avec le singulet d'O₂).

Un autre phénomène qui conduit à la réduction de la fluorescence est le "fading". Celui-ci correspond à la diminution de fluorescence sur une longue période et peut éventuellement se produire

sans excitation lumineuse (oxydation du fluorophore).

5.2 Inhibition de la fluorescence

Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence : spectre d'émission et d'absorption, polarisation, rendement quantique et durée de vie de fluorescence ne constituent la signature d'une molécule que sous certaines conditions. Des changements plus ou moins importants peuvent se manifester sous l'effet de divers facteurs dont la figure 14 résume les principaux.

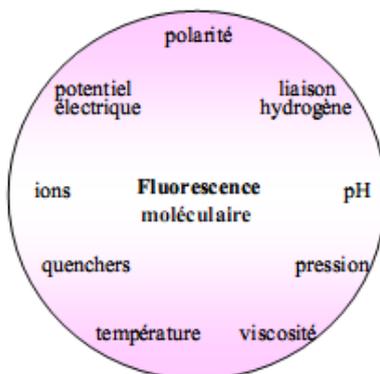


FIGURE 14 – représentation schématique des différents facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence [32].

Nous allons développer brièvement les cas les plus communs, mais surtout ceux qui sont intéressants dans le cadre de la thèse.

En particulier, dans de nombreux cas, le spectre de fluorescence d'un fluorophore dépendra de son environnement physico-chimique. A l'état excité un fluorophore est davantage polaire qu'à l'état fondamental. La fluorescence aura lieu à des longueurs d'onde d'autant plus grandes qu'il est dans un environnement polaire car l'état excité y est plus stable.

De même, de nombreux fluorophores peuvent être profondément modifiés par la protonation ou la déprotonation de groupes fonctionnels. Ces changements peuvent favoriser les processus non-radiatifs et donc diminuer le rendement quantique de fluorescence. Les modifications du pH peuvent aussi influencer les spectres d'absorption et d'émission. La caractérisation de tels effets étant d'ailleurs un moyen de mesurer des variations de pH.

Lorsque l'on ajoute des molécules dans une solution contenant des fluorophores, celles-ci vont entrer en collision avec les fluorophores ou former des complexes qui n'émettent pas de lumière. Ce type de molécules peut jouer le rôle d'inhibiteur (quencheur) de la fluorescence. Lors de collisions intermoléculaires, l'énergie électronique sera convertie en énergie cinétique et de vibrations, c'est le quenching dynamique. Le quenching statique est observé lors de la formation de complexes non fluorescents. Dans les deux cas, la valeur du rendement quantique va décroître et la fluorescence sera faible.

Malgré leurs effets négatifs, on peut tirer parti de ces différents effets pour la mise en œuvre de techniques spécifiques de caractérisation ou d'imagerie. Ainsi, le quenching est utilisé pour

l'imagerie de fluorescence par des mesures de FRET* [33] (Forster Resonance Energy Transfer). Et le photoblanchiment a récemment été mis à profit pour la microscopie à haute résolution dite " 4π -STED" [34].

*. Max Forster (1867-1930)

Deuxième partie

La microscopie de fluorescence

Table des matières

1	La microscopie en épifluorescence	36
1.1	Principe	36
1.2	Résolution	37
2	La microscopie confocale	38
2.1	Principe	38
2.2	Résolution	38
2.3	Limites	39
3	La microscopie biphotonique	40
3.1	Principe	40
3.2	Résolution	40
3.3	Avantages et inconvénients	41
4	Montage du banc de microscopie de fluorescence à deux photons résolue en temps.	43
4.1	Composition du système	43
4.2	L'excitation	44
4.2.1	Le laser titane saphir	44
4.2.2	Mise en forme du faisceau laser	45
4.2.3	Modalité du réglage du faisceau laser dans le microscope	45
4.3	Le statif de microscope Olympus IX-71	46
4.4	L'émission	49
4.4.1	Les détecteurs	50
4.5	Principe et Réalisation	52
4.6	Logiciel d'acquisition	55
4.7	Réponse instrumentale	56
4.8	Validation expérimentale du banc de mesure	57
4.8.1	La Fluorescéine dans l'eau à pH 11	57
4.8.2	La Rhodamine 6G dans l'éthanol	58
4.8.3	La Rhodamine B dans l'eau	58
4.8.4	Mélange de Fluorescéine et de Rhodamine B	59
5	Anisotropie de fluorescence	62
5.1	Origine de l'anisotropie de fluorescence : la photoselection	62
5.1.1	Définition	62
5.1.2	Calcul dans le cas de composés dipolaires	63
5.2	Dépolarisation de la fluorescence	65
5.3	Mesure de l'anisotropie de fluorescence	66
5.3.1	Principe	66
5.3.2	Mesure du coefficient de diffusion rotationnel d'un marqueur d'ADN	67

5.3.3 Le Hoechst 33258 67

La microscopie regroupe l'ensemble des techniques d'imagerie d'objets de petites dimensions. On distingue principalement trois types de microscopies : la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale. Dans la microscopie optique de fluorescence, l'échantillon est éclairé par une lampe ou une source laser et les molécules fluorescentes vont interagir avec la lumière incidente. Il existe diverses variantes de microscopie de fluorescence :

- la microscopie en ondes évanescentes [35],
- la microscopie en épifluorescence [36],
- la microscopie confocale [37],
- la microscopie à deux photons [14].

C'est sur cette dernière que l'on se centrera étant donné le sujet de la thèse.

1 La microscopie en épifluorescence

1.1 Principe

La microscopie en épifluorescence est une technique très ancienne [36], couramment utilisée par les biologistes. La source lumineuse, souvent une lampe à vapeurs de mercure (100W typiquement) émet dans une large gamme de longueurs d'onde et la plage de longueurs d'onde excitatrice souhaitée peut être sélectionnée à l'aide de filtres. Sur la figure 15, qui représente le schéma typique d'un microscope inversé, la lumière excitatrice (en bleu) est réfléchiée sur le miroir dichroïque puis passe à travers l'objectif avant d'être focalisée dans le plan de l'échantillon. L'émission de fluorescence est isotrope, une partie de l'émission se trouve captée par l'objectif. Ensuite, la lumière émise par le fluorophore traverse le miroir dichroïque lequel va permettre de séparer la fluorescence de la lumière incidente. Ensuite, la fluorescence passe à travers le filtre d'émission, qui va supprimer le signal d'excitation résiduel, pour venir sur le détecteur (par exemple, une camera CCD (Charge-Coupled Device)).

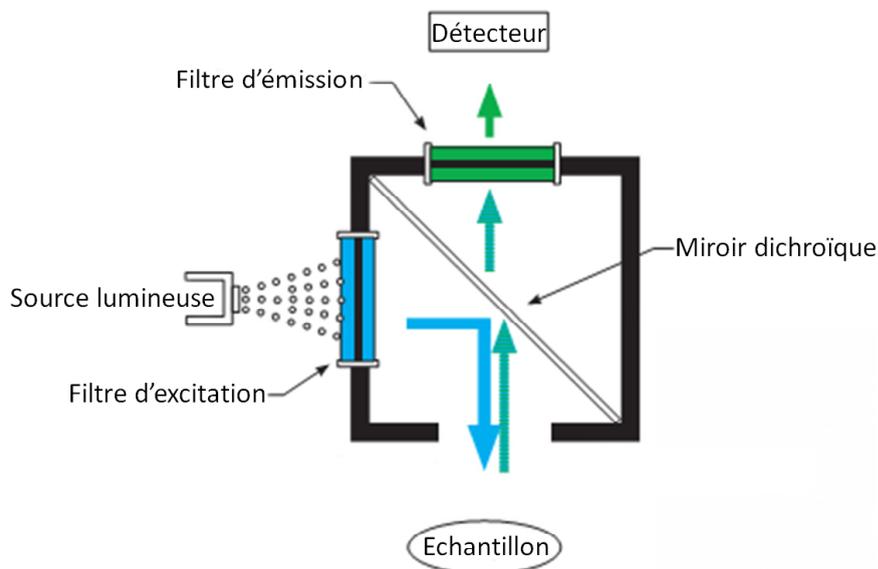


FIGURE 15 – Principe du microscope en épifluorescence.

1.2 Résolution

La résolution latérale de ce type de microscopie est donnée par la distance minimale entre deux points séparables sur l'image finale et se calcule par la formule suivante [38] :

$$d_{xy} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (20)$$

Où NA est l'ouverture numérique de l'objectif.

Cette distance, appelée critère de Rayleigh*, est due à la diffraction. L'image d'un point source est un disque (disque d'Airy†). Celui-ci est représenté sur la figure 16.

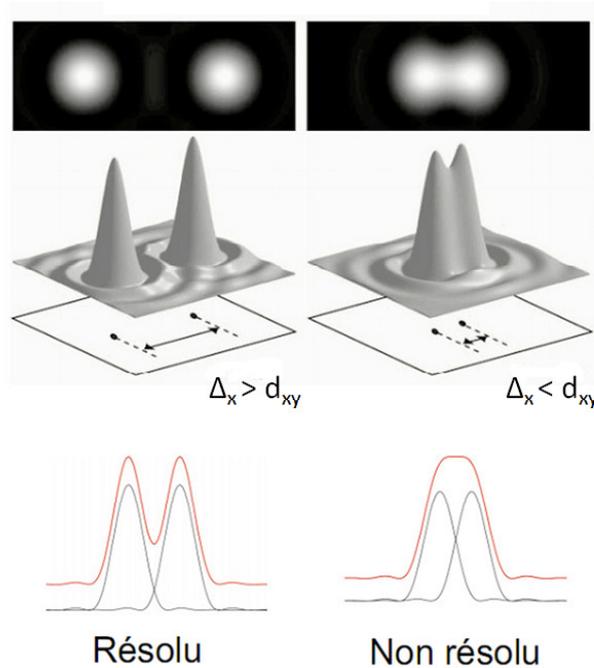


FIGURE 16 – Tâche de diffraction de deux points rapprochés, les deux points sont discernables si $\Delta_x > d_{xy}$.

L'image que l'on observe (figure 16) résulte de la convolution entre un objet (un point dans le cas de la figure 16) et la réponse du système optique dans son ensemble. La PSF (Point Spread Function) de délocalisation décrit les altérations du disque de Airy lorsque l'on s'éloigne du plan focal dans l'axe de la lentille (dit axe Z). La résolution longitudinale est donnée par la formule suivante [38] :

$$d_z = 2 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (21)$$

Où NA est l'ouverture numérique de l'objectif.

Une des limites de cette technique est sa résolution longitudinale faible. Bien que la mise au point se fasse sur un plan focal précis, l'image est entachée d'un bruit de fond considérable qui résulte, entre autre, de l'excitation de tous les fluorophores situés sur le chemin optique de la lumière incidente. Cette absence de sectionnement tridimensionnel ne permet pas l'imagerie en trois dimensions. L'un des moyens permettant de remédier à ce problème consiste à utiliser un

*. Lord John Williams Strutt Rayleigh (1842-1919)

†. Sir George Biddell Airy (1801-1892)

filtrage spatial du signal : c'est le principe de la microscopie confocale décrite ci-dessous.

2 La microscopie confocale

2.1 Principe

En microscopie conventionnelle confocale [37], on utilise la même configuration qu'en microscopie d'épifluorescence. Cependant, on supprime la majeure partie du signal de fluorescence issu des fluorophores hors plan focal. Pour cela, on focalise le faisceau de fluorescence sur le détecteur, et on place un diaphragme (pinhole) au diamètre adapté (=limite de diffraction) au plan image pour rejeter les faisceaux émis hors plan focal (voir figure 17).

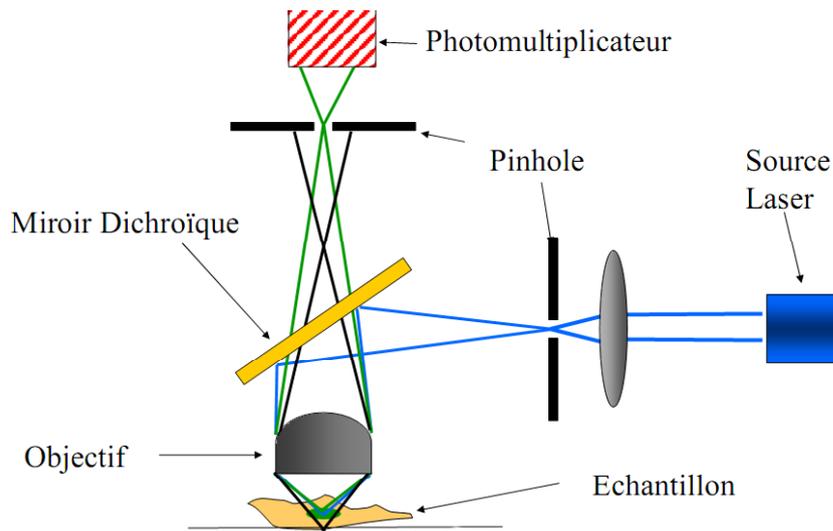


FIGURE 17 – Principe de la microscopie confocale.

Avec un excellent réglage de la taille du trou de filtrage, cette technique permet l'imagerie en trois dimensions [39]. Outre les difficultés éventuelles associées au réglage de ce trou de filtrage spatial, le principal problème de cette technique est de trouver la taille de trou permettant le meilleur compromis entre sensibilité et résolution longitudinale.

2.2 Résolution

On montre que si la résolution longitudinale est augmentée (30%), la microscopie confocale permet de gagner légèrement (de 1 à 10% par rapport à la microscopie en épifluorescence) en résolution latérale (voir équations 22) [38].

$$\begin{cases} d_{xy} = 0.4 \frac{\lambda}{NA} \\ d_z = 1.4 \frac{\lambda}{NA^2} \end{cases} \quad (22)$$

Cette résolution est obtenue pour un diamètre d'ouverture de diaphragme égale au double de d_{xy} .

Néanmoins, le volume d'excitation est très proche de celui de la microscopie en épifluorescence (voir équation 23).

$$V_{UPC} = 2\pi d_{xy}^2 d_z \quad (23)$$

2.3 Limites

En microscopie confocale, l'énergie des photons absorbés est la même qu'en microscopie en épifluorescence. Ceci implique que le photoblanchiment est identique au point focal. Par ailleurs, en microscopie monophotonique, la longueur d'onde d'excitation se situe dans le visible, là où les composants des tissus absorbent. L'absorption des tissus va réduire la pénétration de la lumière excitatrice. Pour l'étude de phénomènes chimiques à l'intérieur d'une cellule, il faut que l'on fasse en sorte de ne pas l'observer sans détruire la cellule. Néanmoins, les composants de la cellule peuvent absorber la lumière d'excitation. Entre 600 nm et 1 μm, il existe une fenêtre optique où les protéines, l'hémoglobine, l'eau et la mélanine absorbent très peu (voir figure 18).

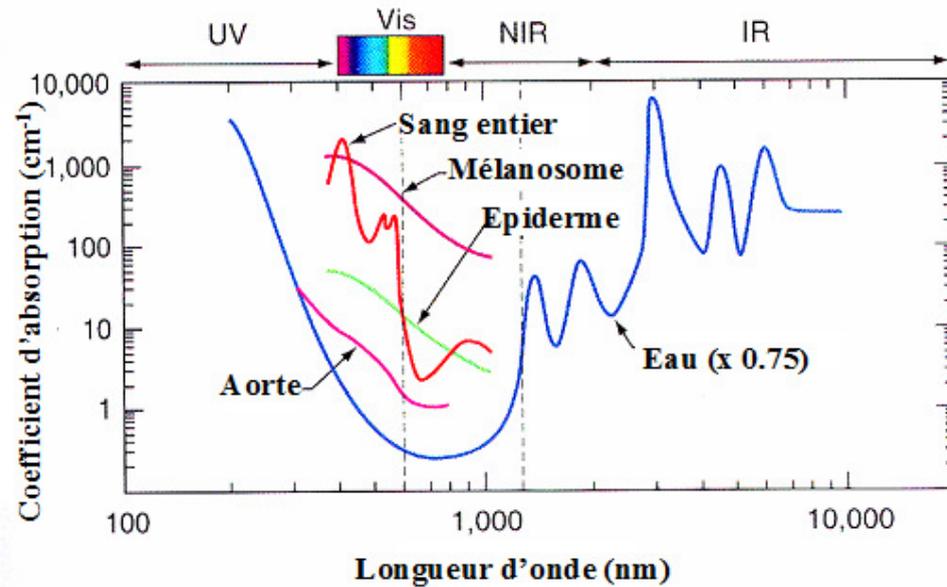


FIGURE 18 – Absorption des différents éléments du vivant [40].

3 La microscopie biphotonique

3.1 Principe

Communément la longueur d'onde d'excitation lors des processus d'absorption à deux photons se situe dans le proche infrarouge. Dans cette gamme de longueurs d'onde, il existe un grand nombre de sources disponibles et les composants du vivant n'absorbent que très peu ce qui rend de fait possible l'imagerie en profondeur. Par ailleurs, puisque l'absorption biphotonique est un processus non-linéaire, la fluorescence n'est issue que du point focal. A l'inverse de la microscopie en épifluorescence, où la fluorescence est issue de tout le trajet optique du laser. Ceci est illustré par la figure 19. Cette propriété donne à la microscopie biphotonique une résolution 3D intrinsèque.

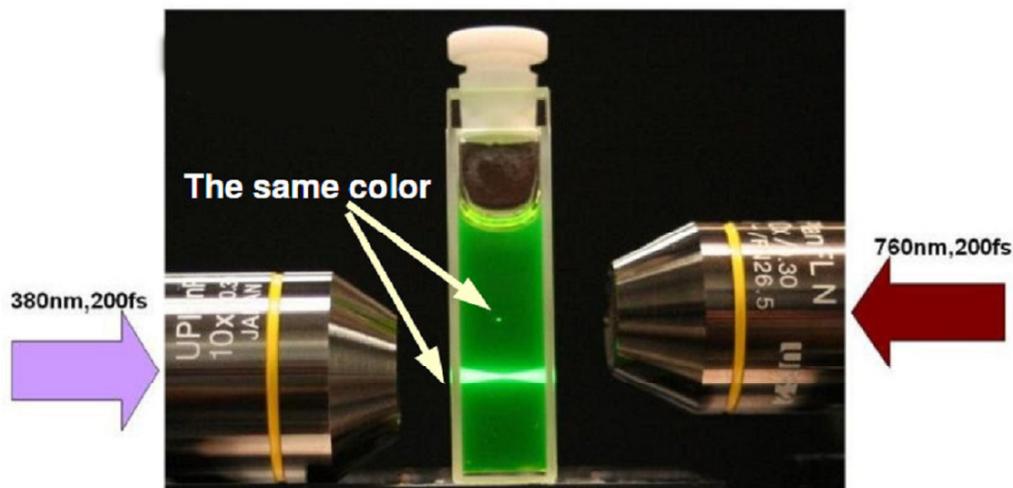


FIGURE 19 – Comparaison de la localisation de la fluorescence en excitation à un photon (en bas) et à deux photons (en haut) [41].

3.2 Résolution

Cependant, l'utilisation d'une longueur d'onde (λ) d'excitation du double de celle utilisée pour l'absorption monophotonique pourrait laisser supposer une résolution latérale augmentée d'un facteur deux ($\lambda_{exc}^{2ph} \simeq 2 \times \lambda_{exc}^{1ph}$). Néanmoins, cette comparaison serait basée sur l'utilisation d'un hypothétique microscope confocal parfait où le diaphragme aurait une ouverture infiniment petite [42]. Car plus le diaphragme est ouvert, plus la résolution est mauvaise. Pour déterminer la résolution de la microscopie d'absorption biphotonique, on calcule la fonction d'étalement du point d'illumination (Illumination Point Spread Function, IPSF(x,y,z)). Cette fonction décrit l'intensité d'excitation autour du point de focalisation.

Dans le cas, de la microscopie d'absorption à deux photons, la fonction d'étalement du point d'excitation est donnée par le carré de la fonction d'étalement du point d'illumination ($\text{IPSF}_{2\text{photons}}(x,y,z)=\text{IPSF}^2(x,y,z)$, voir figure 20).

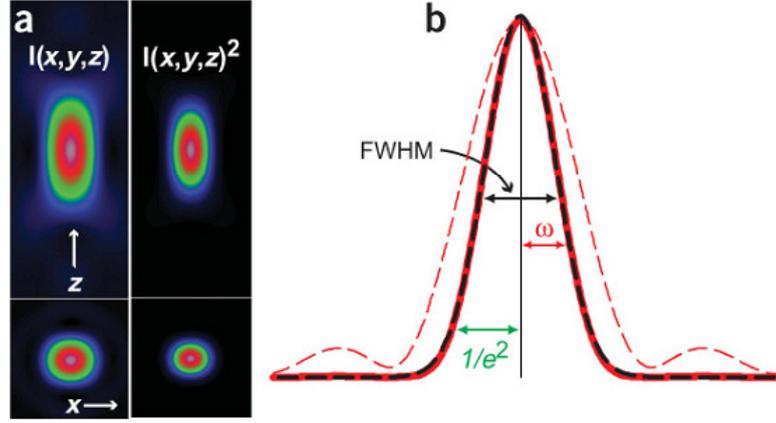


FIGURE 20 – (A) Vues axiale et longitudinale de la fonction d'étalement du point d'illumination [43] (IPSF) et IPSF^2 . (B) Profil longitudinal en $(0,0,z)$ de la IPSF (courbe en pointillées rouges) et de la IPSF^2 (courbe en trait continu) et en noir l'ajustement par une gaussienne.

A partir des travaux de Richards et Wolf [44], on montre que les résolutions latérale et longitudinale peuvent se mettre sous la forme :

$$d_{xy} = \begin{cases} \frac{0.320\lambda}{\sqrt{2} NA} & NA < 0.7 \\ \frac{0.325\lambda}{\sqrt{2} NA^{0.91}} & NA > 0.7 \end{cases} \quad (24)$$

$$d_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (25)$$

Utilisant l'absorption biphotonique, et les nouvelles résolutions latérale et longitudinale, on peut définir le volume d'excitation :

$$V_{DP} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z \quad (26)$$

Le volume d'excitation est beaucoup plus petit que pour les techniques de microscopie monophotonique. Le photoblanchiment y est fortement réduit et le rapport signal/bruit y est grandement amélioré.

3.3 Avantages et inconvénients

Le tableau 2 dresse les principales caractéristiques des différents types de microscopie précédemment discutés.

TABLE 2 – Comparaison de la microscopie confocale et à deux photons.

	Microscopie confocale	Microscopie à deux photons
Sources laser utilisées	continue, visible-UV	Pulsé, proche infrarouge (systèmes commerciaux typiquement accordables de 750 – 1100nm; 100 – 200fs à taux de répétition de 80 Mhz)
Système d'imagerie	Balayage du laser (galvanomètres, déflecteurs acousto-optique)	Balayage du laser ou balayage de l'échantillon
Résolution axiale	$0.4 \frac{\lambda}{NA}$	$\frac{0.320\lambda}{\sqrt{2} NA}$
Résolution longitudinale	$1.4 \frac{\lambda}{NA^2}$	$\frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right]$
Mode d'excitation	Processus linéaire d'absorption d'un photon; \propto intensité;	Processus d'absorption de deux photons; non-linéaire, \propto (intensité) ²
Volume d'excitation	volume d'excitation large en milieu absorbant	volume d'excitation restreint dans un milieu transparent
Mode de collection	Réflexion (épiscollection)	Réflexion (épiscollection) et transmission (transcollection) avec tranches de tissu
Rapport signal/bruit	Fluorescence issue du trajet optique et du point focal, auto-fluorescence	Fluorescence issue uniquement du point focal
Existence de marqueurs	Hoechst, DAPI...	Aucun fluorophore spécifique (ingénierie moléculaire)
Limite pratiques de profondeur d'imagerie (sans compromis de résolution)	$\sim 100\mu\text{m}$	De quelques centaines de micromètres à $1000\mu\text{m}$ selon la composition des tissus

Les deux principaux avantages de la microscopie à deux photons sont :

- Le confinement de l'excitation qui permet une résolution 3D intrinsèque (processus non-linéaire) [45], limitant par ailleurs le photoblanchiment du fluorophore,
- L'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation dans l'infrarouge qui permet une meilleure pénétration dans les tissus et limite la diffusion (diminution de bruit).

Il existe plusieurs voies d'amélioration de cette technique. Ainsi, à l'image des résultats obtenus pour la microscopie d'épifluorescence à un photon, on peut améliorer la collection de la fluorescence par l'ajout d'un deuxième objectif [46] ou bien par des mesures stochastiques telles que I^5M (Incoherent-Illumination Imaging Microscopy) [47].

Mais l'utilisation de l'absorption biphotonique nécessite des fluorophores optimisés pour cette application. Actuellement, ce nombre de marqueurs est extrêmement faible. Après avoir détaillé l'expérience mise en place, nous discuterons ensuite en détail de l'optimisation de fluorophores pour la microscopie biphotonique qui constitue l'un des objectifs majeurs de ce travail.

4 Montage du banc de microscopie de fluorescence à deux photons résolue en temps.

Afin de pouvoir caractériser et comparer différents types de fluorophores, une des premières tâches de ce travail de thèse fut le montage d'un système de microscopie de fluorescence d'absorption à deux photons résolue en temps.

Après avoir considéré la fabrication d'un microscope "maison", nous avons finalement opté pour la réalisation d'une expérience utilisant un statif commercial de microscope inversé.

4.1 Composition du système

Le schéma de principe de l'expérience réalisée est représenté figure 21. Nous utilisons un microscope inversé Olympus IX-71 couplé à une excitation par un laser Titane-Saphir. En ce qui concerne la détection du signal, nous disposons de deux modes de détection possibles.

- soit la fluorescence est mesurée par un photomultiplicateur couplé à une galette de microcanaux (MultiChannel Plate - PhotoMultiplier Tubes : MCP-PMTs),
- soit le spectre de fluorescence est caractérisé à l'aide d'une camera CCD Andor.

L'échantillon est disposé sur une platine de déplacement nanométrique.

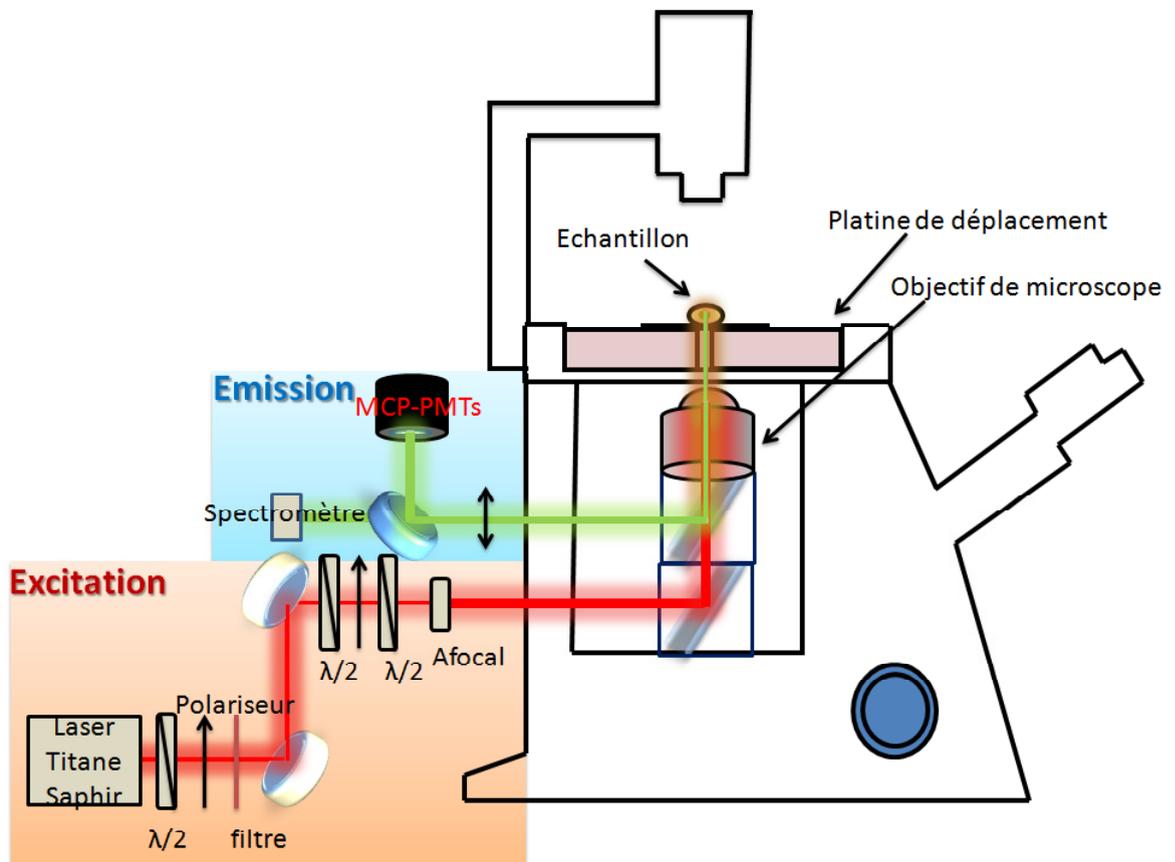


FIGURE 21 – Représentation simplifiée du montage de microscopie de fluorescence à deux photons. Le banc est séparé en trois grandes parties qui seront détaillées dans la suite : Partie excitation, Partie émission, Partie couplage via le statif de microscope.

Cette expérience est montée sur une table anti-vibration de façon à limiter au maximum les problèmes risquant de perturber l'imagerie (vibrations). Pour la description détaillée de cette expérience, nous allons décrire successivement la partie excitation (cadre rouge), la partie émission (cadre bleu) et le statif de microscope.

4.2 L'excitation

L'excitation des fluorophores est effectuée à l'aide d'un laser titane-saphir. Le couplage du laser au microscope ainsi que sa mise en forme sont illustrés par la figure 22.

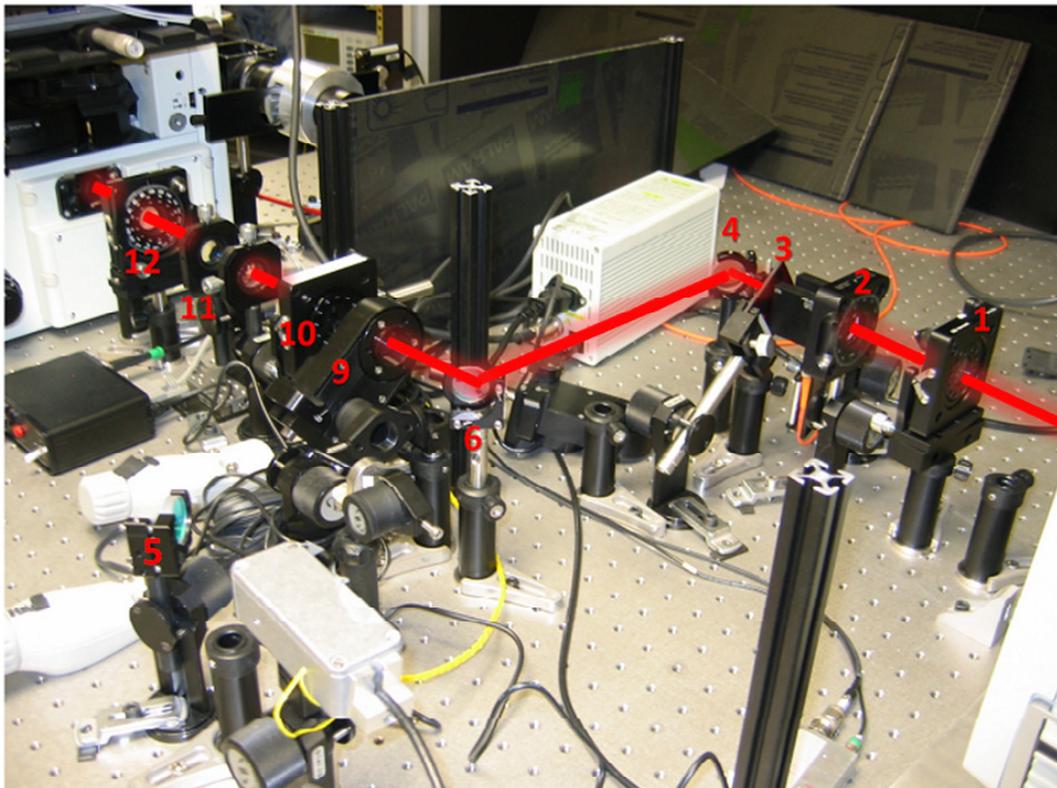


FIGURE 22 – Photographie du montage en amont du statif de microscope, En rouge le trajet du faisceau laser. 1-9, lames $\lambda/2$; 2-10-12, polariseurs ; 3, filtre rouge permettant d'éliminer la fluorescence parasite du barreau de Ti-Saph ; 4-5-6, miroirs diélectriques ; 11, afocal permettant de remplir la pupille d'entrée de l'objectif du microscope. (1) et (2) servent à la modulation de la puissance du laser, de même que (9) et (10) (avec un pilotage externe) ; (12) est une lame $\lambda/2$ qui permet d'ajuster la polarisation incidente du faisceau.

4.2.1 Le laser titane saphir

Nous savons que pour l'absorption de deux photons, nous devons utiliser une source lumineuse ayant une puissance crête locale extrêmement importante. Le laser utilisé correspond à une cavité Titane-Saphir pompée par un laser continu à 532nm (Millenia Pro 8.5W). Le laser de pompe excite un barreau de saphir (Al_2O_3) dopé au titane. Cette puissance permet un fonctionnement du laser sur une large gamme spectrale s'étalant typiquement de 700nm à 860nm. A la longueur d'onde optimale du laser, 780nm, nous obtenons une puissance de 1.45W en sortie de cavité. La fréquence des impulsions est de 80MHz (les impulsions sont séparées de 12.5ns) et en sortie de cavité, la durée des

impulsions est de 100fs (durée contrôlée via un autocorrélateur). Les impulsions femtosecondes ont des densités de puissance très importante par impulsion (plusieurs dizaines de kilowatt à quelques megawatt). Afin de ne pas dégrader les molécules, nous nous sommes limités à des densités de puissances crêtes de l'ordre de 5 GW/cm². Celle-ci permet amplement de détecter l'absorption de deux photons par un fluorophore donné. La probabilité d'absorption de deux photons est liée au nombre de photons absorbés par impulsion laser (n_a).

$$n_a = \frac{p_0^2 \sigma_{2p}}{\tau f^2} \left(\frac{NA^2}{2 \hbar c \lambda} \right)^2 \quad (27)$$

Où p_0 est la puissance moyenne du laser ; σ_{2p} , la section efficace d'absorption à deux photons du fluorophore ; τ , la durée du pulse d'excitation ; f , le taux de répétition du laser ; NA , l'ouverture numérique de l'objectif ; λ , la longueur d'onde d'excitation.

4.2.2 Mise en forme du faisceau laser

Le couplage du laser avec le statif de microscope s'effectue au travers d'optiques de précision. Pour limiter la puissance crête dans le plan de l'échantillon, nous devons fortement réduire la puissance du laser. Lors des expériences, la puissance moyenne utile est extrêmement faible (100 μ W). Pour réduire la puissance, nous avons utilisé deux systèmes de modulation d'intensité constitués d'une lame demi onde (**1,9**) suivis d'un polariseur (**2,10**).

Le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope. L'optimisation de la résolution du microscope peut être obtenue en faisant coïncider la taille du faisceau laser avec celle de la pupille d'entrée de l'objectif du microscope. Pour cela, on agrandit le diamètre du faisceau laser en utilisant un système afocal "beam expander" (**11**). Celui-ci est réalisé par la combinaison de deux lentilles, une lentille divergente ($f_2 = -40\text{mm}$) et une lentille convergente ($f_1 = 100\text{mm}$), le faisceau est élargi d'un facteur 2.5. Le faisceau laser est ensuite envoyé sur l'échantillon via l'entrée droite du microscope.

4.2.3 Modalité du réglage du faisceau laser dans le microscope

La première étape consiste à coupler le faisceau laser dans le microscope. La difficulté consiste à faire coïncider l'axe optique du statif avec celui du faisceau laser. Ceci est réalisé par auto-collimation du faisceau laser, en jouant sur les miroirs (**4**) et (**6**).

4.3 Le statif de microscope Olympus IX-71

La partie centrale de cette expérience est un statif de microscope Olympus IX-71 représenté sur la figure 23. Divers modules standards le composent dont, un système d'éclairage par le dessus constitué d'une lampe et d'un condenseur, une camera CCD 35 mm située sur le port gauche et une binoculaire pour la visualisation de l'échantillon, une platine de déplacement nanométrique, des objectifs interchangeables. La camera 35mm située sur le port gauche du microscope est utilisée pour le réglage de la focalisation du faisceau laser sur l'échantillon : celui-ci est réalisé en observant la réflexion du faisceau laser sur un miroir d'or.

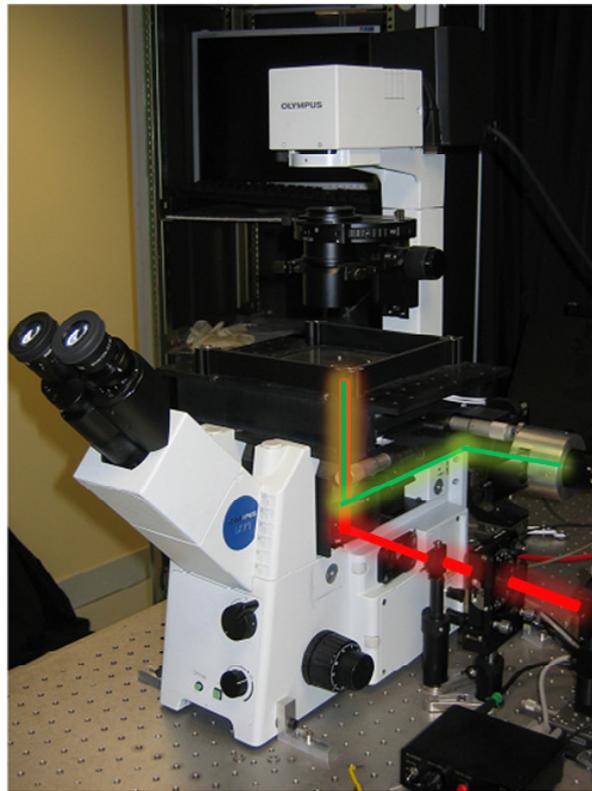


FIGURE 23 – Microscope inversé Olympus IX-71 équipé d'une camera 35mm sur le port gauche, d'une lampe blanche Hg-100W (située au-dessus) d'une platine de déplacement nanométrique MADCITY et une binoculaire. En rouge, le trajet du faisceau laser qui est renvoyé vers l'objectif de microscope à l'aide du filtre dichroïque Semrock FF670 et en vert, le trajet du faisceau de fluorescence, émis par l'échantillon, qui est renvoyé (filtre dichroïque Semrock FF735) vers les détecteurs.

En entrée du microscope, nous utilisons un filtre dichroïque à 450 nm pour renvoyer le faisceau laser sur l'échantillon. C'est un miroir dichroïque de référence FF670 de Semrock, il est optimisé pour la gamme de longueurs d'ondes utilisées (le spectre de transmission de ce miroir est tracé en bleu sur la figure 24).

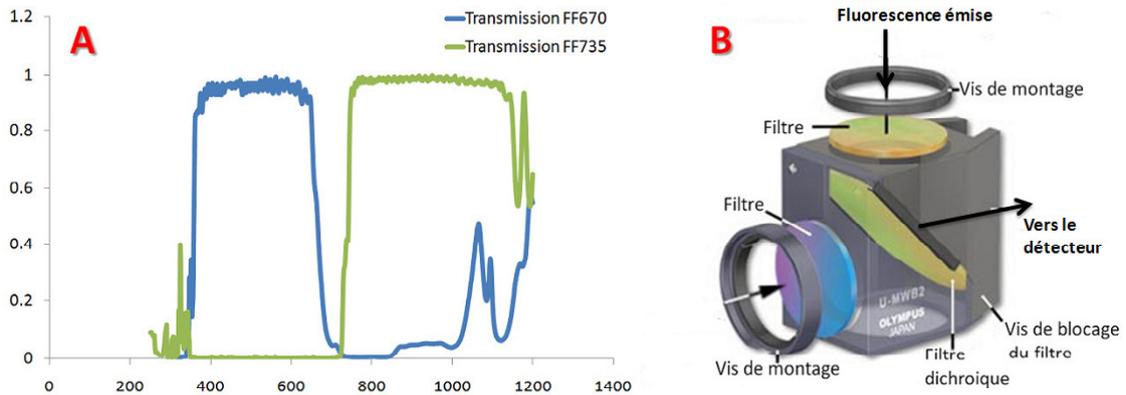


FIGURE 24 – A : spectre de transmission du Semrock FF735 (possédant une densité optique de 6.5 entre 320 et 1120nm) et du Semrock FF670 (avec une densité optique de 6.5 entre 320 et 1120nm). B : Cube à filtres utilisés respectivement pour l'envoi du signal vers le détecteur (FF735) ou l'envoi du faisceau laser excitateur sur l'échantillon (FF670).

La fluorescence collectée par l'objectif de microscope est réfléchiée par un miroir dichroïque (Semrock FF735) vers les détecteurs. Le spectre de transmission de ce filtre est tracé en vert dans la partie A de la figure 24. Le miroir dichroïque transmet les longueurs d'ondes d'excitation mais réfléchit les longueurs d'ondes inférieures ($\lambda < 735\text{nm}$). Ce miroir est monté sur un cube à filtre (voir B, figure 24). Sur cet élément, on peut placer différents filtres additionnels pour couper la lumière excitatrice en excès.

Pour avoir une bonne résolution spatiale, l'objectif de microscope est un élément primordial. Un objectif est défini par deux critères principaux :

- son grossissement,
- son ouverture numérique.

L'ouverture numérique est définie par l'équation suivante :

$$NA = n \times \sin \theta_{max} \quad (28)$$

où n est l'indice de réfraction du milieu situé entre l'objectif et l'échantillon; θ_{max} est l'angle maximal de collection de l'objectif.

Du point de vue de l'excitation de l'échantillon, plus l'ouverture numérique de l'objectif est importante plus la résolution optique sera bonne (voir équation 24). D'un point de vue de la mesure du signal de fluorescence issu de l'échantillon, plus l'ouverture numérique de l'objectif est grande plus grande sera la quantité de lumière collectée par celui-ci. Il y a cependant un compromis à trouver entre taux de collection important et volume sondé important (nombre de molécules sondées).

Lors de nos expériences, nous utilisons un objectif de microscope à fort grossissement (X100 à immersion), avec une ouverture numérique variant entre 0.3 et 1.3; et un objectif de microscope à faible grossissement (X40), avec une ouverture numérique variable (entre 0.4 et 0.6).

Avec ces deux objectifs, nous avons mesuré la taille des spots laser obtenus après focalisation.

A partir de la camera située sur le port gauche du statif de microscope, nous avons mesuré la tâche de diffraction issue de la focalisation du laser et nous l'avons reconstruite sur la figure 25.

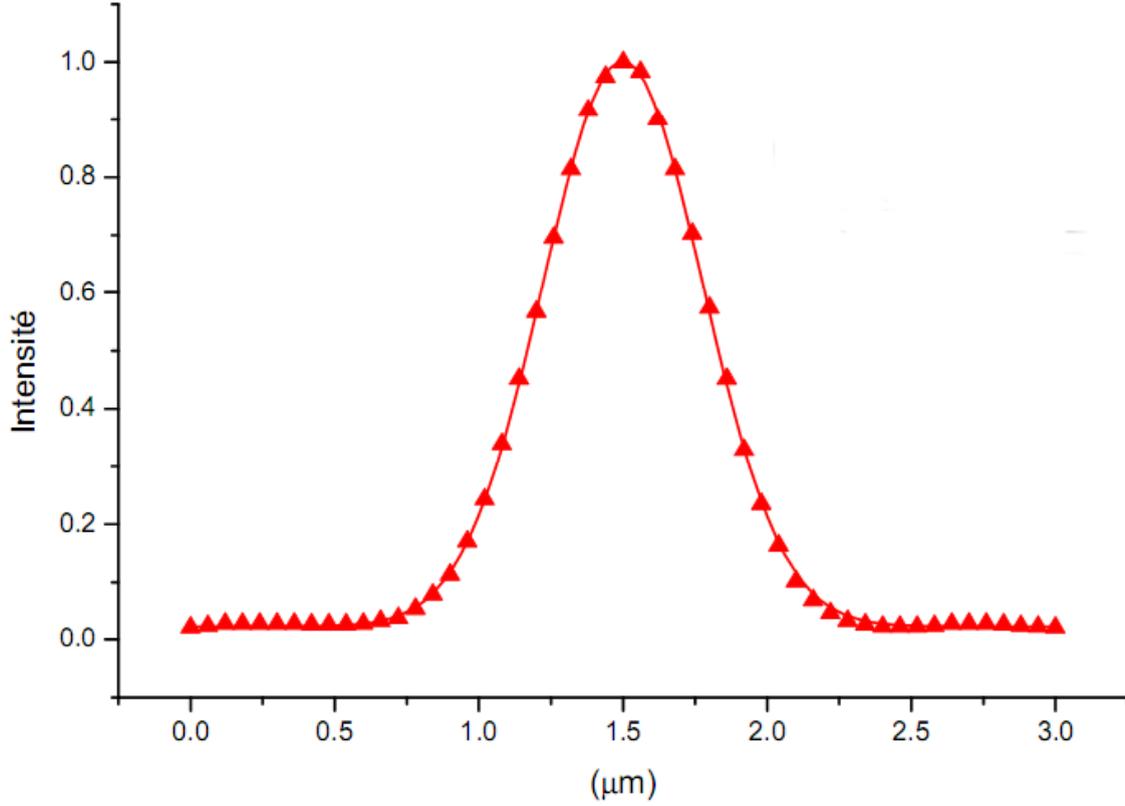


FIGURE 25 – Fonction d'excitation $I(x,y)$ mesurée sur un objectif X100 pour une excitation biphotonique ($\lambda_{exc} = 780nm$).

La fonction d'excitation au carré peut être ajustée par une fonction gaussienne de largeur à $1/e^2$ de $0.55\mu m$. Cette fonction décrit la PSF (voir 1.2). A partir des mesures, nous avons calculé la distance de Rayleigh (Z_0), donnée par la relation suivante :

$$Z_0 = \frac{\pi r_{xy}^2}{\lambda} \quad (29)$$

A la longueur d'excitation ($\lambda = 780nm$), les tailles du spot latéralement (ω_0) et longitudinalement (Z_0) sont résumées pour les deux objectifs de microscope :

$$\omega_{0_{40}} = 1.2\mu m \quad \text{et} \quad Z_{0_{40}} = 5.8\mu m \quad (30)$$

$$\omega_{0_{100}} = 0.55\mu m \quad \text{et} \quad Z_{0_{100}} = 1.21\mu m \quad (31)$$

En sortie du microscope, la fluorescence est focalisée sur le détecteur (CPM ou spectromètre) pour imager un plan donné de l'échantillon utilisée. Pour cela, nous avons choisi une platine de déplacement micro-nanométrique d'OPTOPHASE. Cette platine permet des déplacements en x, y ($500\mu m$) et en z ($250\mu m$) pour l'imagerie en trois dimensions. Avec ce système, on déplace l'échantillon, à l'inverse d'autres systèmes où l'on déplace le faisceau laser via un miroir tournant par exemple. Le principal inconvénient de cette dernière méthode qui utilise des miroirs galvanomé-

triques, est que l'incidence du faisceau varie selon la zone sondée. Le choix de déplacer l'échantillon pour faire de l'imagerie permet de travailler en incidence constante quelle que soit la zone sondée. La principale difficulté dans ce cas est de faire en sorte de limiter au maximum toute défocalisation du faisceau laser suite à la translation de l'échantillon (axe de la platine de l'échantillon à régler en fonction de l'axe du laser).

D'un point de vue pratique, les molécules que nous avons étudiées ont été caractérisées en solution, nous avons plus particulièrement utilisé des cuves de petit volume ($50 \mu\text{l}$), organisées en plaquette (μslide Angiogenesis IBIDI).

4.4 L'émission

La fluorescence collectée par l'objectif est réfléchiée par le filtre dichroïque Semrock FF735. Ce signal est ensuite filtré via différents éléments :

- filtres coupe bande 808E de Semrock,
- filtre coupe bande 785E de Semrock.

La figure 26 présente les spectres de transmission des filtres Semrock 808E et 785E.

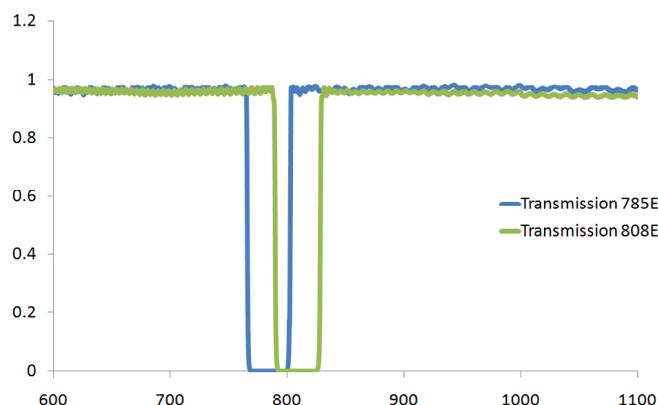


FIGURE 26 – Spectre de transmission des filtres passe-bande 808E et 785E de Semrock (avec une DO de 6.5 entre 750 et 850nm).

En aval de ces filtres, nous disposons une lentille longue focale ($f=200\text{mm}$) afin d'optimiser la collection du signal sur les détecteurs. Le signal est ensuite séparé selon deux voies à l'aide d'une lame séparatrice 50/50 (**13** sur la figure 27). Ainsi l'analyse du signal émis peut se faire soit via un photomultiplicateur (MCP-PMTs Hamamatsu, **16**) devant lequel est disposé un filtre BG40 additionnel; soit via un spectromètre ANDOR via une fibre optique (**14**).

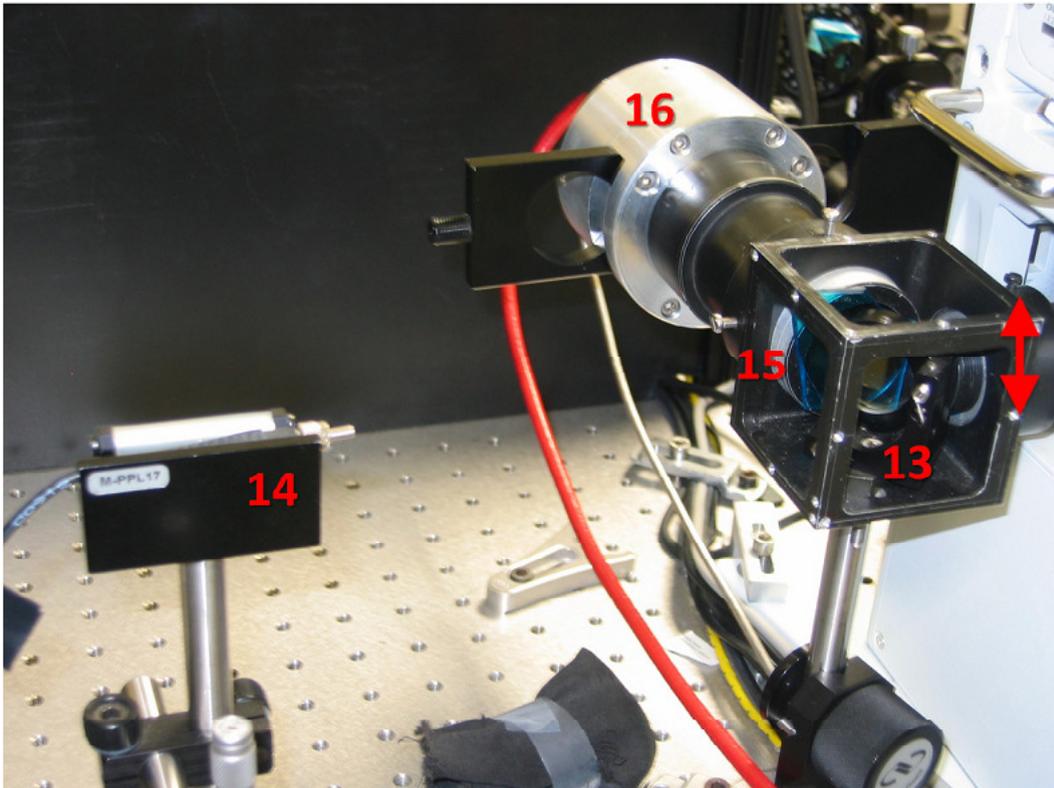


FIGURE 27 – Photographie du montage réalisé pour la détection du signal via la sortie arrière du statif de microscope.

4.4.1 Les détecteurs

Le détecteur a pour rôle de convertir l'information lumineuse en courant électrique mesurable. Il existe deux catégories de détecteurs pour la fluorescence, il y a les capteurs ponctuels, et les capteurs d'images.

Les capteurs ponctuels permettent de mesurer l'intensité lumineuse issue d'un seul point à la fois. Ils doivent être associés à un dispositif de balayage pour former l'image totale du champ du microscope. Ils ont l'avantage d'être extrêmement sensibles mais l'acquisition d'une image peut être extrêmement longue. Dans cette catégorie, il y a les photomultiplicateurs, les photodiodes.

Les capteurs d'images permettent d'obtenir directement une image de tout le champ de vue du microscope. Bien que cela permette une vitesse d'acquisition d'image supérieure, cette capacité est accompagnée d'une plus faible sensibilité que les capteurs ponctuels. Pour ce type de détecteur, les exemples les plus connus sont les tubes vidéo, les caméras de photodiodes, les caméras CCD (Charged Coupled Device).

Pour la caractérisation des molécules auxquelles nous nous sommes intéressées, nous avons choisi d'utiliser un capteur ponctuel. Notre choix s'est porté sur le modèle de photomultiplicateur MCP-PMTs R38090U-52 de Hamamatsu.

Ce type de détecteur présente l'avantage de disposer d'un temps de montée extrêmement court (Response Time 162ps) et d'une grande sensibilité (coefficient de détection de la photocathode : $QE=20$ à 2% de 350nm à 750nm) aux longueurs d'ondes de fluorescence des molécules étudiées, d'un gain important, d'un faible nombre de coup dans le noir (dark count 10cps) et d'une distribution

d'intensité d'impulsion stable (Pulse Height Distribution). La structure du MCP-PMTS est définie par la figure 28.

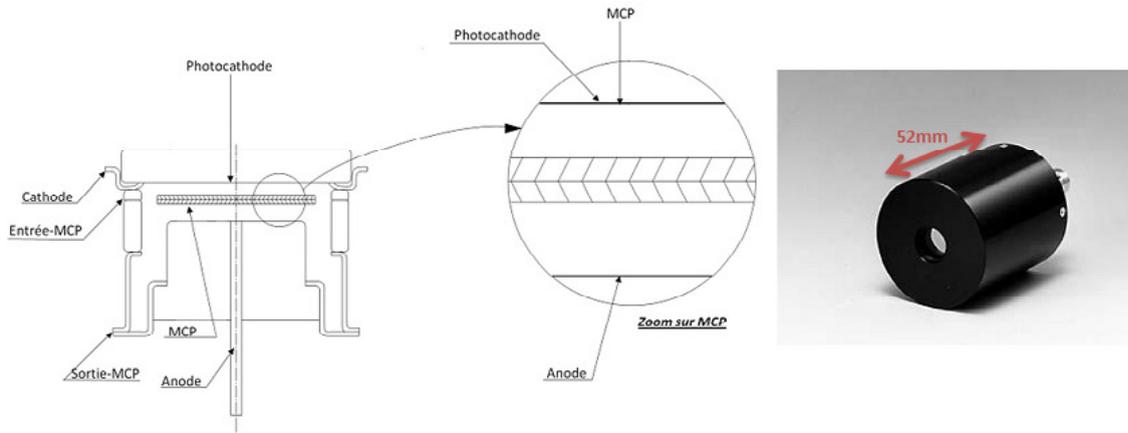


FIGURE 28 – Structure et photographie d'un détecteur de type MCP-PMTs [Hamamatsu].

Comme le montre la figure 28, un détecteur MCP-PMTs est composé de plusieurs parties :

- une fenêtre d'entrée,
- une photocathode,
- une galette de microcanaux,
- une anode.

Il existe différents matériaux pour la photocathode, chacun correspond à un rendement spécifique dans une gamme de longueurs d'ondes précise. Pour une gamme allant de 115nm à 850nm, la photocathode est réalisée avec des matériaux "multi-alcalins" alors que pour les longueurs d'onde allant de 160nm à 650nm la photocathode est en "bi-alcalins". Le MCP-PMTs utilisé est un modèle de marque HAMAMATSU, R38090U-52, avec une gamme de travail entre 160nm et 650nm. Sa tension d'alimentation est de $-3000V$ (alimentation ORTEC 556) et la tension de sortie est typiquement de quelques millivolts.

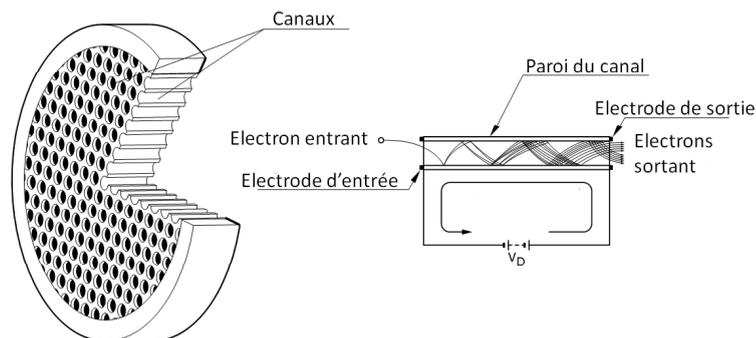


FIGURE 29 – Principe de fonctionnement d'un tube de microcanaux [Hamamatsu].

Un MCP-PMTS est constitué d'un ensemble de microcanaux (voir figure 29). Chaque microcanal a un diamètre de quelques microns ($6\mu m$), et il agit comme un multiplicateur d'électrons.

Lorsqu'un photon "percute" la photodiode du détecteur, il y a émission d'un électron. Ensuite, cet électron "percute" les parois du tube, il y a émission de deux électrons. Ce processus est répété de nombreuses fois jusqu'à générer un nombre d'électrons mesurable en sortie du microcanal. Ces électrons sont accélérés par le champ électrique appliqué entre l'entrée et la sortie du microcanal.

Les galettes de microcanaux disposent de nombreux avantages :

- un gain important pour une petite taille (10^3 à 10^6),
- un temps de réponse rapide (temps de montée 150ps),
- une grande stabilité, même en présence d'un champ électromagnétique.

Dans le cas de MCP-PMTs, deux galettes de microcanaux sont superposées afin d'obtenir un gain suffisant et un encombrement très faible (voir le schéma du détecteur figure 28).

Les mesures de spectres de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Andor DU401-BR-DD. La fluorescence est focalisée sur une fibre optique puis dispersée sur un réseau. Après dispersion, le signal est analysé via une camera CCD 1024×128 pouvant être refroidie (-100°C). L'efficacité quantique maximale du détecteur à -100°C est autour de 90% 350 à 750 nm.

Comme nous en avons discuté précédemment, au delà de la mesure de l'intensité et du spectre de la fluorescence, il est également primordial de pouvoir mesurer la durée de vie de fluorescence. A partir du dispositif expérimental précédemment décrit, nous avons réalisé la mise en œuvre pratique de mesures corrélées en temps via différents modules (logiciel d'acquisition et de contrôle de l'expérience).

4.5 Principe et Réalisation

Comme nous l'avons précédemment brièvement décrit (voir paragraphe 3.3), la technique de comptage de photons corrélé en temps consiste à exciter le fluorophore dans des conditions où l'on ne détecte qu'un seul photon de fluorescence. On procède pour cela à une excitation du fluorophore par une impulsion laser d'intensité restreinte qui a une largeur suffisamment courte (usuellement quelques femtosecondes) et un taux de répétition élevé (quelques Mhz). Chaque impulsion excitatrice représente un signal dit de "START". Dès qu'un photon est détecté, il génère un signal dit de "STOP". Pour chaque photon de fluorescence détecté, on mesure le temps entre la dernière impulsion d'excitation laser et le photon de fluorescence. L'intervalle de temps mesuré entre l'impulsion initiale et la détection du photon de fluorescence correspond au temps passé par une molécule dans son état excité. En réalisant, l'histogramme de ces différences de temps sur un grand nombre d'évènements, on recrée la fonction de décroissance de durée de vie de la fluorescence [48], comme schématiquement représenté sur la figure 30.

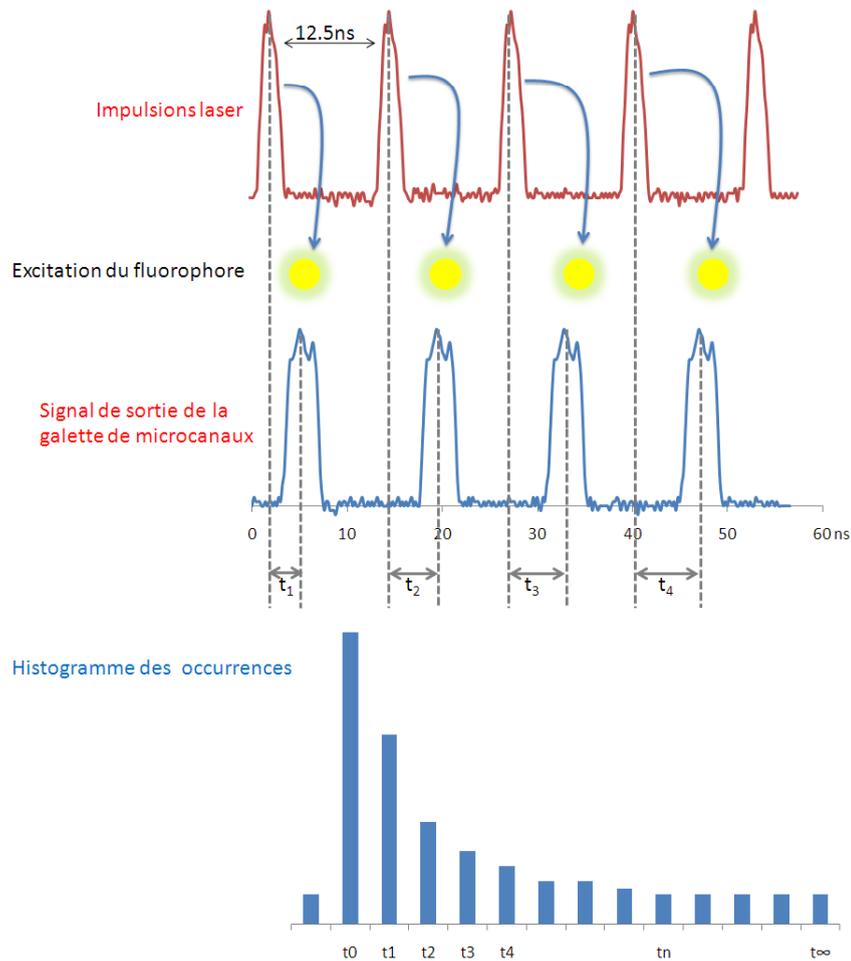


FIGURE 30 – Illustration schématique du principe du comptage de photons corrélés en temps [49].

Ce type d'expérience nécessite l'utilisation de matériaux optiques et électroniques spécifiques. La conversion des signaux optiques en signaux électriques doit conserver une excellente précision temporelle. Le système est décrit par la figure 31.

L'entré START correspond au signal de synchronisation des mesures, il est enregistré par une photodiode rapide. Pour ce faire, après le deuxième polariseur (4 sur la figure 22) nous prélevons une partie du faisceau via une lame séparatrice. Ce signal est envoyé sur une photodiode (SFH 213 d'OSRAM Opto Semiconductors), montée en mode rapide, c'est à dire que le montage est optimisé pour que la photodiode ait le temps de réponse le plus rapide (temps de montée de 5ns, ce montage est détaillé dans l'annexe A.1).

Le STOP. Après réception d'un photon de fluorescence, le MCP-PMTs génère une impulsion électrique.

Un convertisseur temps-amplitude (Time-Amplitude converter : TAC) est utilisé pour mesurer l'intervalle de temps entre les deux impulsions START et STOP. Il génère une impulsion dont l'amplitude est proportionnelle à la durée de temps écoulé. En pratique, lorsque le TAC reçoit une impulsion de START, des condensateurs se chargent. Quand le TAC reçoit une impulsion STOP, la charge des condensateurs s'interrompt. La tension finale existant aux bornes des condensateurs

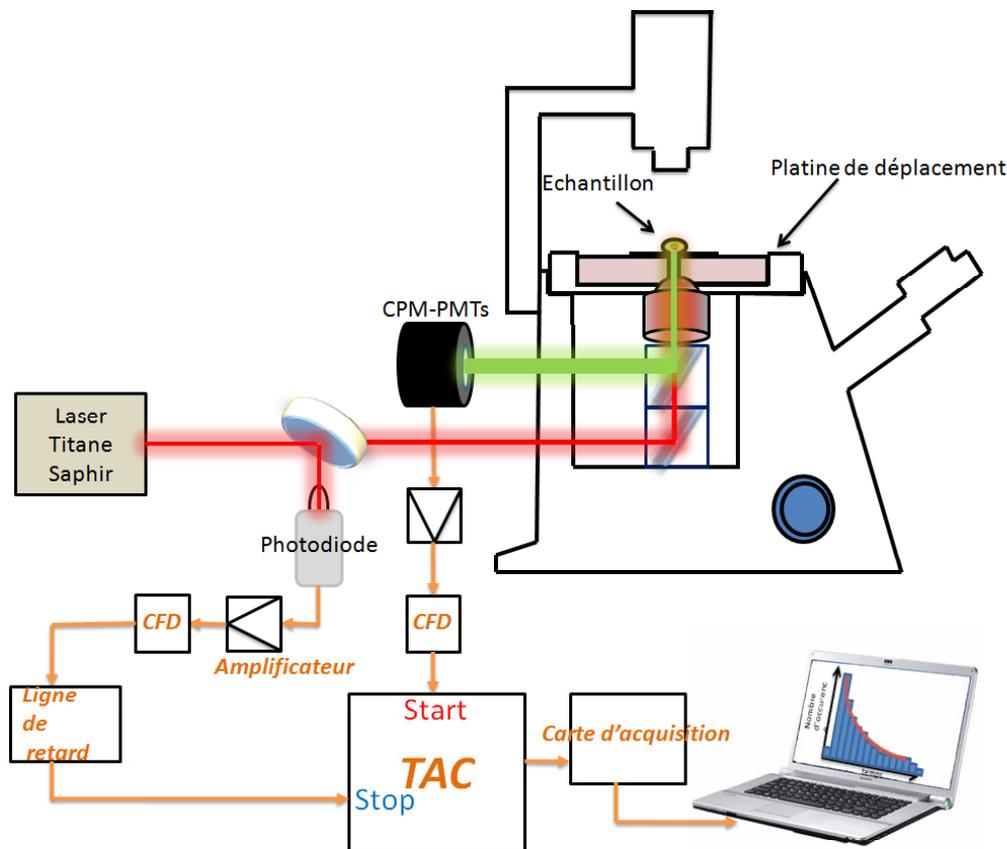


FIGURE 31 – Composition du système de mesure de photons corrélés en temps. TAC : Times-Amplitude Converter, CFD : Constant Fraction Discriminator

est proportionnelle à l'intervalle de temps entre les deux impulsions. Les condensateurs ont une réponse linéaire sur la gamme temporelle choisie. Cette gamme temporelle peut se modifier, à l'aide d'un sélecteur, et s'étend de 50 ns à 2 ms. Pour l'ensemble de nos expériences, l'intervalle de temps maximal a été réglé sur 50 ns. Lorsque le TAC ne reçoit pas d'impulsion de STOP avant la limite de temps maximale (ici 50 ns) alors il génère une impulsion de remise à zéro. Un des éléments les plus importants dans un TAC est le temps de conversion entre le START et le STOP. C'est le temps pendant lequel le TAC ne peut effectuer d'opération.

Il existe plus précisément deux modes de comptage de photons corrélé en temps : le mode normal et le mode inversé.

- Dans le mode normal, le START est généré par l'impulsion responsable de l'excitation du fluorophore et le STOP est généré par l'impulsion liée au photon de fluorescence émis par la molécule. Lorsque la fréquence d'excitation est trop élevée, il se peut qu'il n'y ait pas émission d'un photon de fluorescence. Dans ce cas, le TAC commence à se charger et ne s'arrête pas. Ainsi, le TAC passera la plupart du temps à faire des conversions qui ne seront jamais complètes puisqu'un photon de fluorescence peut ne pas être généré à chaque impulsion excitatrice. Par ce mode dit normal, un grand nombre de mesures ne seront pas enregistrées.
- Dans le mode inversé, le START est généré par l'impulsion liée au photon de fluorescence et le STOP est synchronisé sur la source excitatrice. Dans ce cas, on est sûr que chaque photon de fluorescence est généré par une impulsion laser. Ce mode est compatible avec l'utilisation de lasers à haute fréquence. Le TAC ne mesure que des conversions complètes. Nous avons

choisi ce mode dit "inversé" pour l'ensemble de nos expériences.

Si nous avons des impulsions idéales, chaque impulsion serait prise en compte par le TAC. Malheureusement, les impulsions générées par le MCP-PMTs sont bruitées et nécessitent l'utilisation d'un discriminateur pour sélectionner les impulsions uniquement issues de la détection d'un photon de fluorescence de celles issues d'un bruit de fond parasite. Un détecteur de type MCP-PMTs dispose d'un faible nombre de coups en absence de lumière (dark count). De par le processus de mise en forme du signal de sortie de l'appareil ceux-ci ont une impulsion caractéristique. Le discriminateur (CFD) permet de sélectionner le seuil au-delà duquel on considère que l'impulsion de sortie de l'appareil est issue de l'amplification d'un photon de fluorescence. Dans cette expérience, nous utilisons deux discriminateurs différents : un discriminateur à fraction constante (Constant Fraction Discriminator) pour traiter les impulsions liées au prélèvement du faisceau laser d'excitation et un discriminateur à résolution sub-nanoseconde (Pico-Timing Discriminator 9307 ORTEC) pour traiter les impulsions provenant de la détection du signal via le MCP-PMTs. Les modes de fonctionnement de ces discriminateurs sont détaillés dans l'annexe B.

4.6 Logiciel d'acquisition

En ce qui concerne le traitement et l'acquisition des données, on utilise un logiciel maison, celui-ci a été réalisé en langage C++ par Fabrice Charra. A titre indicatif, l'interface du logiciel est représentée sur la figure 32. Outre les acquisitions de durées de vie de fluorescence, ce logiciel est également utilisé pour piloter divers éléments permettant notamment de modifier à distance la puissance et la polarisation du faisceau incident sur l'échantillon. Il peut aussi piloter le déplacement nanométrique latéral et vertical de l'échantillon. Le balayage d'une zone spécifique a plus particulièrement été implémenté dans le logiciel.

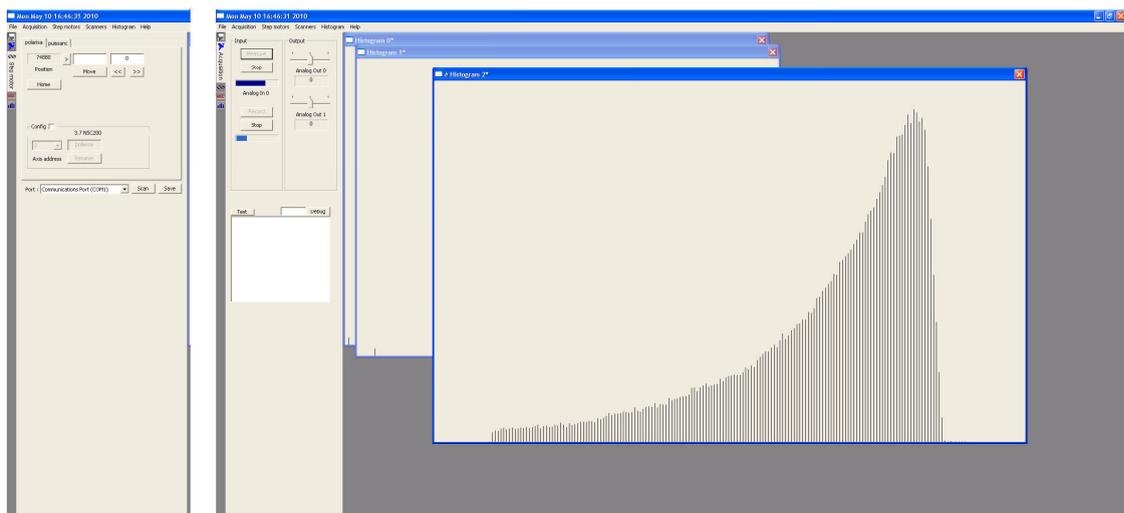


FIGURE 32 – Interface du logiciel développé par Fabrice Charra. Différents onglets permettent de piloter la polarisation et la puissance incidente.

4.7 Réponse instrumentale

Pour obtenir la décroissance de fluorescence de l'espèce observée, il est nécessaire de déconvoluer la fonction d'appareil de la mesure expérimentale. La fonction d'appareil est mesurée en collectant le signal d'un échantillon présentant une réponse instantanée à l'excitation laser. Ainsi, nous avons étudié différentes possibilités. Dans un premier temps, nous avons utilisé la mesure du signal de seconde harmonique d'un polymère de polydisperse-red 1 préalablement orienté. Nous avons également utilisé le signal issu de la réflexion du faisceau laser par un miroir d'or, ou le signal issu de la diffusion du laser par une solution colloïdale de silice. Ces trois mesures ont donné une fonction de réponse instrumentale analogue, dont un exemple est donné figure 33.

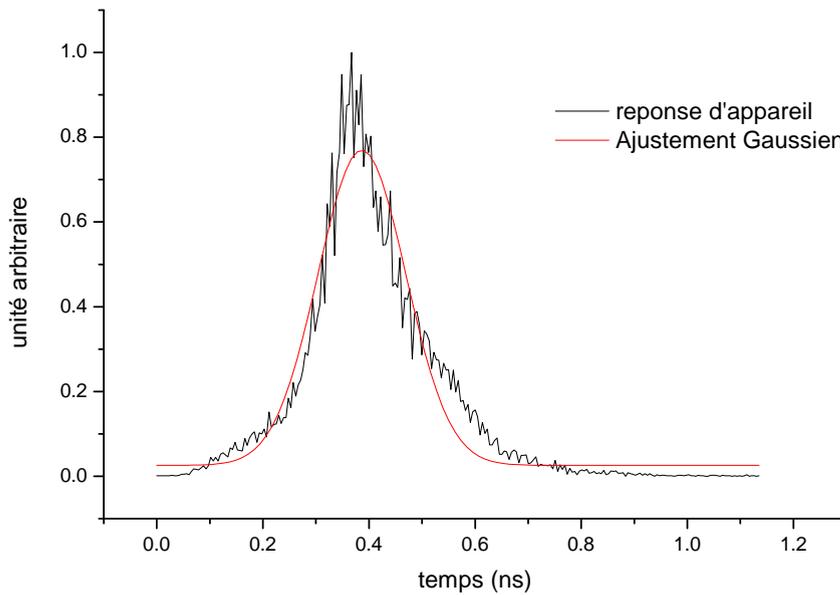


FIGURE 33 – Fonction de réponse de l'appareil.

La fonction d'appareil a été ajustée à l'aide d'une fonction gaussienne d'équation.

$$y = y_0 + \frac{A}{\omega\sqrt{\pi/2}} e^{-2\left(\frac{x-x_c}{\omega}\right)^2} \quad (32)$$

Sur la figure 33, on remarque une légère asymétrie de la courbe. Celle-ci est étroitement liée aux propriétés de fonctionnement du discriminateur à fraction constante et ne peut être totalement corrigée. L'ajustement de la réponse d'appareil par cette gaussienne, nous donne une largeur à mi-hauteur de 200ps. Cela correspond à la durée minimum que nous pouvons mesurer avec ce système. Les durées de vie inférieures ne pourront être déconvoluées de la réponse de l'appareil. Les fonction de durée de vie de fluorescence ont été déconvoluées de la réponse d'appareil par le logiciel "Fit34afh" développé par le Dr. Gustavsson (CEA, Laboratoire F. Perrin).

4.8 Validation expérimentale du banc de mesure

En vue de valider notre banc expérimental, nous avons mesuré la durée de vie de fluorphores de référence. Nous avons plus particulièrement considéré des molécules telles que la Fluorescéine et la Rhodamine 6G. Mais aussi, celle de mélange Fluorescéine-Rhodamine B dans l'eau. Les structures chimiques de la Rhodamine 6G et des formes cationiques de la Fluorescéine et de la Rhodamine B sont données figure 34. Ces expériences ont été réalisées à une longueur d'onde d'excitation fixée $\lambda_{exc} = 840nm$ et à une puissance crête de $1GW/cm^2$.

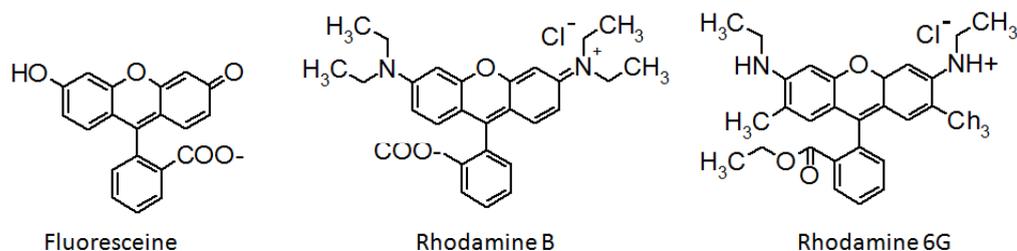


FIGURE 34 – Structure chimique de la Rhodamine 6G et des formes cationiques de la Fluorescéine et de la Rhodamine B.

4.8.1 La Fluorescéine dans l'eau à pH 11

La première molécule que nous avons considérée est la molécule de Fluorescéine dans une solution d'eau à pH basique (dans ce cas, la Fluorescéine est sous sa forme cationique comme représentée sur la figure 34). Pour ce faire, la Fluorescéine a été dissoute dans une solution d'eau, à laquelle on a ajouté quelques gouttes de solution de soude. Selon la littérature, dans ces conditions, la durée de vie de la molécule de Fluorescéine est d'environ 4 ns [50].

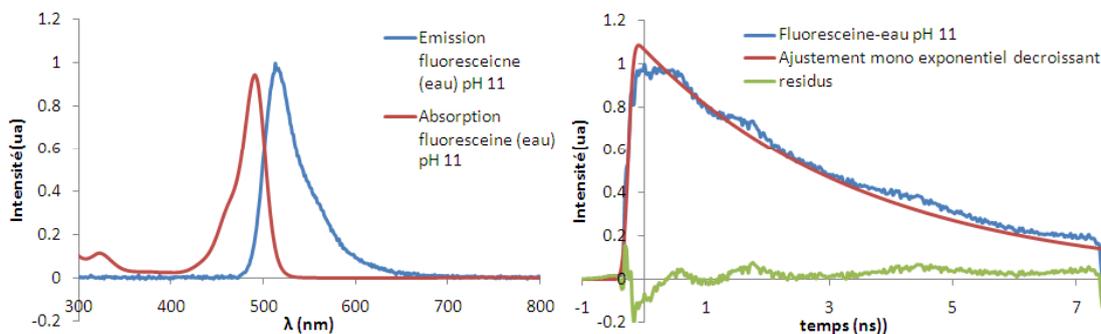


FIGURE 35 – Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine dans l'eau (pH 11), $C = 4.3 \cdot 10^{-5} mol.L^{-1}$. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.

Les expériences réalisées permettent d'évaluer une durée de vie de fluorescence de la fluorescéine en solution aqueuse de 3.95 ns.

4.8.2 La Rhodamine 6G dans l'éthanol

De la même façon, nous avons évalué la durée de vie de fluorescence de la Rhodamine 6G dans l'éthanol ($C=3.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

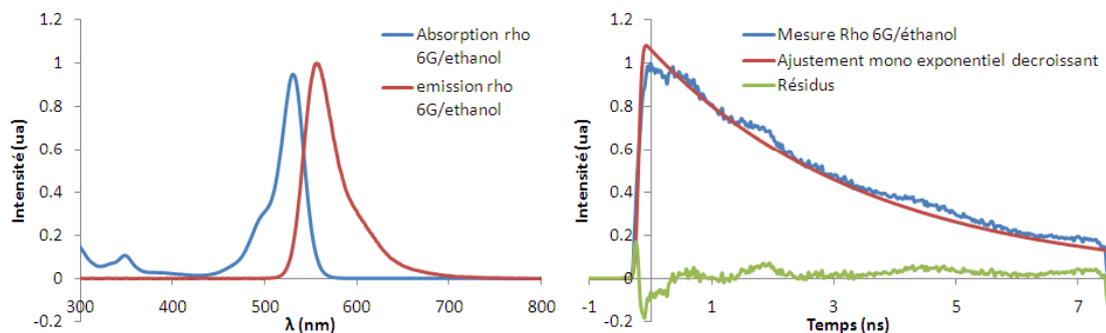


FIGURE 36 – Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine 6G dans l'éthanol, $C= 3.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.

Nous avons mesuré une durée de vie de fluorescence de 3.82 ns ce qui est en accord avec la valeur publiée dans la littérature de 3.99 ns [50].

4.8.3 La Rhodamine B dans l'eau

De la même façon, nous avons mesuré la durée de vie de la rhodamine B [$3.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] dans l'eau (pH 11). Ses spectres d'absorption et d'émission sont indiqués sur la figure 37.

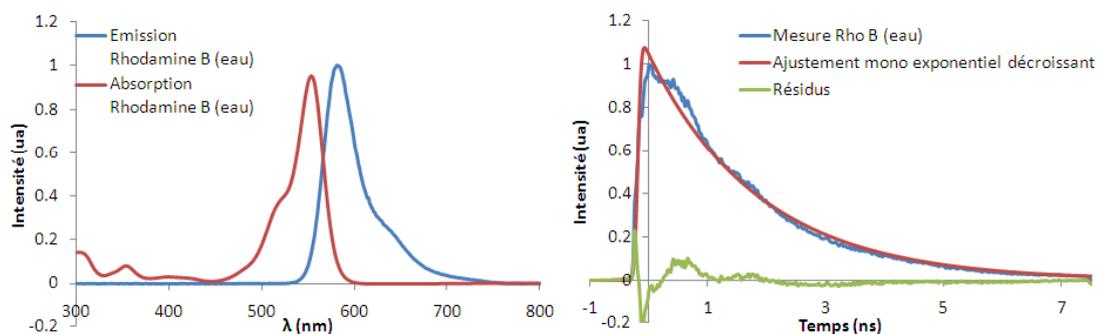


FIGURE 37 – Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine B, $C=3.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, dans l'eau (pH 11). Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.

La durée de vie mesurée, après déconvolution de la réponse d'appareil, est de 1.9ns ce qui est de nouveau en accord avec la durée de vie figurant dans la littérature : 1.73ns [51]).

Avec notre système, les mesures de durée de vie de fluorescence des composés de références sont conformes aux mesures publiées dans la littérature. La deuxième vérification consiste à tester la capacité de notre système à séparer les contributions correspondant à deux fluorophores ayant des

durées de vie de fluorescence proches.

4.8.4 Mélange de Fluorescéine et de Rhodamine B

A titre d'expérience de caractérisation complémentaire, nous avons mesuré la durée de vie de fluorescence d'un mélange de deux espèces possédant des durées de vie proches en solution aqueuse, la Fluorescéine et la Rhodamine B.

Dans un premier temps, nous avons fait un mélange équimolaire de Fluorescéine et de Rhodamine B dans une solution d'eau (pH 11).

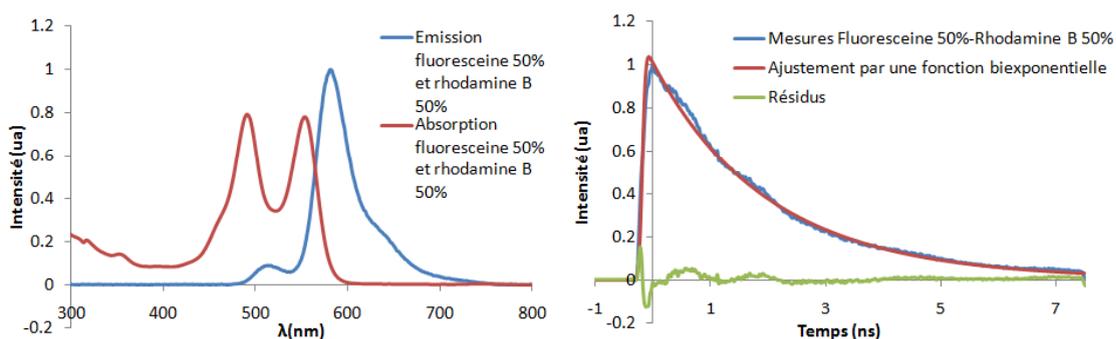


FIGURE 38 – Spectres d'absorption et d'émission d'une solution d'eau (pH11) contenant la même quantité de Fluorescéine [$2.25 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] et de Rhodamine B [$2.03 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$]. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.

On remarque sur le spectre d'absorption que les pics d'absorptions de chaque espèce sont bien séparés. Celui de la Fluorescéine à 494nm et celui de la Rhodamine B à 554nm. Ces deux pics d'absorption présentent des intensités comparables. Les ϵ de ces deux espèces étant similaires ($\epsilon_{\text{fluoresceine}} = 93000$, $\epsilon_{\text{rhodamineB}} = 113000$) ceci confirme que la concentration en Fluorescéine [$2.25 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] est globalement identique à celle de la Rhodamine B [$2.03 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$]. Mais le spectre d'émission du mélange laisse principalement apparaître celui de la Rhodamine B. On remarque quand même un léger épaulement du spectre de fluorescence (vers le bleu) qui doit correspondre à la Fluorescéine. La fluorescence de la Fluorescéine est vraisemblablement masquée par l'absorption de la Rhodamine B.

l'analyse du signal émis laisse apparaître deux contributions de durée de vie de fluorescence ($\tau_{f_1} = 3.95 \text{ ns}$) et ($\tau_{f_2} = 1.9 \text{ ns}$) qui correspondent aux durées de vie mesurées précédemment, on remarque cependant que la part relative de ces contributions ne correspond pas au rapport des concentrations : $A_1 = 0.09$ et $A_2 = 0.91$ Où les coefficients A_1 et A_2 représentent le poids relatif des différentes contributions du signal (voir equation 33) ne sont pas égaux à 0.5.

$$I_f(t) = A_1 e^{\left(-\frac{t}{\tau_{f_1}}\right)} + A_2 e^{\left(-\frac{t}{\tau_{f_2}}\right)} \quad (33)$$

Avec des concentrations telles que $C_1 = C_2 = 0.5$, on aurait pu s'attendre à $A_1 = A_2 = 0.5$, or on mesure A_1 qui est égal à 0.09 et A_2 égal à 0.91. Pour obtenir une valeurs d'environ 0.5 pour chaque coefficient, nous devons modifier les concentrations de chaque espèce : il faut notamment

utiliser une solution contenant 83% de Fluorescéine [$49.1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$] et 17% de Rhodamine B [$7.42 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$].

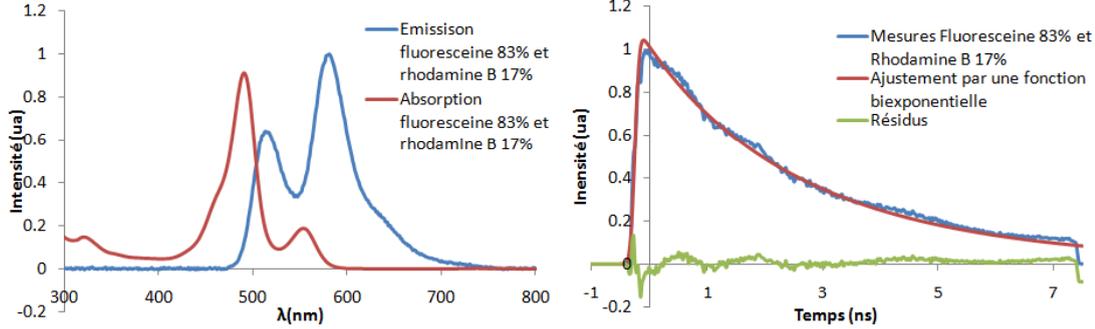


FIGURE 39 – Spectre d'absorption et d'émission d'une solution d'eau (pH11) contenant 83% Fluorescéine [$49.1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$] et 17% Rhodamine B [$7.42 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$]. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.

Si l'on considère le mélange de deux espèces le signal émis peut se mettre sous la forme : $I(t) = I_1(t) + I_2(t) \propto \phi_1 C_1 \sigma_{2p1} e^{-t/\tau_1} + \phi_2 C_2 \sigma_{2p2} e^{-t/\tau_2}$. Le rapport $\frac{A_1}{A_2}$ correspond donc à $\frac{A_1}{A_2} = \frac{\phi_1 C_1 \sigma_{2p1}}{\phi_2 C_2 \sigma_{2p2}}$. Nous avons réalisé des mesures à différentes concentrations de Fluorescéine et de Rhodamine B. Nous avons résumé les coefficients A_1 et A_2 obtenus pour différentes concentrations dans le tableau 3.

TABLE 3 – Coefficients A_1 et A_2 lors d'ajustement par une fonction biexponentielle des déclins de fluorescence des mélanges Fluorescéine/Rhodamine B.

	A_1	τ_{f1} (ns)	A_2	τ_{f2} (ns)	$\frac{A_1}{A_2}$	$\frac{C_1}{C_2}$
1^{ieme} solution	0	3.95	1	1.9	0	0.14
2^{ieme} solution	0	3.95	1	1.9	0	0.5
3^{ieme} solution	0.09	3.95	0.91	1.9	0.01	1
4^{ieme} solution	0.32	3.95	0.68	1.9	0.47	2
5^{ieme} solution	0.5	3.95	0.5	1.9	1	4.9

En observant ce tableau, on remarque que les valeurs des coefficients A_1 et A_2 suivent globalement les variations des concentrations en Fluorescéine et en Rhodamine B (voir figure 40).

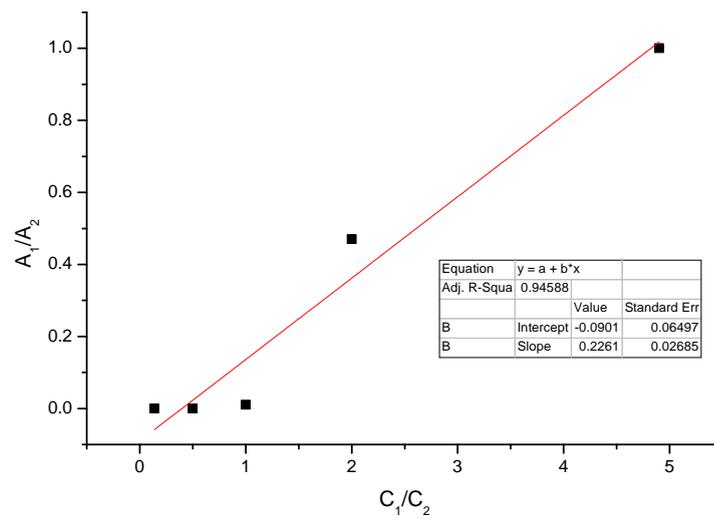


FIGURE 40 – Rapport des coefficients A_1/A_2 en fonction du rapport des concentrations C_1/C_2 .

On remarque qu'il y a une relation linéaire entre ces deux rapports. Néanmoins, à faible concentration de Fluorescéine, on a un signal très majoritairement issu de la Rhodamine B. De plus, on ne voit la composante A_1 liée à la Fluorescéine qu'à partir du moment où le ratio Fluorescéine/Rhodamine B est de 50/50. Lorsque l'on regarde le spectre d'absorption de la Rhodamine B et le spectre d'émission de la Fluorescéine, on observe un recouvrement important des spectres (voir figure 41).

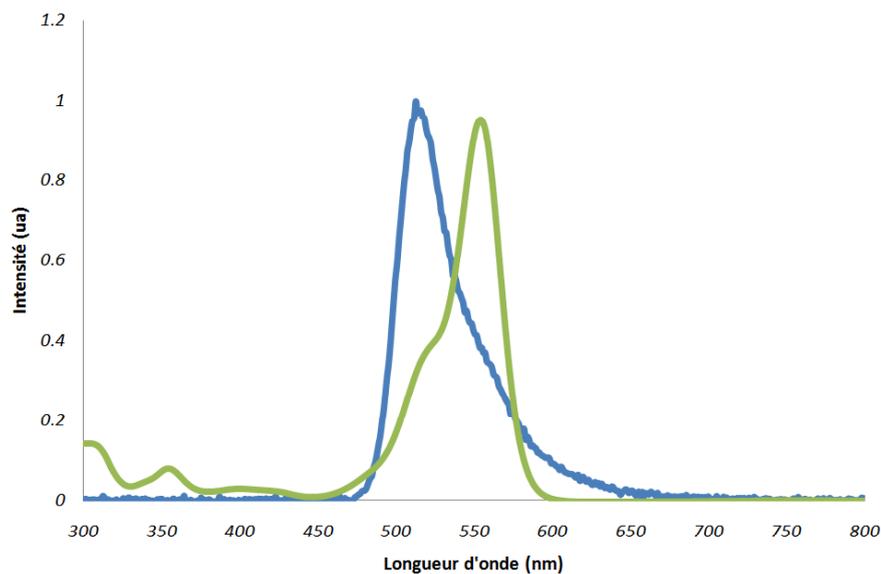


FIGURE 41 – Spectre d'absorption de la Rhodamine B (en vert) dans l'eau (pH 11) et le spectre d'émission de la Fluorescéine (en bleu) dans l'eau (pH 11).

Ce recouvrement confirme qu'une partie des photons émis par la Fluorescéine est réabsorbée par la Rhodamine B. A faible concentration en Fluorescéine, on observe une réabsorption quasi-

totale du signal par la Rhodamine B. A plus forte concentration en Fluorescéine, on retrouve la relation de proportionnalité entre les concentrations (C_1 et C_2) et les coefficients A_1 et A_2 . Il serait intéressant d'effectuer ce type d'expérience avec une molécule, autre que la Rhodamine B, qui aurait un spectre d'absorption décalé vers le rouge pour éviter les problèmes de réabsorption.

Grâce à notre système, nous pouvons mesurer la fluorescence émise suite à l'absorption de deux photons. Nous avons accès à la fluorescence statique mais aussi à la fluorescence résolues en temps.

5 Anisotropie de fluorescence

Quand une molécule est excitée avec une lumière polarisée linéairement, la lumière émise est polarisée dans des directions qui dépendent de :

- l'éventuelle différence d'orientation entre moment dipolaire d'absorption et d'émission.
- l'orientation initiale, la rotation et/ou la déformation de la molécule pendant le temps qui sépare l'absorption de l'émission ;

C'est ce dernier aspect qui est le plus intéressant car il donne des informations sur la mobilité, la taille, la forme, la flexibilité, et l'environnement des molécules sondées. Il faut d'ailleurs y ajouter la possibilité de transfert d'excitation de la molécule initialement excitée vers une molécule "accepteur" (Transfert d'Énergie de Fluorescence : FRET).

Grâce à ce type de mesures, on observe la dynamique des fluorophores, même si cette dynamique est plus rapide que la durée de vie de fluorescence du fluorophore. Cependant, il faut qu'elle soit plus lente que la fréquence d'acquisition du signal.

La désexcitation des fluorophores par rotation est le facteur dominant de la dépolarisation, et différentes applications dépendent des changements du taux de rotation. La mesure d'anisotropie de fluorescence est un outil intéressant pour étudier la fluidité et l'orientation de molécules organisées (cristaux liquides, micelles...). Cette technique est aussi très utile pour observer la mobilité de polymères ou d'anticorps. Dans le milieu biologique, l'anisotropie de fluorescence est utilisée pour l'étude de membranes biologiques, mais aussi pour l'étude de l'interaction ADN-protéines, et dans l'immunologie où l'on étudie les réactions antigène-anticorps. L'analyse de l'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire ne peut se faire que si la direction de polarisation de la lumière émise reste constante pendant toute la durée du phénomène étudié.

5.1 Origine de l'anisotropie de fluorescence : la photoselection

Lorsqu'une population de fluorophores est illuminée par une lumière polarisée linéairement, celles dont le moment de transition est orienté dans une direction proche du champ électrique, sont préférentiellement excitées. C'est ce qu'on appelle la photoselection. N'importe quel changement de direction du moment de transition durant la durée de vie de l'état excité va impliquer une diminution de l'anisotropie, ce qui va induire une dépolarisation totale ou partielle de la fluorescence.

5.1.1 Définition

Du point de vue intensité du signal de fluorescence, l'état de polarisation de la fluorescence est caractérisé par un paramètre : r , l'anisotropie d'émission.

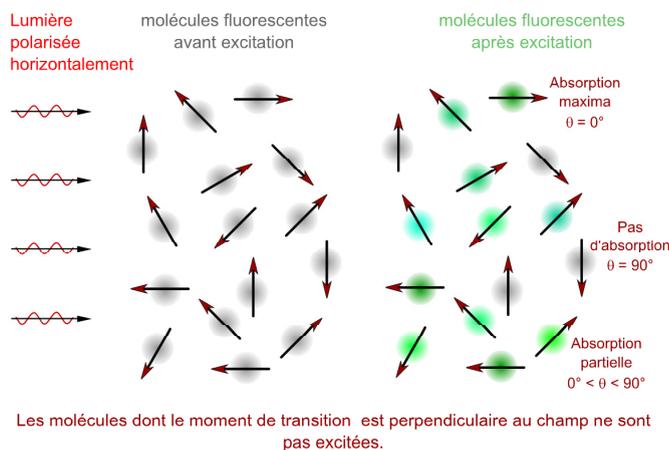


FIGURE 42 – Photoselection [52].

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (34)$$

Où I_{\parallel} et I_{\perp} sont les intensités de signal émis selon la direction \parallel ou \perp à la polarisation incidente. Ces quantités sont définies par :

$$I_{\parallel} = \int \int N(\theta, \varphi) \|\vec{e} \cdot \vec{\mu}_{0 \rightarrow i}\|^{2n} \|\vec{e} \cdot \vec{\mu}_{i \rightarrow 0}\|^2 d\Omega \quad (35)$$

$$I_{\perp} = \int \int N(\theta, \varphi) \|\vec{e} \cdot \vec{\mu}_{0 \rightarrow i}\|^{2n} \|\vec{e}_{\perp} \cdot \vec{\mu}_{i \rightarrow 0}\|^2 d\Omega$$

Où $N(\theta, \varphi)$ est la distribution moléculaire, \vec{e} , le vecteur correspondant à la direction de la polarisation incidente, $\vec{\mu}_{0 \rightarrow i}$ le moment dipolaire de transition de l'état initial vers l'état excité i et $\vec{\mu}_{i \rightarrow 0}$ le moment dipolaire de transition d'un état excité i vers l'état fondamental. Le coefficient n est lié aux processus d'absorption. Ainsi, si l'on considère un processus d'absorption à un photon $n=1$, deux photons $n=2$ et trois photons $n=3$.

5.1.2 Calcul dans le cas de composés dipolaires

Si l'on se limite au cas de composés uniaxiaux et que l'on considère une population de N molécules orientées aléatoirement et excitées au temps zéro par une impulsion lumineuse polarisée selon l'axe Oz , le calcul de r s'effectue aisément. Au temps t , le moment dipolaire de transition d'émission $\vec{\mu}_{0 \rightarrow i}$ de la molécule excitée a une distribution angulaire. L'orientation de ce moment de transition est caractérisée par un angle θ (selon l'axe Oz) et l'angle φ (voir figure 43).

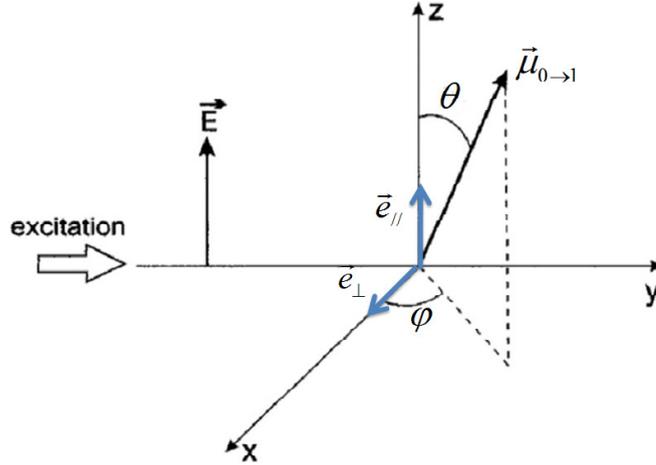


FIGURE 43 – Système de coordonnées caractérisant l'orientation du moment de transition d'émission $\vec{\mu}_{0 \rightarrow i}$.

On projette I_{\perp} et I_{\parallel} sur les trois axes $0x$, $0y$, $0z$. Selon les formules données à l'équation 35, si on considère une distribution isotrope, $N(\theta, \varphi) = \text{constante}$ et que l'on intègre selon l'angle solide, on obtient :

$$I_{\perp} = \frac{1}{(2n+1)(2n+3)} \quad (36)$$

$$I_{\parallel} = \frac{1}{(2n+1)}$$

Ainsi, l'anisotropie de fluorescence s'écrit sous la forme :

$$\begin{aligned} r(t) &= \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)} \\ &= \frac{2n}{2n+3} \end{aligned} \quad (37)$$

Si l'absorption est monophotonique ($n=1$) alors l'anisotropie fondamentale r_{01} est égale à $2/5$. Si l'absorption est biphotonique ($n=2$) alors l'anisotropie fondamentale r_{02} est égale à $4/7$.

La figure 44 présente les distributions d'orientation des populations de molécules excitées par un, deux et trois photons. On notera que plus le processus d'absorption est multiphotonique, plus la photosélection est étroite.

En pratique, la polarisation mesurée n'est jamais égale à l'anisotropie fondamentale. Il existe divers processus de dépolarisation de la fluorescence, comme nous le discuterons ci-dessous.

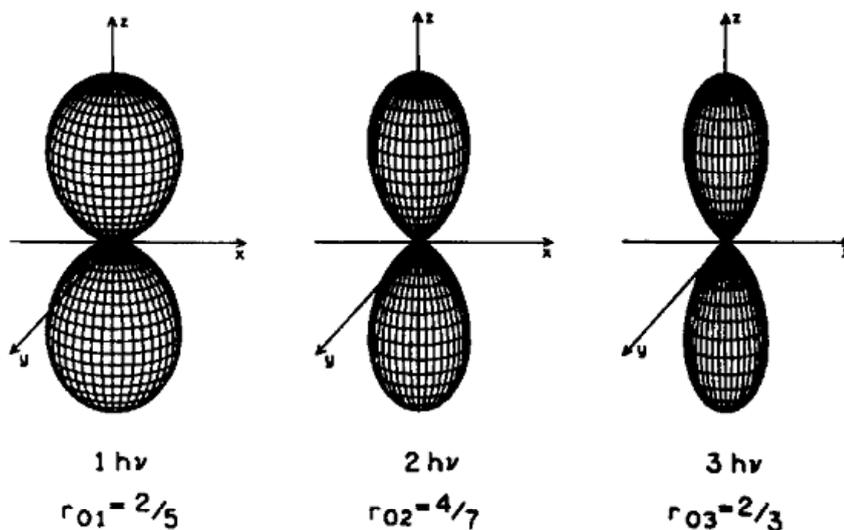


FIGURE 44 – Distribution de l'orientation de la population de l'état excité par un, deux et trois photons [23].

5.2 Dépolarisation de la fluorescence

Il existe de nombreuses causes de dépolarisation de la fluorescence :

- vibration de torsion,
- mouvement brownien,
- transfert d'énergie d'excitation vers une autre molécule avec d'autres orientations.

La dépolarisation par diffusion rotationnelle d'un fluorophore sphérique est donnée par l'équation de Perrin*. L'anisotropie à l'état stationnaire est donnée par l'asymptote de droite de la figure 45.

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_f}{\tau_r} = 1 + 6 D_r \tau_f \quad (38)$$

Où τ_f est la durée de vie de fluorescence, τ_r le temps de corrélation rotatif, et D_r , la constante de diffusion rotationnelle et r_0 , l'anisotropie initiale. Le temps de corrélation rotatif τ_r est donné par la loi de Debye† Stokes Einstein‡ :

$$\tau_r = \frac{\eta V}{k_b T} \quad (39)$$

η est la viscosité du solvant, V le volume de la molécule, k_b est la constante de Boltzmann§ et T la température.

Si le temps de corrélation est plus long que la durée de vie ($\tau_r \gg \tau$) alors l'anisotropie de fluorescence (r) est égale à l'anisotropie fondamentale (r_0). Si le temps de corrélation est plus petit que la durée de vie du fluorophore ($\tau_r \ll \tau$), alors l'anisotropie tend vers zéro.

*. Perrin (1870-1942)

†. Peter Joseph Williams Debye (1884-1966)

‡. Albert Einstein (1874-1955)

§. Boltzman (1844-1906)

Anisotropie de fluorescence

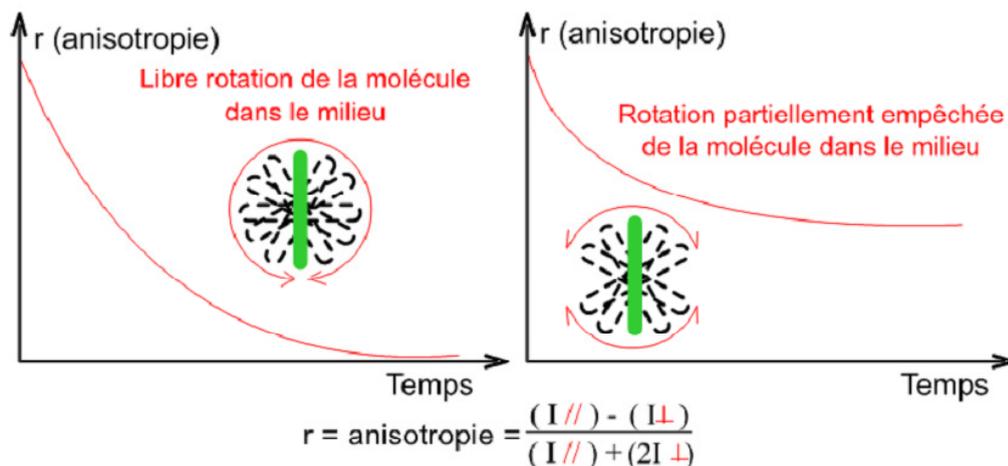


FIGURE 45 – Modification de la dynamique d'anisotropie de fluorescence en fonction du mouvement de la molécule [52].

5.3 Mesure de l'anisotropie de fluorescence

5.3.1 Principe

Pour la mesure d'anisotropie de fluorescence, deux configurations sont communément utilisées.

-La configuration en **L** où l'on n'utilise qu'une seule voie d'observation (voir (A) figure 46). On mesure successivement les deux composantes de polarisation.

-La configuration en **T** où l'on utilise deux voies pour l'observation, une pour la composante perpendiculaire et l'autre pour la composante parallèle (voir (B) figure 46).

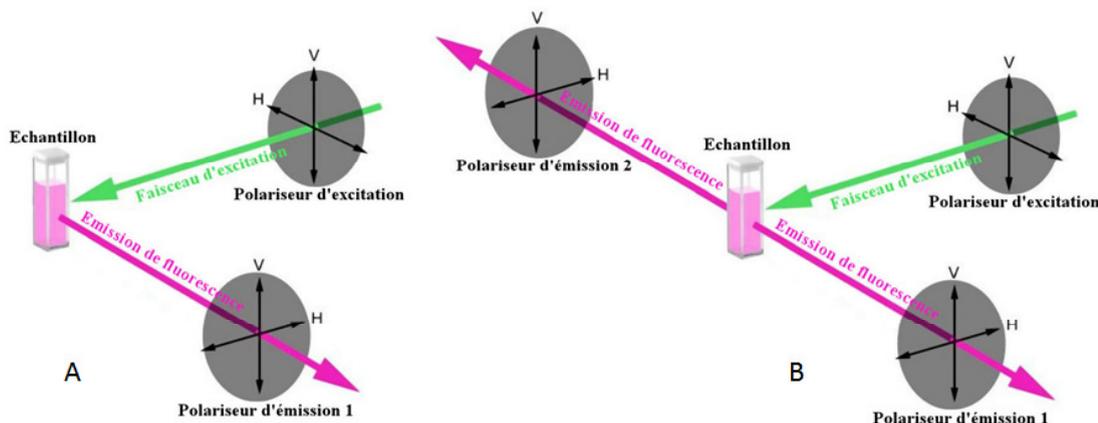


FIGURE 46 – (A) Anisotropie en L ; (B) Anisotropie en T.

Dans notre cas, les mesures d'anisotropies sont réalisées dans une configuration proche de celle de la méthode **L**.

A l'inverse des deux configurations précédentes la fluorescence n'est cependant pas détectée à

90° de la direction de propagation du faisceau d'excitation. Par ailleurs, au lieu de faire des mesures en variant la polarisation devant le détecteur, nous avons choisi de travailler dans une configuration symétrique. Nous fixons la polarisation devant le détecteur et nous faisons varier la polarisation incidente (voir figure 47). Ainsi, nous mesurons, successivement, l'intensité selon les deux polarisations incidentes (perpendiculaire et parallèle). De cette façon, cela permet de s'affranchir des différences éventuelles du taux de collection du signal selon les différentes polarisations.

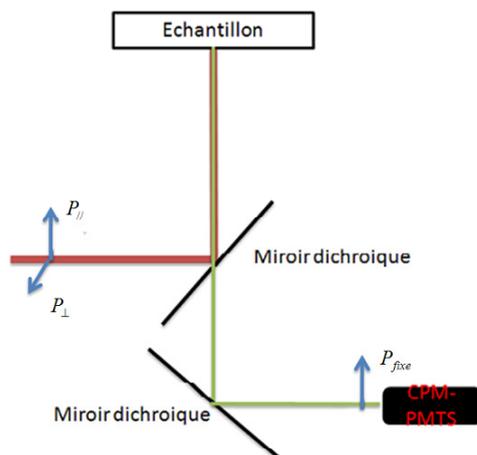


FIGURE 47 – Schéma simplifié de la mesure de l'anisotropie de fluorescence (en rouge faisceau laser incident et en vert le faisceau de fluorescence).

5.3.2 Mesure du coefficient de diffusion rotationnel d'un marqueur d'ADN

Dans le cas de dépolarisation par rotation d'une molécule sphérique, on a vu que la durée de vie d'anisotropie τ_r était liée au coefficient de diffusion rotationnel par la relation Debye-Stokes-Einstein :

$$\tau_r = \frac{1}{6 D_r} = \frac{\eta V}{k_b T} \quad (40)$$

Selon cette formule, la durée de vie d'anisotropie est inversement proportionnelle au coefficient de diffusion rotationnel. Nous avons calculé, à partir des mesures de durées de vie d'anisotropie, le coefficient de diffusion rotationnel d'un marqueur d'ADN, le Hoechst 33258 dans un ADN de synthèse.

5.3.3 Le Hoechst 33258

Afin de calibrer notre système, nous avons mesuré l'anisotropie statique ($r_{statique}$) et l'anisotropie dynamique (τ_r) du Hoechst 33258 dans le DrewAT. Le Hoechst 33258 est un marqueur commercial de petit sillon [9], celui-ci est largement utilisé pour le marquage de l'ADN en microscopie confocale. La figure 48 répertorie les variations du coefficient de diffusion rotationnel (D_r) du Hoechst 33258 dans des solutions de DrewAT de différentes concentrations.

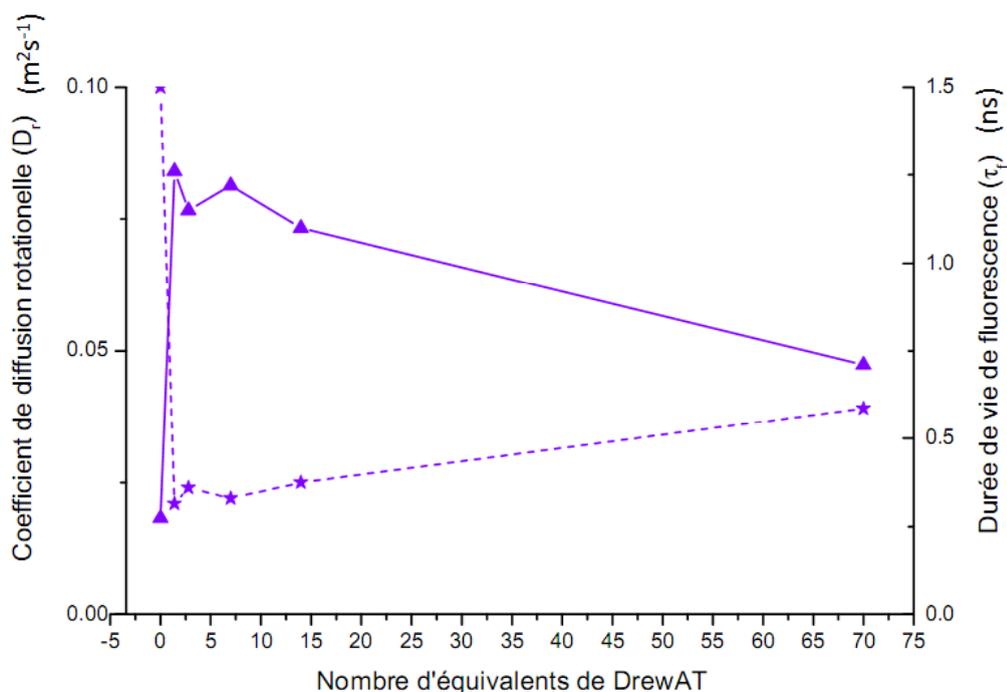


FIGURE 48 – Variation du coefficient de diffusion rotationnel (D_r , \star) et de la durée de vie de fluorescence (τ_f , \triangle) du Hoechst 33258 en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT.

Quand il n'y a pas de DrewAT, le coefficient de diffusion rotationnel est élevé. Ainsi, le Hoechst 33258 se dépolarise et se désexcite rapidement, ceci est confirmé par une durée de vie extrêmement courte. Dès les premiers ajouts de DrewAT, la durée de vie de fluorescence devient longue, celle-ci est issue des fluorophores de Hoechst 33258 qui sont en interaction avec l'ADN. Le coefficient de diffusion rotationnel atteint sa valeur minimale, confirmant le blocage du Hoechst 33258 dans le petit sillon du DrewAT. Néanmoins, pour un large excès de DrewAT, la durée de vie reste longue puisque tous les fluorophores sont insérés. Mais le coefficient de diffusion rotationnel augmente, passant de 0.025 à 0.039 ns^{-1} . Néanmoins, il est à noter que les mesures de durées de vie d'anisotropie de fluorescence sont difficiles à mettre en œuvre et que la reproductibilité des mesures est faible.

Grâce à ce banc de mesures, nous avons étudié les triphenylamines et ses dérivés. Dans le chapitre suivant, nous allons aborder les règles d'ingénierie moléculaire mises en œuvre pour l'optimisation des triphenylamines.

Troisième partie

Ingénierie moléculaire

Table des matières

1	Fluorophores pour l'absorption à deux photons	71
1.1	Structure quadrupolaire	71
1.2	Structure octupolaire de symétrie C_3	73
1.3	Autres systèmes	74
1.4	Le marqueur idéal à deux photons?	75
2	État de l'art des fluorophores développés pour la fluorescence à deux photons en milieu biologique	76
3	Études engagées au laboratoire	76
3.1	Études préliminaires en solvant organique	77
3.1.1	Les triphenylamines	77
3.1.2	Les trinaphthylamines	77
3.2	Étude de composés ioniques correspondants	79
4	Voies d'interactions fluorophore/ADN pour le marquage non-covalent	82
4.1	Généralités	82
4.2	Voies potentielles d'optimisation des marqueurs	84
4.2.1	Le carbazole bis et tris-pyridinium	84
4.2.2	Bis- et tris-phenylamine ortho-pyridinium et Bis- et tris-phenylamine benzimidazole	85
5	Conclusion	86

1 Fluorophores pour l'absorption à deux photons

Au cours des dernières années, de nombreux travaux de recherche ont consisté à développer des stratégies d'ingénierie moléculaire afin d'obtenir de nouveaux matériaux possédant une large section efficace d'absorption à deux photons. Dans ce contexte, plusieurs catégories de fluorophores ont été étudiées aussi bien théoriquement qu'expérimentalement. Depuis plus de 10 ans, le nombre d'études visant à mieux comprendre les relations structures/propriétés des molécules en vue de leur optimisation n'a pas cessé d'augmenter. Aujourd'hui, cela reste un domaine très actif étant donné le manque de fluorophores présentant toutes les caractéristiques requises pour le marquage d'ADN en milieu biologique.

Dans le premier chapitre, nous avons vu que la section efficace d'absorption à deux photons était liée à la partie imaginaire de $\chi^{(3)}$ (voir équation 16). La section efficace d'absorption à deux photons est aussi donnée par l'équation suivante :

$$\sigma_{S_0 \rightarrow 2} \propto \frac{\mu_{01}^2 \mu_{12}^2}{(E_1 - E_0 - \hbar w)^2 \Gamma} \quad (41)$$

Où S_0 , S_1 , S_2 sont les états énergétiques et μ_{ij} les moments dipolaires de transition de l'état i vers l'état j , $w = (E_2 - E_0)/2$ et Γ est un facteur numérique.

Pour avoir une grande section efficace d'absorption à deux photons, il faut notamment que le moment dipolaire de la transition S_0 vers S_1 soit grand. Le contrôle de la structure de la molécule va permettre de modifier le moment dipolaire.

1.1 Structure quadrupolaire

Une des stratégies consiste à introduire des groupements électrodonneurs aux extrémités et un groupement électroattracteur au centre de la molécule (ou vice versa). La première étude d'ingénierie moléculaire pour concevoir des composés présentant une section efficace d'absorption à deux photons élevée a été publiée en 1998 par Marder, Perry, Webb *& al.* [53]. Les auteurs ont cherché à rationaliser l'augmentation de la section efficace d'absorption en fonction du transfert de charge intramoléculaire, par ajout de groupements donneurs (D) et accepteurs (A) à partir d'un cœur d'électrons π -conjugués de type stilbène. Les prédictions théoriques ont été validées par des mesures expérimentales [54].

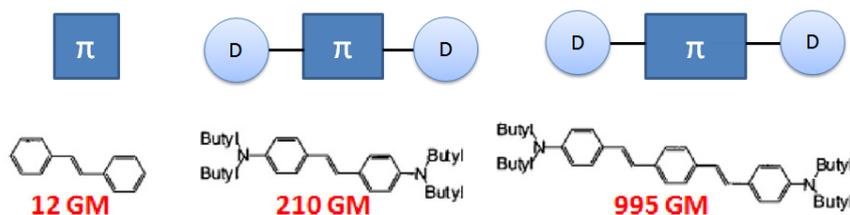


FIGURE 49 – Composés utilisés par Marder *& al.* [54].

Cette étude a permis de montrer que l'introduction symétrique de groupements électrodonneurs ou électroaccepteurs sur le stilbène (donnant des systèmes D- π -D et A- π -A) a pour conséquence un transfert de charge lors de l'excitation entre les parties périphériques de la molécule et son centre

(ou l'inverse), qui mène à une augmentation des moments dipolaires de transition. Ce phénomène de transfert de charge est encore augmenté lorsque des groupements attracteurs/donneurs sont ajoutés au centre de la molécule, formant des molécules quadrupolaires D- π -A- π -D et A- π -D- π -A. Il a pu être démontré que ces molécules ont des valeurs de δ beaucoup plus élevées que celles présentant des structures de types D- π -D et A- π -A. Des composés de type D- π -A- π -D- π -A- π -D ont eux aussi été développés; ils présentent des sections efficaces très élevées [55]. De plus l'augmentation de la longueur de conjugaison de la molécule (le nombre d'électrons π conjugués qui participent au transfert de charge) entraîne une forte augmentation de la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons et un déplacement vers les grandes longueurs d'onde de la bande d'absorption à deux photons.

Par la suite, de nombreux chercheurs dont Cho *et al.* [56] ont confirmé par différents types d'études la corrélation entre force des groupements électrodonneurs et/ou électroattracteurs et section efficace d'absorption à deux photons. Plusieurs travaux ont été menés sur l'influence de la nature des groupements électrodonneurs et électroattracteurs ainsi que celle du squelette conjugué. Ainsi, il a pu être observé que l'utilisation de cœurs rigides, de type bithienothiophène [57,58], fluorène [59,60] ou anthracène [61] permettait d'obtenir des composés présentant de bonnes propriétés d'absorption à deux photons (voir figure 50).

Plus récemment, d'autres types de cœurs conjugués ont été développés, de type squaraine [62,63], perylenediimide [64], pyridine [65] ou pyrène [66].

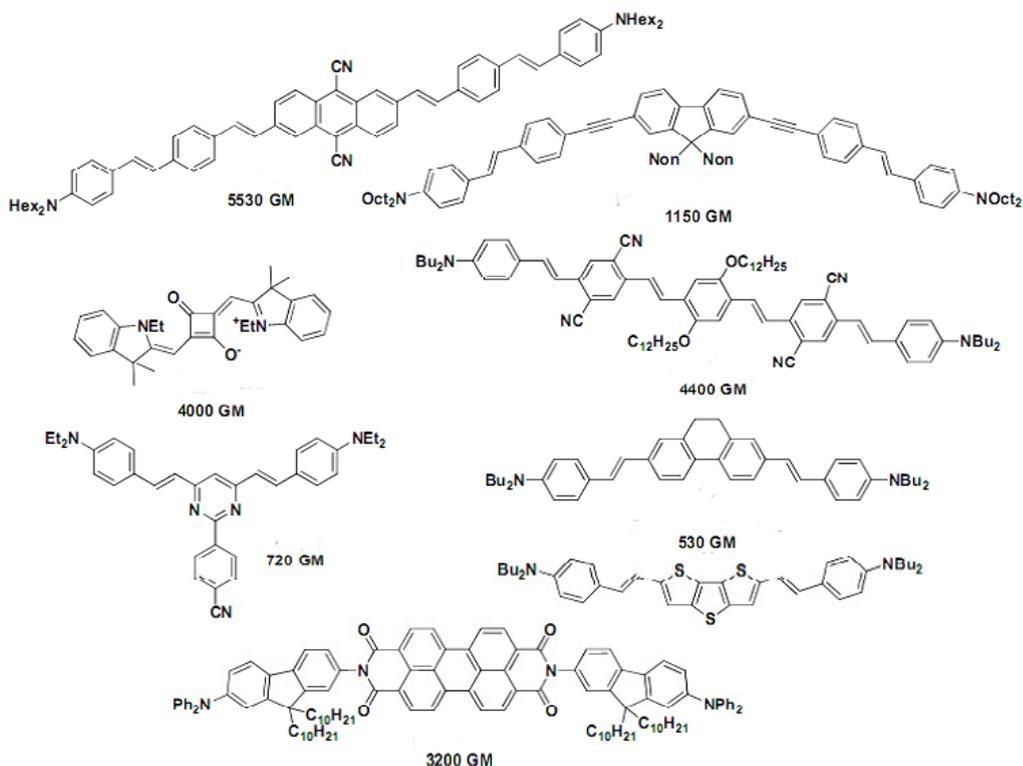


FIGURE 50 – Sélection d'exemples de composés à symétrie quadrupolaire présentant de fortes sections efficaces à 2 photons [57, 59, 61, 63–65]. Résultats tous obtenus avec une excitation femtoseconde.

1.2 Structure octupolaire de symétrie C_3

Les composés de type octupolaire conçus sur le même modèle que les composés quadrupolaires considérés sur le figure 50 ont fait l'objet de nombreuses études pour leurs propriétés d'optique non linéaire depuis les travaux de Zyss *&al.* [67]. Parmi ces composés, les molécules de symétrie C_3 ou C_{3h} ont été les plus étudiées. Comme dans le cas des composés quadrupolaires, il a été montré que l'absorption à deux photons de telles molécules augmentait avec la force des groupements électrodonneurs et électroattracteurs [68].

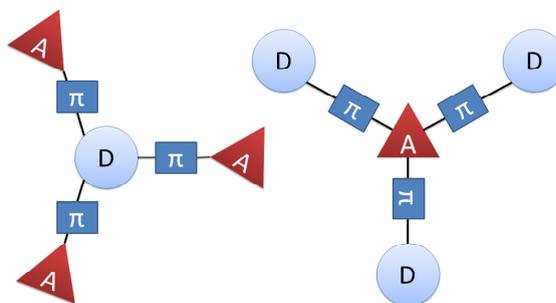


FIGURE 51 – Géométrie de symétrie C_3 de type octupolaire.

Il a été observé, notamment par Prasad *&al.* [69] qu'il existait, dans certains cas, une exaltation de l'absorption à deux photons. L'absorption à deux photons d'un composé octupolaire est supérieure à trois fois celle de la molécule dipolaire correspondante.

Cette observation a conduit Beljonne *&al.* à proposer un modèle pour cette géométrie (symétrie C_3 ou C_{3h}) et à comparer le cas où les trois branches de la molécule sont couplées entre elles à celui où elles ne le sont pas [70]. Ce modèle permet de rationaliser les propriétés d'absorption à deux photons des composés octupolaires. Les composés octupolaires possèdent de par leur symétrie des orbitales dégénérées et deux états excités de faible énergie accessibles à deux photons, d'où des probabilités de transition élevées. Le couplage électronique entre les trois branches de la molécule augmente la section efficace d'absorption à deux photons. De plus, ce modèle met en évidence que pour aboutir à une forte absorption à deux photons, il est nécessaire d'avoir un fort transfert de charge lors de l'excitation. Ce modèle permet de prédire que la section efficace d'absorption à deux photons sera d'autant plus élevée que la longueur de conjugaison sur chacun des bras sera grande et que la force des groupements électroattracteurs et électrodonneurs sera élevée, comme dans le cas des dérivés quadrupolaires précédemment évoqués.

Ce modèle a ensuite été validé par Blanchard-Desce et Trétiak sur les dérivés de triphénylaminés [71]. Ces chercheurs ont montré que l'émission de fluorescence a lieu à partir d'un état excité localisé sur une des trois branches (ce qui explique que le maximum d'émission de fluorescence varie peu avec le nombre de branches du composé).

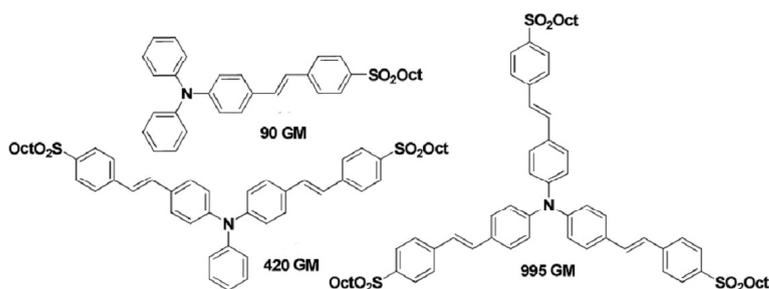


FIGURE 52 – Composés servant de support à l'étude menée par Trétiak et Blanchard-Desce [71].

La forte absorption à deux photons des composés octupolaires a conduit à la synthèse d'un grand nombre de dérivés. Certains possèdent un cœur de type électroattracteur (par exemple une triazine [72]) mais la majorité de ces composés possèdent un cœur électrodonneur, en général, une triphénylamine ou un carbazole [73].

1.3 Autres systèmes

Les quadrupoles et les octupoles C_3 -symétriques représentent une large majorité des systèmes synthétisés et étudiés pour leur forte absorption à deux photons. Quelques autres types de composés ont également montré des propriétés intéressantes, comme certaines porphyrines [74, 75], des porphycènes [76] ainsi qu'une triphénylamine tris(porphyrine) [77]. Des macrocycles géants composés d'unités triophène ont également mis en évidence des sections efficaces d'absorption à deux photons très élevées [78]. Des systèmes octupolaires à quatre branches possédant un cœur de type cyclophane [79, 80] ou pyrène [66] ont également été décrits (voir figure 53). Mais on trouve aussi des systèmes dendrimériques [81] solubles dans l'eau, disposant d'une section efficace d'absorption à deux photons extrêmement importante ($\sim 1100GM$). Enfin, divers complexes métalliques ont récemment été décrits pour leurs propriétés de limitation optique (complexe de ruthenium) [82] ou de luminescence (complexe d'euprium) [83].

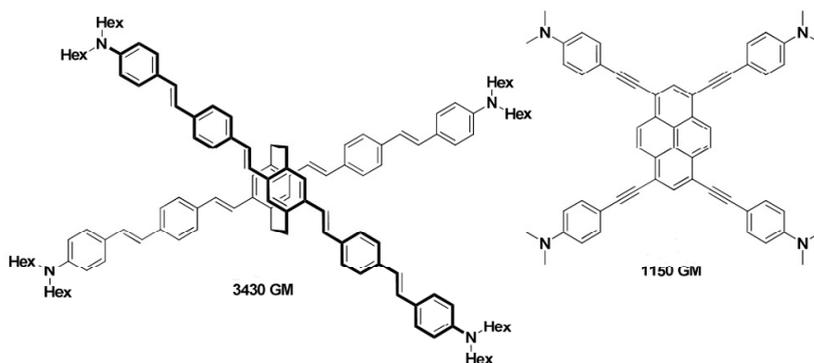


FIGURE 53 – Exemples de composés octupolaires à quatre branches [66, 80].

Nous avons donc vu que l'étude des relations structure/propriétés optiques a conduit à l'obtention de composés possédant de fortes sections efficaces d'absorption à deux photons. Ces composés ont souvent été développés en vue d'applications en limitation optique ou en photopolymérisation. On notera cependant que la plupart des composés proposés sont uniquement solubles en milieu or-

ganique et possèdent une grande taille, ce qui les rend incompatibles avec une utilisation en milieu biologique.

1.4 Le marqueur idéal à deux photons ?

Une étude bibliographique récente, nous a permis d'identifier qu'il existait un nombre restreint de fluorophores possédant les critères requis pour le marquage en milieu biologique (solubilité dans l'eau, taille limitée, photostabilité, grand ϕ_f et σ_{2p}). On peut notamment citer les composés pyridinium décrits par Abbotto *&al.* [84] et plus récemment les composés de Feng *&al.* [73]. Cependant, les sections efficaces de ceux-ci restent relativement modestes.

Pour comparer tous ces systèmes différents, on peut définir différentes figures de mérite. D'une part, une figure de mérite intéressante à considérer est le paramètre σ_{2p}/M , que nous appellerons *section efficace massique* et qui correspond à la section efficace d'absorption à deux photons rapportée à la masse molaire du composé. De même, une figure de mérite analogue, correspondant à la section efficace rapportée au nombre d'électron π conjugués impliqués dans le transfert de charge, est couramment utilisée. En effet, le marqueur idéal doit posséder une section efficace d'absorption à deux photons élevée pour une taille réduite. Au regard des propriétés que doivent avoir les marqueurs utilisés pour le marquage de l'ADN en milieu biologique, nous avons défini un cahier des charges à remplir. Ainsi, le marqueur idéal de l'ADN en milieu biologique doit présenter de nombreuses caractéristiques :

1. Compatibilité avec le milieu biologique (soluble dans l'eau),
2. Petite taille pour ne pas modifier la structure et le fonctionnement de l'ADN,
3. Sélectivité pour l'ADN,
4. Stabilité photophysique (pas de photoblanchiment),
5. Rendement quantique de fluorescence important (petite quantité utilisée) et section efficace d'absorption à deux photons importante (sensibilité de la détection),
6. *Brillance moléculaire* ($\phi_f \sigma_{2p}$), Ce *facteur de mérite* permet de comparer les propriétés optiques de composés ayant une masse moléculaire équivalente. Mais on peut aussi utiliser un autre *facteur de mérite* défini par la brillance divisée par la masse molaire du composé ($\phi_f \sigma_{2p}/M$) pour des composés de masses molaires différentes.
7. Faible toxicité,
8. Pénétration en cellules vivantes,
9. Fluorescence dans le rouge (hors absorption des tissus vivants).

En tenant compte de ces critères, nous avons fait une recherche bibliographique des composés présentant en partie ou toutes ces caractéristiques. Nous n'avons trouvé aucune molécule satisfaisant l'ensemble de ces critères.

2 État de l'art des fluorophores développés pour la fluorescence à deux photons en milieu biologique

Pour la microscopie biphotonique, les biologistes utilisent, principalement, des marqueurs qui ne sont pas optimisés. Par exemple, les principaux marqueurs utilisés sont : l'éthidium, le TO, le YO, l'Acridine orange, le pyrène, le DAPI et le Hoechst 33258 (voir figure 54). N'étant pas optimisés pour l'absorption biphotonique, ces marqueurs n'offrent pas un bon rapport signal/bruit car ils disposent d'une section efficace d'absorption à deux photons faible et une émission dans le bleu/vert*. Par ailleurs, la plupart des composés disponibles possède une émission dans le bleu/vert qui se trouve fortement atténuée en milieu biologique (voir figure 18).

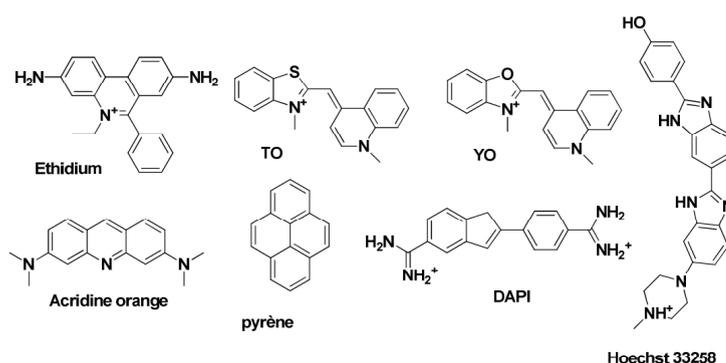


FIGURE 54 – Structure de quelques marqueurs commerciaux fluorescents d'ADN.

3 Études engagées au laboratoire

Au laboratoire, dans le cadre d'une thèse précédente, les composés de type triphénylamine (TP) suivants ont été synthétisés et étudiés (figure 55).

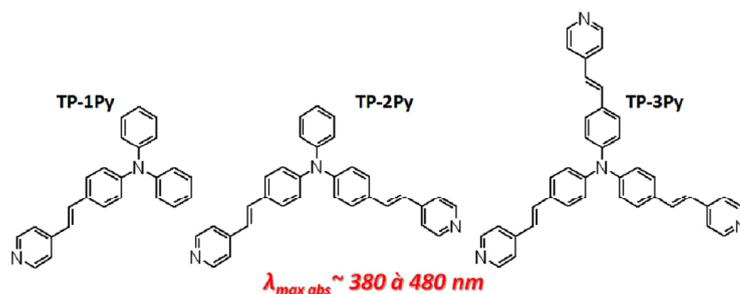


FIGURE 55 – Composés triphénylamine étudiés lors de la thèse de Clémence Allain [15].

Il a été montré que les dérivés ioniques de ces composés présentaient des caractéristiques intéressantes pour le marquage biologique [15]. Avant de les discuter, nous allons rappeler les propriétés

*. il n'existe que très peu de marqueurs commerciaux qui émettent dans le rouge, le DRAC 5 est un exemple mais il n'est pas photochimiquement stable

des composés neutres en milieu organique. Puis, nous détaillerons les essais d'optimisation de la structure.

3.1 Études préliminaires en solvant organique

3.1.1 Les triphenylamines

Ces composés disposent d'une forte absorption à deux photons (voir figure 55), et d'une taille réduite. Ils présentent un rendement quantique de fluorescence intéressant ($0.13 < \phi_f < 0.6$). Leurs spectres d'émission de fluorescence sont larges et peu structurés, étant donnée l'existence d'un fort déplacement de Stokes, ces molécules ont de plus la propriété d'émettre vers le rouge (voir annexe B.1).

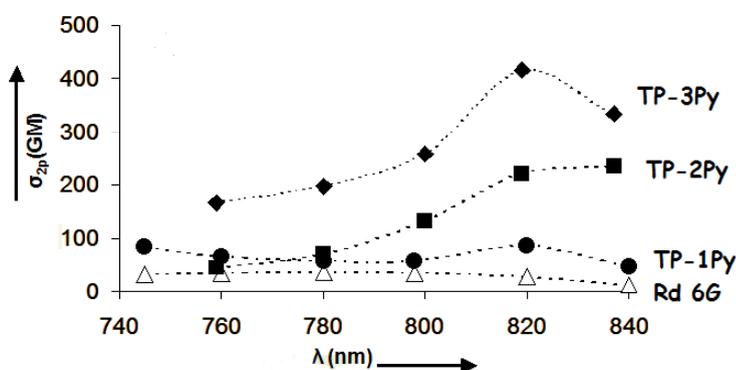


FIGURE 56 – Mesures des sections efficaces dans le dichloromethane des mono-, bis-, triphenylamine.

Des mesures de sections efficaces d'absorption à deux photons ont été réalisées dans un solvant organique (le dichloromethane). La molécule à trois branches dispose d'une section efficace d'absorption à deux photons maximale (420 GM) vers 820nm. Cette molécule profite de la délocalisation des charges sur les trois branches, améliorant ainsi la section efficace. En passant de une, à deux, puis trois branches, il a pu être constaté un gain conséquent de la section efficace d'absorption à deux photons, comme le montre la figure 56. Le gain est encore plus important sur le produit $\sigma_{2p}\phi_f$, qui passe de 10.5 pour la TP-1Py, à 150 pour la TP-3Py. Les fluorophores à deux et trois branches présentant les résultats les plus intéressants, l'étude des composés à une branche a ensuite été abandonnée. Les propriétés de marquage de l'ADN de molécules dérivées de TP-2Py et TP-3Py solubles dans l'eau ont été testées et sont reportées ultérieurement dans le manuscrit. Un des critères d'optimisation de ces fluorophores est l'augmentation du rendement quantique de fluorescence.

3.1.2 Les trinaphtylamines

En se basant sur les différentes études d'ingénierie moléculaire ayant été rapportées (voir section 1), nous avons essayé de voir dans quelle mesure les propriétés des TP-2Py pouvaient être optimisées. En particulier, nous nous sommes intéressés au moyen d'obtenir des rendements quantiques de fluorescence plus importants, en jouant notamment sur le nombre d'électrons π du cœur donneur de

la molécule. Pour ce faire, un cœur trinaphtylamine (TN) a été substitué au cœur triphénylamine et les molécules suivantes, toutes de symétrie C_3 ont été plus particulièrement synthétisées [85].

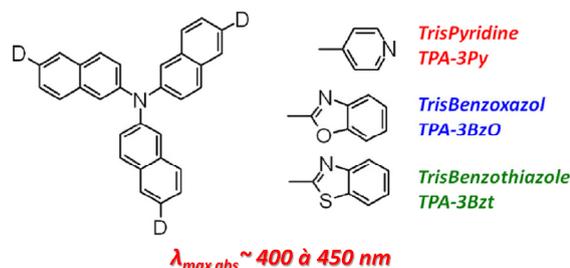


FIGURE 57 – Composés trinaphtylamines dont on a varié le groupement accepteur [85].

Nous avons étudié les propriétés optiques de ces composés. Au delà de l'influence du cœur TN, nous avons essayé de voir l'influence des substituants. Ainsi, les groupements pyridine (Py), benzoxazole (Bzo) et benzotriazole (Bzt) ont été placés aux extrémités de chaque branche. Le tableau 4 résume les propriétés optiques mesurées pour ces différents composés TN-3Py, TN-3Bzo, TN-3Bzt. Les caractéristiques des dérivés TP-3Py précédemment considérés sont rappelées à titre de comparaison.

TABLE 4 – Propriétés photophysiques des TN et TP dans le dichlorométhane, l'ensemble des mesures est détaillé en annexe A.5.1.

	ϕ_f	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	σ_{2p} (GM)	$\lambda_{\text{em } \sigma_{2p}}$ (nm)	$\sigma_{2p} \phi_f$ (GM)	$\frac{\sigma_{2p}}{M}$ ($\text{GM} \cdot \text{gr}^{-1}$)
TP-3Py	0.53	63900	406	519	130	720	69	0.23
TN-3Py	0.58	79400	414	528	320	740	187	0.45
TP-3Bzo	0.50	89900	424	518	540	720	271	0.80
TN-3Bzo	0.65	111100	431	542	810	740	526	0.98
TP-3Bzt	0.54	89200	433	538	510	740	275	0.71
TN-3Bzt	0.63	114900	434	559	640	740	406	0.73

En passant d'un cœur TP à TN, le rendement quantique de fluorescence n'a que très peu augmenté. Le changement du substituant a entraîné un décalage du maximum d'absorption et d'émission vers le rouge. Le déplacement de Stoke reste toujours important (114 nm pour la TN-3Py, 111nm pour la TN-3Bzo et 125nm pour la TN-3Bzt). La synthèse de ces composés est décrite plus en détail dans la thèse de Guillaume Bordeau [86].

Quelque soit le groupement accepteur, on constate une augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons. En moyenne, on multiplie par deux la section efficace d'absorption à deux photons en passant d'un cœur TP à un cœur TN. La plus forte section efficace d'absorption à deux photons est obtenue pour la TN-3Bzo, où l'on passe de 540 GM pour la TP à 810 GM pour la TN. A partir de ces expériences, on peut affirmer que l'augmentation du nombre d'électrons dans le cœur de la molécule augmente la section efficace d'absorption à deux photons et que ce n'est pas le substituant possédant le plus fort caractère accepteur qui donne les meilleurs résultats.

3.2 Étude de composés ioniques correspondants

Il existe deux voies possibles pour passer d'un composé soluble en milieu organique en un composé soluble dans un milieu aqueux.

- La première technique consiste à combiner les composés précédemment décrits avec des chaînes PEG (polyéthylène glycol) [87]
- La deuxième méthode consiste à la mise en œuvre de composés ioniques [88]. Cette dernière technique a été utilisée pour modifier les triphénylamines.

A partir des dérivés précédemment évoqués, les composés suivants ont plus particulièrement été synthétisés [86]. Ceux-ci s'avèrent bien solubles en milieu aqueux.

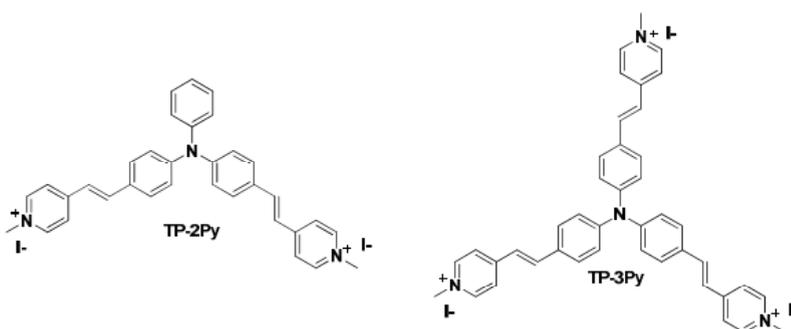


FIGURE 58 – Molécules TP-2Py et TP-3Py chargées.

En présence d'ADN, il a été observé que ces composés triphénylamine présentaient une fluorescence fortement exacerbée (voir graphique A sur la figure 59). Lorsque l'on compare l'exaltation de fluorescence des composés bis et triphénylamine, on remarque que selon le nombre de branches, l'exaltation de fluorescence est plus ou moins importante. Ainsi, le facteur d'exaltation de la fluorescence pour la TP-2Py est de 120 alors que pour la TP-3Py, il n'est que de 20. Contrairement aux résultats mesurés avec les composés neutres en milieu organique, ainsi on voit qu'en milieu biologique, les dérivés ioniques correspondants qui possèdent les meilleures propriétés sont les composés à deux branches.

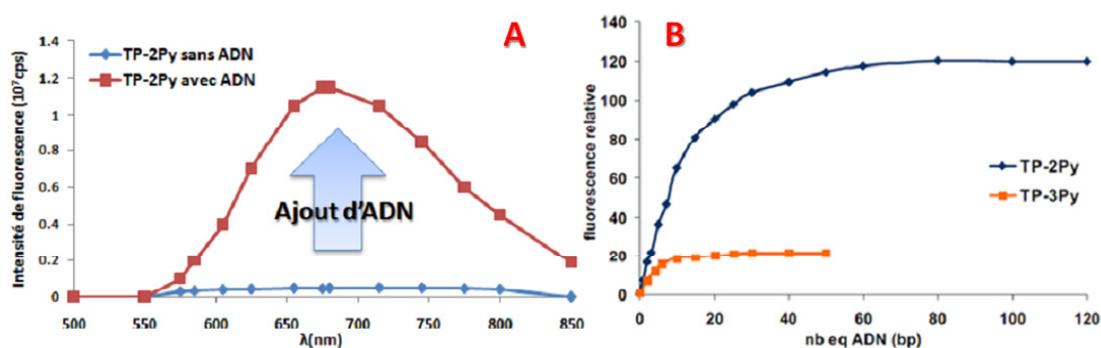


FIGURE 59 – Exaltation de fluorescence de la TP-2Py en présence d'ADN (à gauche). A droite, Titration des TP-Py à une concentration de $1\mu\text{M}$ dans un tampon de cacodylate de sodium pH 7.2 10mM, 100mM NaCl par de l'ADN de testicule de hareng (l'exaltation de fluorescence relative correspond au rapport entre l'intensité de fluorescence du complexe marqueur/ADN à saturation et l'intensité de fluorescence du marqueur à l'état libre dans la solution tampon) [?].

Ces fluorophores semblent être de bons marqueurs du double brin d'ADN. Les images de microscopie, présentées figure 60, confirment le marquage de l'ADN dans le noyau de la cellule (étude

en cellule fixée). Les fluorophores pénètrent donc dans le noyau, ils parviennent a priori à passer à travers la barrière plasmique et la bicouche lipidique entourant le noyau.

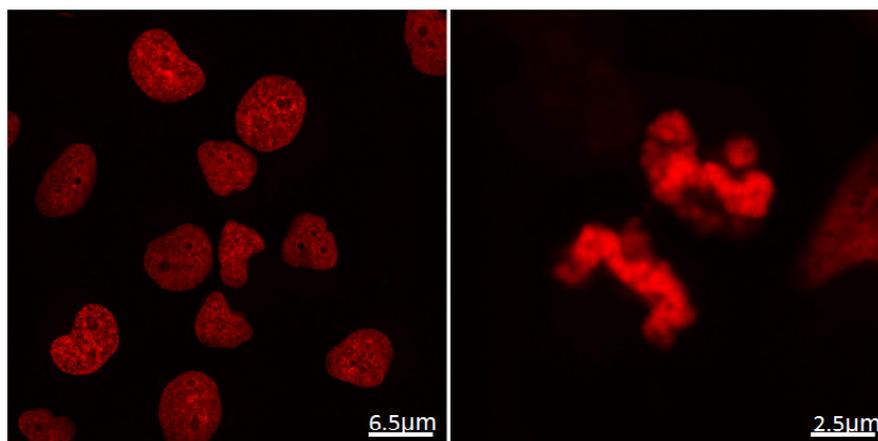


FIGURE 60 – Images de microscopie à deux photons sur des cellules fixées de fibroblastes pulmonaires d'embryons humains MRC-5 fixées par les TP-2Py ($2\mu\text{M}$, $\lambda_{exc} = 820\text{nm}$, $\lambda_{em} = 520 - 750\text{nm}$), couleurs définies selon la longueur d'onde d'émission.

Précédemment, on a vu que les molécules de trinaphtylamines disposaient d'une forte section efficace d'absorption à deux photons dans le dichlorométhane et que le produit $\sigma_{2p}\phi_f$ était largement en faveur des TN (voir tableau 4). Ces mesures nous ont conduit à évaluer les propriétés des dérivés chargés de TN. Comme pour les triphenylamines, les trinaphtylamines ont été modifiés de façon à obtenir des dérivés ioniques. Malheureusement, malgré les modifications de leurs charges, les composés Bzt et Bzo qui possédaient la meilleure section efficace d'absorption à deux photons en milieu organique sont instables en présence d'eau. Ainsi, nous nous sommes principalement concentrés sur les dérivés TN ayant le pyridinium comme groupement accepteur. On ne remarque cependant aucune exaltation de la fluorescence en présence d'ADN (~ 2.7) pour ces composés. Par ailleurs, comme le montre la figure 61, la fluorescence est principalement issue des fluorophores présents dans le cytoplasme. Visiblement, les dérivés TN ne pénètrent pas dans le noyau.

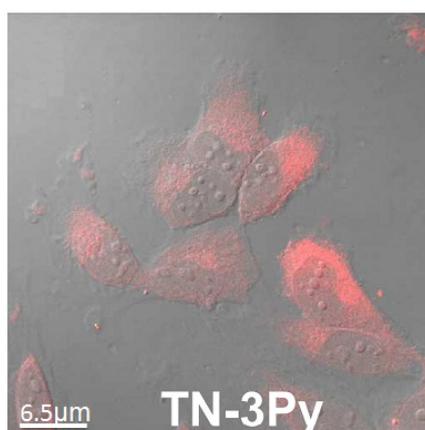


FIGURE 61 – Images de microscopie confocale ($\lambda_{ex} = 488\text{nm}$ et $\lambda_{em} \sim 520 - 750\text{nm}$, $2\mu\text{M}$).

Ces mesures mettent en lumière un élément important du marquage de l'ADN par des fluorophores qui est l'interaction spécifique fluorophore/ADN. On a vu que les TP-Py possédaient une forte exaltation en présence d'ADN. Nous avons réalisé différentes mesures afin de déterminer le type d'interaction entre les TP et l'ADN. On a notamment étudié l'intensité de fluorescence en fonction de la nature des brins d'ADN. Lorsque les brins d'ADN sont riches en paires de bases AT, l'exaltation de fluorescence de la TP-2Py est encore plus importante que dans le cas de brins CG (voir graphique A de la figure 62). A l'inverse de la TP-2Py, la TP-3Py ne possède pas de spécificité.

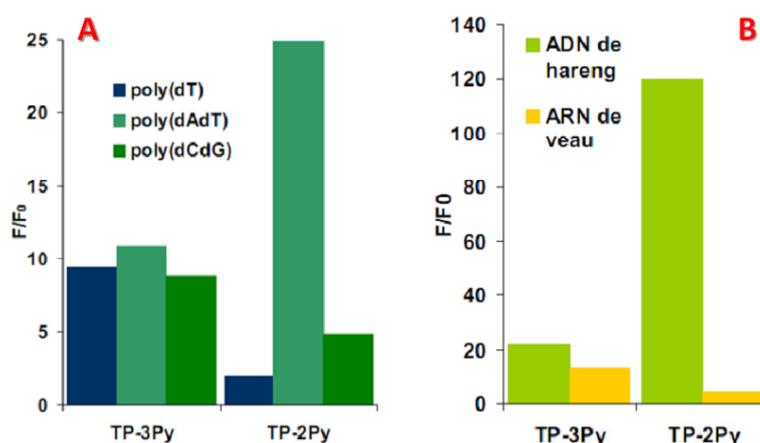


FIGURE 62 – (A) : Exaltation de fluorescence (F/F_0) des TP-Py à saturation en présence de différentes séquences d'ADN (B) : Exaltation de fluorescence (F/F_0) des TP-Py à saturation en présence d'ADN et d'ARN de veau par rapport à leurs fluorescence libre, tampon de cacodylate de sodium pH 7.2 10mM, 100mM NaCl.

En plus d'une sélectivité pour les paires de bases riches en AT, la spécificité du marquage, entre l'ADN et l'ARN a été testée. L'exaltation de fluorescence est importante pour la TP-2Py dans l'ADN et extrêmement faible dans l'ARN. Pour la TP-3Py, on constate une absence de marquage spécifique. Cette expérience montre que la TP-2Py marque spécifiquement l'ADN. Ce signal important en présence d'une séquence spécifique d'ADN peut être le signe d'une insertion dans le petit sillon de la double hélice d'ADN. Des calculs d'optimisation de la structure du complexe TP-Py/double brin d'ADN montrent qu'effectivement les dérivés à deux branches peuvent parfaitement s'insérer dans le petit sillon (voir figure 63).

Ces calculs montrent par contre que le dérivé à trois branches ne s'insère que partiellement dans le petit sillon ce qui peut expliquer les différences de propriétés précédemment décrites.

De la série des TP-Py, la molécule à deux branches est le fluorophore le plus intéressant pour le marquage de l'ADN. Ce fluorophore semble marquer spécifiquement l'ADN par insertion dans le petit sillon de la double hélice d'ADN. Ce fluorophore répond à tous les critères précédemment décrits. Malheureusement, cette molécule ne dispose pas d'un rendement quantique de fluorescence et d'une section efficace d'absorption à deux photons assez importants pour l'observation *in vivo*. Nous avons donc cherché à optimiser les propriétés de ces dérivés. Mais avant ceci, nous allons faire un rappel des deux modes de fixation non covalent de molécules dans la double hélice d'ADN.

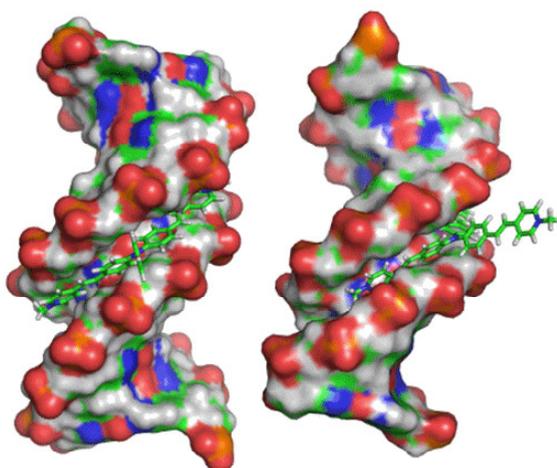


FIGURE 63 – Modélisation de l'insertion des TP-Py dans l'ADN [16].

4 Voies d'interactions fluorophore/ADN pour le marquage non-covalent

4.1 Généralités

Les marqueurs non covalents les plus performants sont généralement peu fluorescents à l'état libre mais présentent une forte exaltation de fluorescence lorsqu'ils sont liés à l'ADN. Il existe deux grands modes de fixation, non covalente, dans la double hélice d'ADN.

- l'intercalation (voir figure 64),
- la fixation dans les sillons (petit ou grand sillon).

On notera qu'à forte concentration, certains ligands peuvent cependant avoir des modes de fixation multiples.

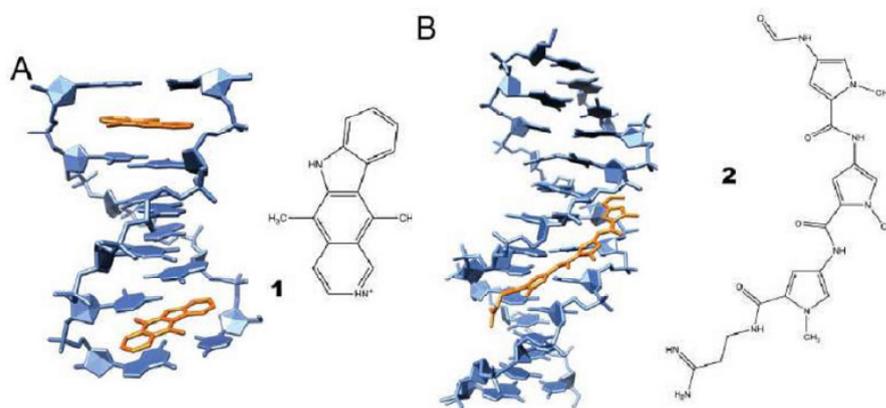


FIGURE 64 – Modes d'interactions des ligands d'ADN et structures de conjugués ligand-ADN : A, Intercalant (ellipticine) ; B, Ligand de petits sillons (Dystamicine 2) [89].

Dans le cas de l'intercalation, la molécule s'insère entre deux paires de bases, là où l'arrangement de l'ADN est le plus propice à l'interaction avec la molécule. Ce mode d'interaction souvent observé pour les molécules planes aromatiques s'effectue via recouvrement des orbitales π [90].

A l'inverse du marquage de sillon d'ADN, cette méthode de marquage peut modifier fortement la structure de l'ADN, car la macromolécule se déforme suite aux forces qu'exerce l'intercalant. Ainsi, il arrive que l'hélice d'ADN s'agrandisse d'un facteur 1.5 jusqu'à 5.1 nm Å [91], et que son potentiel électrostatique soit modifié. Les intercalants ont généralement une spécificité de séquence peu marquée.

On a vu que la molécule d'ADN disposait de deux sillons, un grand et un petit (voir introduction). On peut utiliser ces deux sites pour le marquage de l'ADN, les grosses molécules de type protéines vont préférentiellement se fixer au grand sillon [92]. Typiquement, les marqueurs de sillons disposent d'une sélectivité pour les séquences riches en AT [93] (meilleure flexibilité de l'ADN); mais il existe quelques marqueurs qui préfèrent les sillons riches en GC [94]. L'interaction entre la molécule marquante et le sillon se fait via des interactions électrostatiques entre les phosphates du squelette ainsi que par les liaisons hydrogènes avec les bases. Ce type de fixation permet une meilleure homogénéité du marquage de l'ADN.

Dans le cas des dérivés TP-2Py, toutes les expériences réalisées auparavant nous permettent de supposer que la TP-2Py interagit avec le petit sillon de la double hélice de l'ADN (exaltation préférentielles en milieu AT, dichroïsme circulaire [85]).

4.2 Voies potentielles d'optimisation des marqueurs

Précédemment, on a vu que la TP-2Py possédait de bonnes caractéristiques pour le marquage en milieu biologique. Cependant, celle-ci présente une brillance moléculaire limitée. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux voies possibles d'optimisation de cette *figure de mérite*. Différentes modifications de structures ont été entreprises, celles-ci sont résumées sur la figure 65.

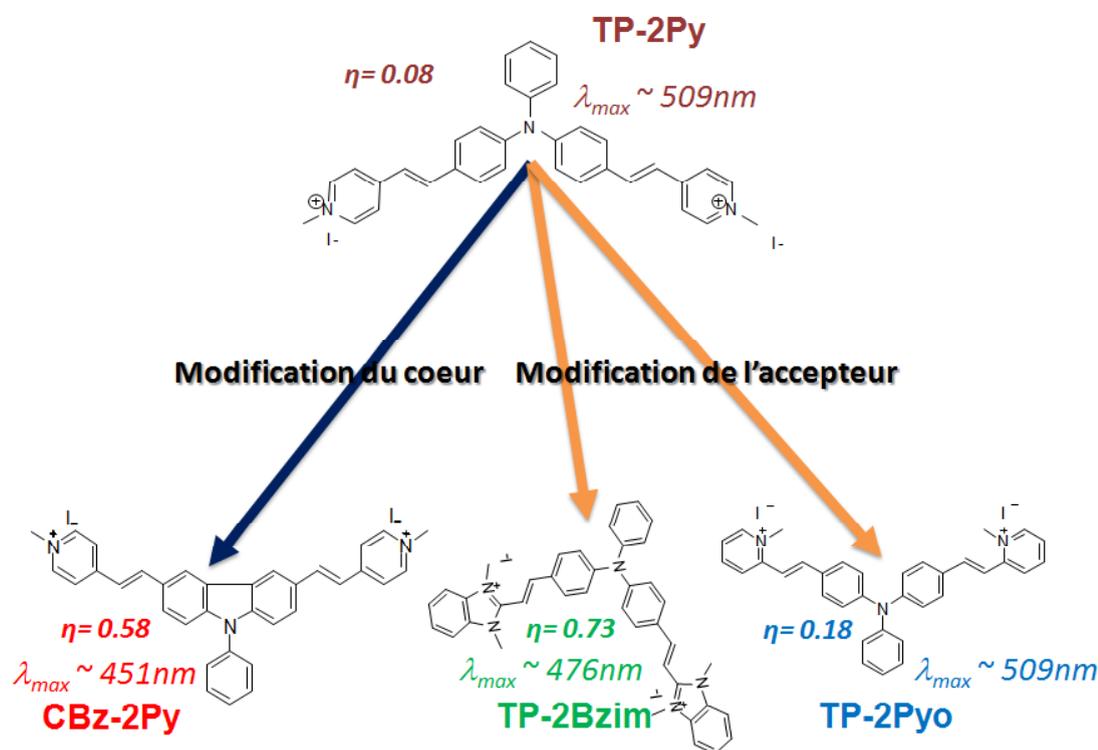


FIGURE 65 – Optimisation des structures et leurs rendements quantiques de fluorescence, leurs longueurs d'onde d'émission dans l'ADN.

L'une des voies a consisté à rigidifier le cœur électrodonneur de la molécule en modifiant le cœur TP en cœur carbazole (CBZ) (en rouge sur la figure 65). La deuxième voie a consisté à modifier les substituants. Dans un premier temps, nous avons simplement changé la position de l'azote, de la position para dans la TP-3Py et TP-2Py, en ortho pour les TP-3PyO et TP-2PyO (en bleu sur la figure 65). Le but était de restreindre les possibilités d'isomérisation des branches. Puis, dans un deuxième temps, nous avons remplacé le pyridinium par un benzimidazole (en vert sur la figure 65). Ces composés ont été synthétisés par Guillaume Bordeau qui a effectué sa thèse à l'institut Curie [86]. De mon côté, la première étape de mon travail a consisté à évaluer les sections efficaces d'absorption à deux photons de ces différents composés.

4.2.1 Le carbazole bis et tris-pyridinium

Les composés ayant des cœurs carbazole ne possèdent pas les caractéristiques idéales pour le marquage de l'ADN bien qu'ils présentent un rendement quantique fortement augmenté (voir tableau 5). La CBZ-2Py dispose d'un facteur de brillance extrêmement important (121) mais la longueur d'onde d'émission se situe trop dans le jaune (550nm). La CBZ-3Py dispose d'une brillance

et d'un facteur d'exaltation trop faible pour l'utilisation en biologie. Ainsi, nous avons décidé de revenir à la structure ayant les meilleurs résultats : une structure présentant un cœur triphenylamine possédant de nouveaux substituants optimisant potentiellement l'interaction ADN/fluorophore ;

TABLE 5 – *Propriétés optiques des composées ioniques dans l'ADN.*

	ϕ_f	$\lambda_{\max_{\text{abs}}}$ (nm)	$\lambda_{\max_{\text{em}}}$ (nm)	$\sigma_{2p_{\max}}$ (GM)	$\phi_f \sigma_{2p_{\max}}$ (GM)
TP-2Py	0.08	509	656	450	35
TP-2PyO	0.18	478	627	760	134
TP-2Bzim	0.73	476	585	710	516
CBZ-2Py	0.58	451	545	210	121
TP-3Py	0.012	499	684	1640	19
TP-3PyO	0.08	476	634	910	73
TP-3Bzim	0.59	468	591	810	480
CBZ-3Py	0.03	441	552	320	11

4.2.2 Bis- et tris-phenylamine ortho-pyridinium et Bis- et tris-phenylamine benzimidazole

La modification du groupement accepteur a pour objectif de renforcer l'interaction entre l'ADN et le fluorophore. Dans l'optique de ce renforcement, les dérivés bis et tris-phenylamine ortho-pyridinium et bis- et tris-phenylamine benzimidazole ont été étudiés. Le groupement accepteur benzimidazole est un groupement utilisé dans les marqueurs fluorescents, par exemple on retrouve ce groupement dans le Hoechst 33258 (voir figure 54) qui est bien connu pour interagir avec le petit sillon de l'ADN.

En passant de la TP-2Py à la TP-2PyO, on constate que le rendement quantique de fluorescence est multiplié par deux mais la section efficace d'absorption à deux photons n'est que très peu augmentée. Ainsi, la brillance est fortement augmentée, passant de 35 à 134 GM et l'exaltation de la TP-2PyO est de 68 au lieu de 15.2 pour la TP-2Py. A l'inverse, le changement de la TP-3Py vers la TP-3PyO est moins bénéfique. Le rendement quantique de fluorescence est multiplié par huit alors que la section efficace d'absorption à deux photons est diminuée par deux (de 1640 à 910 GM). Mais ceci est compensé par une plus forte exaltation de la fluorescence. Le changement de l'accepteur pyridinium par un benzimidazole est particulièrement bénéfique pour les deux branches. Le rendement quantique de fluorescence de la TP-2Bzim atteint 0.73 ce qui correspond à dix fois le rendement quantique de fluorescence de la TP-2Py (0.08). Le transfert de charge est plus important pour la TP-2Bzim impliquant une plus forte section efficace d'absorption à deux photons (134GM). L'amélioration du rendement quantique de fluorescence et de la section efficace d'absorption à deux photons font fortement augmenter la brillance.

Pour la TP-2Bzim celui-ci atteint plus de 516 GM. Cette brillance est très supérieure à celle des composés communément utilisés en microscopie.

De façon assez surprenante, l'amélioration des propriétés optiques est tout aussi grande pour la TP-3Bzim, contrairement aux autres dérivés "3 branches". La brillance obtenue est de 480 GM soit un peu moins que la TP-2Bzim avec cependant une exaltation de fluorescence plus faible (53.7 pour TP-2Bzim et 78.6 pour TP-3Bzim). Ceci est en accord avec les précédents résultats, nous

avons vu que les molécules à deux branches possédaient une meilleure affinité pour l'ADN.

Pour résumer, d'un point de vu "brillance", les meilleurs fluorophores sont la TP-2Bzim ($\sigma_{2p} \phi_f=516GM$), la TP-3Bzim (480GM) suivis de la TP-2PyO (134GM) et la CBZ-2Py (121GM). Néanmoins, la CBZ-2Py a un émission trop dans le jaune (545nm). En dernière, on trouve la TP-2Py (35GM). En passant de la TP-2Py à la TP-2Bzim, nous avons multiplié la brillance ($\sigma_{2p} \phi_f$) par 15.

Étant données leurs propriétés assez exceptionnelles, ces molécules ont été évaluées par un biologiste. J-Y Thuret de la DSV a testé ces molécules en cellules fixées. Ces quatre molécules marquent l'ADN et le noyau avec un excellent contraste, aucun bruit de fond et une bonne sélectivité pour l'ADN. Les images de l'ADN marqué par la TP-2Bzim montrent une grande finesse de marquage (on observe les bandes caractéristiques des chromosomes, flèches blanches sur la figure 66). On observe les même détails qu'avec les fluorophores usuels sauf que la puissance nominale est quatre fois plus faible.

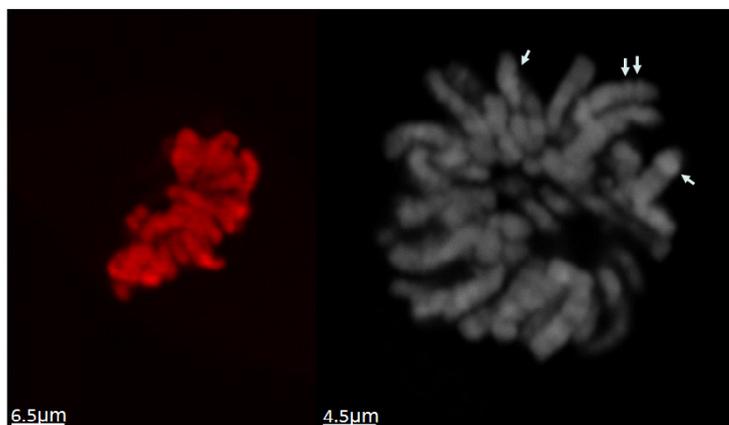


FIGURE 66 – Image de gauche obtenue par microscopie à deux photons sur des cellules MRC-5 fixées ($2\mu M$ en fluorophore, $\lambda_{ex} = 780nm$, $\lambda_{em} \sim 520 - 750nm$), image codée en fausses couleurs. Cellule métaphasiques obtenue par microscopie confocale (30mW Ar/Ne Laser (458nm, 477nm, 488nm, 514nm, 543nm), 5mW 543nm laser, 5mW 633nm laser) et sous lampe blanche (50W Hg)

En plus, ceux-ci disposent d'un stabilité supérieure aux fluorophores couramment utilisés en microscopie (iodure de propidium et le TO-PRO3). Des expériences de photostabilité en cellules ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour les TP-Py. A l'exception de la TP-2Bzim, la photostabilité de la TP-2PyO, TP-3PyO et de la TP-3Bzim est supérieure à celle de l'iodure de propidium. Alors que la TP-2Bzim a une stabilité du même ordre de grandeur que l'iodure de propidium.

L'effet cytotoxique de ces composés est en cours d'étude.

5 Conclusion

Pour optimiser les propriétés optiques des triphénylaminés pyridinium TP-2Py et TP-3Py, nous avons exploré deux voies différentes. Dans un premier temps, nous avons cherché à augmenter le nombre d'électrons- π du cœur de la molécule. Avec les trinaphthylamines, nous avons fortement augmenté la section efficace d'absorption à deux photons. Néanmoins, nous avons constaté que ce changement de structure entraîne une perte de l'affinité de la molécule pour l'ADN.

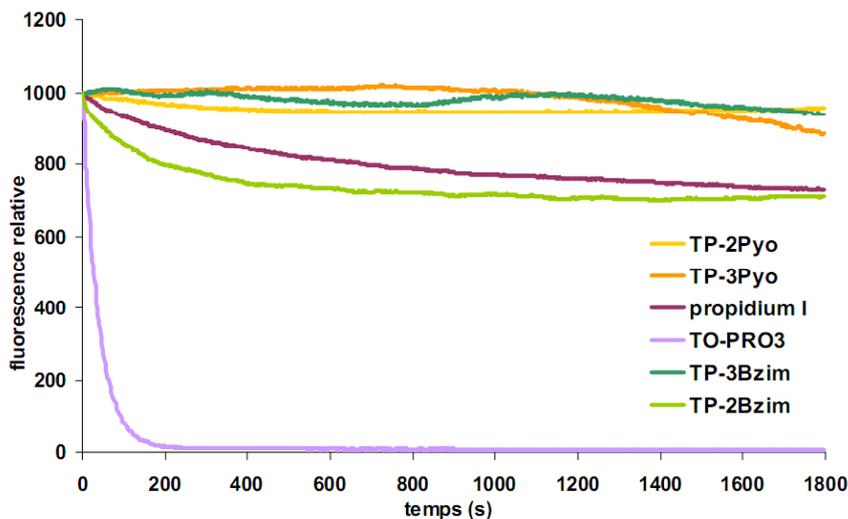


FIGURE 67 – Photostabilité sous microscope confocal, *TO-PRO3* ($2\mu\text{M}$, $\lambda_{exc} = 633\text{nm}$, $\lambda_{em} = 650 - 750\text{nm}$), *Puissance incidente* $2\mu\text{M}$ ($\lambda_{exc} = 561\text{nm}$, $\lambda_{em} = 580 - 750\text{nm}$), *TPs* ($2\mu\text{M}$, $\lambda_{exc} = 488\text{nm}$, $\lambda_{em} = 520 - 750\text{nm}$).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à rigidifier le cœur de la molécule. Les fluorophores à cœur carbazole ont ainsi permis d'obtenir de bonnes sections efficaces accompagnées d'une augmentation du rendement quantique de fluorescence. Malheureusement, ces fluorophores n'émettent plus dans le rouge mais plutôt dans le jaune, soit à des longueurs d'ondes assez fortement absorbées dans le vivant ce qui réduit l'intérêt de ces molécules.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'influence de modifications sur les groupements accepteurs. La TP-2PyO et la TP-2Bzim sont les deux fluorophores les plus intéressants pour le marquage de l'ADN. Ceux-ci disposent d'une brillance proche de 500 GM (TP-2Bzim) ce qui est très largement supérieur aux marqueurs commerciaux et aux autres marqueurs développés en laboratoire (100GM). A noter que l'optimisation de la brillance est essentiellement liée à l'optimisation du rendement quantique de fluorescence (ϕ_f) alors que l'augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons reste relativement modeste.

Afin de mieux comprendre l'origine de la forte exaltation de fluorescence mesurée et de corrélérer l'influence de la structure des molécules à leurs propriétés, des études résolues en temps ont été menées pour caractériser l'interaction fluorophore/ADN. Ces études sont développées dans le chapitre suivant.

Quatrième partie

Étude de l'interaction fluorophore/ADN

Table des matières

1	Les dérivés TP dans l'ADN naturel (ADN de hareng)	89
1.1	A saturation	90
1.1.1	Les composés à deux branches	90
1.1.2	Les composés à trois branches	91
1.2	A différents équivalents d'ADN	92
1.3	Conclusion	93
2	Les TP-Pys dans un ADN synthétique (DrewAT)	94
2.1	A saturation	95
2.2	Évolution de la durée de vie des fluorophores à deux branches dans le DrewAT	96
2.3	Conclusion	97
3	Variation de la section efficace d'absorption à deux photons	98
3.1	Exaltation dans le DrewAT	98
3.2	Conclusion	100

1 Les dérivés TPs dans l'ADN naturel (ADN de hareng)

Précédemment, on a déterminé la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}) de différents dérivés TPs-Py. On en a déduit la brillance ($\sigma_{2p}\phi_f$) et identifié de nouvelles structures de molécules optimisées. Dans ce chapitre, il s'agit de comprendre l'origine de l'augmentation du produit ($\sigma_{2p}\phi_f$) en fonction des structures développées. Pour ce faire nous avons étudié les interactions fluorophores/ADN. Au delà des mesures d'intensité de fluorescence, des mesures complémentaires de dynamique du signal ont été mises en œuvre. Grâce au système que nous avons mis en place (voir chapitre II), nous avons mesuré les durées de vies de fluorescence de nos composées.

Toutes les mesures de durée de vie de fluorescence réalisées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées dans les mêmes conditions. Nous avons utilisé des concentrations en fluorophores comprises entre 1 et $100\mu\text{M}$, les concentrations d'ADN sont données en équivalents de paires de bases. Nous avons utilisé des densités de puissance laser incidentes crêtes de l'ordre de 1 à 5 GW/cm^2 ; après avoir vérifié au préalable que ces intensités ne dégradent pas les échantillons (signal de fluorescence stable au cours du temps). Afin de se focaliser uniquement sur les résultats, le détail des mesures effectuées et de leurs traitements est donné en annexe A.3.

Dans une première étape, nous avons mené des études systématiques sur l'influence de la présence d'ADN naturel de hareng, sur l'intensité de fluorescence des composés considérés. La première caractéristique de ces fluorophores est l'exaltation de fluorescence en présence d'ADN. La figure 68 rapporte les mesures systématiques de variation de fluorescence en fonction d'une proportion croissante en ADN. La courbe en pointillés indique les concentrations utilisées pour les mesures de sections efficaces d'absorption indiquées dans le chapitre précédent.

L'expérience consiste à mesurer l'intensité de fluorescence, par un spectrofluorimètre (excitation mono-photonique), après ajouts successifs d'ADN dans une solution de fluorophores de concentration connue ($1\mu\text{M}$). La concentration en fluorophores est maintenue constante pendant toute la durée de l'expérience. Dans l'oligonucléotide, les TPs-Bzim et les TPs-PyO possèdent une exaltation nettement supérieure à celles des TPs-Py. Si on exclut les TPs-Py, on constate que les composés à trois branches disposent de taux d'exaltation nettement inférieurs à leurs homologues à deux branches.

En excitation mono-photonique, l'intensité suit la relation suivante :

$$I_f(t) \propto \varepsilon C \phi_f \quad (42)$$

Or ε ne subit pas de modification significative en fonction du nombre d'ADN. Ainsi, la variation de fluorescence à un photon en présence d'ADN révèle les variations du rendement quantique de fluorescence. Grâce aux mesures d'exaltation de fluorescence, nous avons déterminé le rendement quantique de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents d'ADN.

À titre complémentaire, et pour avoir une caractérisation complète des processus radiatifs et non radiatifs des molécules considérées, nous avons effectué des mesures de durée de vies de fluorescence à saturation et en solution tampon.

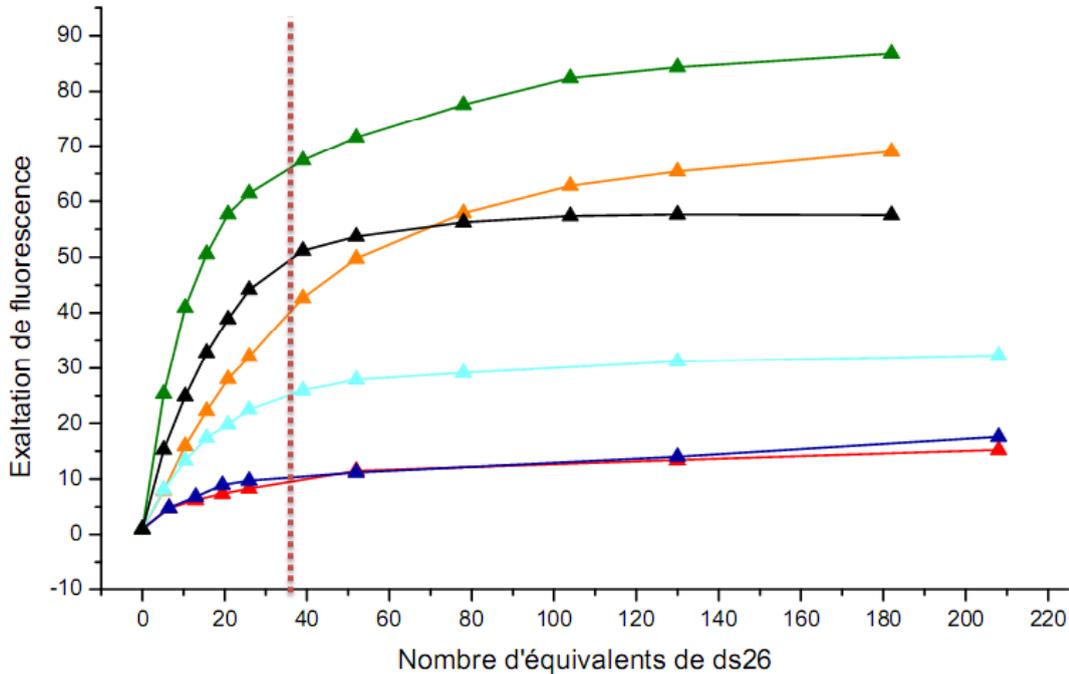


FIGURE 68 – Titrations des analogues de TP-Py [$1\mu\text{M}$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim) par l'oligonucléotide ds26 (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2) [86]. Le ds26 est un double brin de 26 paires de bases aléatoires, dont les propriétés sont comparables à celle de l'ADN naturel. Il s'agit de mesure de fluorescence suite à une excitation monophotonique.

1.1 A saturation

1.1.1 Les composés à deux branches

Nous avons mesuré les durées de vie de fluorescence des dérivés à deux branches à saturation (~ 35 équivalents en paires de bases d'ADN, cette proportion est indiquée par un trait en pointillé rouge sur la figure 68). Les durées de vie mesurées sont des durées de vie mono-exponentielles. Celles-ci sont résumé dans le tableau 6.

TABLE 6 – Propriétés de fluorescence des dérivés TPs à deux branches dans différentes solutions.

	solution	ϕ_f	A_1	τ_f (ns)	k_r (ns^{-1})	k_{nr} (ns^{-1})
TP-2Py	tampon	0.004	1	0.34	0.013	2.93
	à saturation	0.08	1	0.80	0.10	1.15
	glycerol	0.11	1	0.33	0.34	2.69
TP-2PyO	tampon	0.003	1	0.19	0.017	5.25
	à saturation	0.18	1	1.1	0.16	0.74
	glycerol	0.22	1	0.42	0.54	1.84
TP-2Bzim	tampon	0.006	1	0.44	0.014	2.26
	à saturation	0.73	1	2.35	0.31	0.11
	glycerol	0.36	1	1.00	0.36	0.64

Nous comparons les constantes radiatives (k_r) et non-radiatives (k_{nr}) obtenus pour les composés à deux branches dans une solution d'ADN, de tampon et de glycerol. Le glycerol est utilisé à titre complémentaire comme référence de solvant visqueux ($\eta=934$), menant a priori à une forte réduction des mouvements internes moléculaires à l'origine du déclin non radiatif de la fluorescence.

On remarque que le k_{nr} diminue lorsque l'on passe de la solution tampon à la solution d'ADN (à saturation). Cette tendance est également observée lors du passage d'une solution tampon au glycerol, mais dans une moindre mesure surtout pour la TP-2Py. Tout ce passe comme si la molécule se trouvait contrainte dans le double brins d'ADN. Néanmoins, l'interaction avec l'ADN entraîne de plus fortes variations du k_{nr} que l'interaction avec le glycerol. Par exemple dans le Glycerol $k_{nr} \times 0.25$ pour la TP-2Bzim alors que dans l'ADN la diminution est d'un facteur 10. Les variations de k_{nr} lors du passage tampon-ADN dépendent fortement des molécules. On peut attribuer ces variations à des différences d'interactions molécule/ADN. Nous y reviendrons ultérieurement. Autre point important à noter, c'est l'augmentation du k_r lorsque que l'on passe d'une solution tampon sans ADN à une solution tampon avec ADN ($k_r \times 10$ pour TP-2Py et TP-2PyO et $\times 30$ pour la TP-2Bzim). Ceci prouve qu'en plus de bloquer le fluorophore et de diminuer les voies de relaxations non radiatives, l'interaction fluorophore/ADN influence les voies de relaxation radiative.

Différentes hypothèses peuvent être évoquées.

1. L'interaction molécule-ADN induit une variation de l'environnement des fluorophores : passage d'un milieu aqueux propice au "quenching" à un milieu organique (base d'ADN)
2. L'interaction molécule-ADN entraîne une modification de la conformation des molécules.

Dans les deux cas, comme le prouvent les fortes variations observées d'une molécule à l'autre, la spécificité des interactions molécules-ADN semble jouer un rôle primordiale.

1.1.2 Les composés à trois branches

Nous avons également comparé les durées de vie de fluorescence des composés à trois branches.

TABLE 7 – *Propriétés de fluorescence des dérivés TP à trois branches dans différentes solutions.*

	solution	ϕ_f	A_1	τ_{f_1} (ns)	A_2	τ_{f_2} (ns)	$\langle \tau_f \rangle$ (ns)	k_r (ns^{-1})	k_{nr} (ns^{-1})
TP-3Py	tampon	0.0005	1	0.32	0	0.8	0.32	0.002	3.12
	à saturation	0.01	0.79	0.32	0.21	0.80	0.51	0.0196	1.94
	glycerol	0.12	1	0.31			0.31	0.41	2.82
TP-3PyO	tampon	0.00278	1	0.25			0.25	0.011	3.99
	à saturation	0.08	1	1.27			1.27	0.063	0.72
	glycerol	0.22	1	0.33			0.33	0.66	2.37
TP-3Bzim	tampon	0.00591	1	0.28			0.28	0.021	3.55
	à saturation	0.38	1	2.03			2.03	0.19	0.30
	glycerol	0.41	1	0.79			0.79	0.52	0.75

Tout d'abord, on remarque que la TP-3Py est la seule molécule disposant d'une durée de vie de fluorescence à deux composantes. On notera cependant que sa durée de vie moyenne ($\langle \tau_f \rangle$) est globalement identique quelque soit le solvant.

A l'image de cette molécule, on remarque globalement que pour tous les dérivés à trois branches la réduction du k_{nr} est légèrement moins marquée que pour les composés à deux branches. De plus l'exaltation de k_r est nettement moins marquée lorsque l'on passe de la solution tampon sans ADN

à une solution tampon avec ADN. En effet, les composés à trois branches possèdent une géométrie différentes de celles des composés à deux branches. La troisième branches reste en milieu tampon ce qui peut être source de quenching.

De façon surprenant, le dérivé TP-3Bzim possède des propriétés très proche de son analogue à deux branches.

Par la suite nous avons étudié plus précisément l'influence du nombre d'équivalent d'ADN sur la durée de vie de fluorescence en fonction du nombre relatif et de la spécificité de sites de fixation éventuels. Nous nous limiterons au cas des fluorophores à deux branches.

1.2 A différents équivalents d'ADN

La figure 69 consigne les durées de vie mesurées pour chaque fluorophore en fonction du nombre d'équivalents d'ADN de hareng.

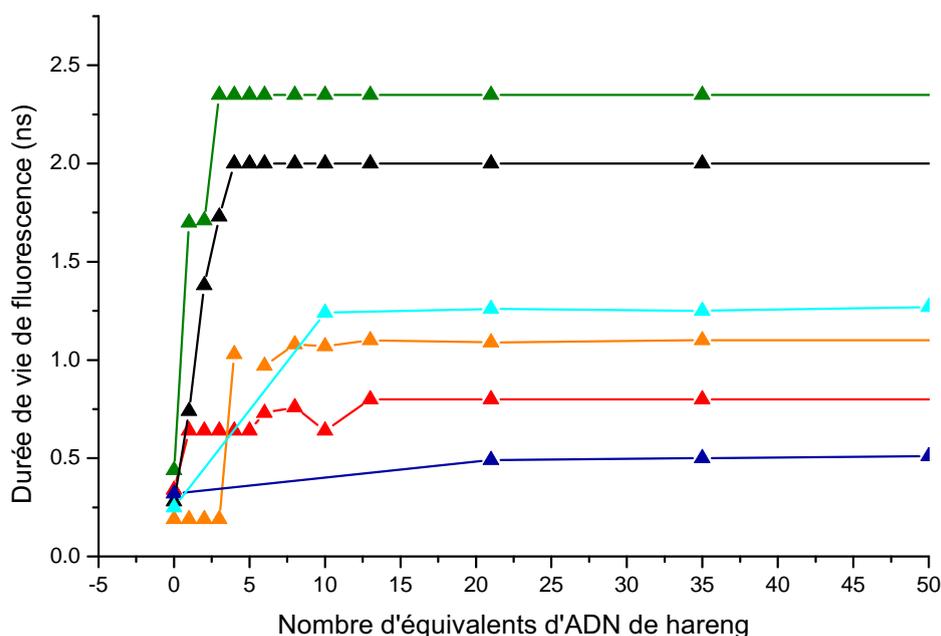


FIGURE 69 – Variation des durées de vie de fluorescence des composés en fonction du nombre d'équivalents d'ADN de hareng (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim).

Sur la figure 69, on remarque que le passage d'une durée de vie courte à une durée de vie longue s'effectue très en deçà de la concentration limite nécessaire pour observer une saturation de l'exaltation de fluorescence (~ 35 equ). Le plateau est atteint très rapidement par les TPs-Bzim, plus lentement par les TPs-PyO et très lentement par les TPs-Py. Les variations de durées de vie de fluorescence ne suivent pas les mêmes évolutions que les courbes d'exaltation de fluorescence (voir figure 68). Intuitivement, on peut considérer que les fluorophores peuvent évoluer dans différents environnements menant chacun à des propriétés de fluorescence particulières :

- hors ADN (tampon),
- dans l'ADN via une interaction non-spécifique (non-spécifique),
- dans l'ADN via une interaction spécifique (spécifique).

Par conséquent, on pourrait s'attendre à une dépendance du signal de fluorescence selon trois composantes.

$$I_f(t) \propto \sigma_{2p_1} C_1 \phi_{f_1} e^{-\frac{t}{\tau_{f_1}}} + \sigma_{2p_2} C_2 \phi_{f_2} e^{-\frac{t}{\tau_{f_2}}} + \sigma_{2p_3} C_3 \phi_{f_3} e^{-\frac{t}{\tau_{f_3}}} \quad (43)$$

1 : interaction avec le tampon, 2 : interaction non-spécifique, 3 : interaction spécifique ; et σ_{2p_i} représente la section efficace du fluorophore dans l'environnement i , C_i la concentration de fluorophore dans l'environnement i et τ_i la durée de vie de fluorescence ($i=1,2,3$).

Néanmoins, lorsque l'on regarde le tableau 8, où l'on a choisi les concentrations les plus représentatives, on remarque que les trois composantes ne sont jamais mesurées en même temps.

TABLE 8 – Propriétés de fluorescence des dérivés TP à deux branches dans l'ADN de hareng à différentes concentrations.

	solution	ϕ_f	A_1	τ_{f_1} (ns)	A_2	τ_{f_2} (ns)	A_3	τ_{f_3} (ns)	$\langle \tau_f \rangle$ (ns)	k_r (ns ⁻¹)	k_{nr} (ns ⁻¹)
TP-2Py	0 equ	0.0045	1	0.34					0.34	0.013	2.93
	6 equ	0.08			0.48	0.64	0.52	0.8	0.73	0.11	1.26
	80 equ	0.08					1	0.8	0.8	0.10	1.15
TP-2PyO	0 equ	0.00318	1	0.19					0.19	0.017	5.25
	8 equ	0.18	0.12	0.19	0.88	1.1			1.08	0.17	0.77
	80 equ	0.18			1	1.1			1.10	0.16	0.74
TP-2Bzim	0 equ	0.00622	1	0.44					0.44	0.014	2.26
	2 equ	0.73			0.67	1.12	0.33	2.35	1.71	0.43	0.16
	80 equ	0.73			0.15	1.12	0.85	2.35	2.25	0.32	0.12

Ceci peut s'expliquer par la grande différences entre les rendements quantiques de fluorescence du fluorophore libre, du fluorophore bloqué (spécifique), du fluorophore lié à l'ADN mais hors sillon (non-spécifique). Notamment, il apparait que la contribution du signal provenant des molécules dans le tampon devient négligeable dès l'existence de quelques molécules en interaction avec l'ADN.

1.3 Conclusion

Lorsque l'on passe de la TP-2Py à la TP-2Bzim, on a vu que la brillance $\sigma_{2p}\phi_f$ avait fortement augmenté. Les mesures de vie de fluorescence ont mis en évidence que cette augmentation était en partie due à la forte diminution du taux de décroissance non radiatif (k_{nr}). Cette modification du k_{nr} a des effets très variable d'une molécule à l'autre, malgré des structures moléculaires relativement proches. Ceci semble attester de l'importance de la spécificité des interactions fluorophores-ADN. En plus de la variation du k_{nr} , on observe une augmentation très forte du taux de relaxation radiative (k_r). La TP-2Bzim étant la molécule dont la constante de relaxation radiatives (k_r) est maximale en présence d'ADN Les variations relatives de k_r et k_{nr} selon les molécules doivent être liées aux différents types d'interactions fluorophores/ADN. Celles-ci peuvent être de différentes natures (spécifiques et non-spécifiques). Afin d'approfondir les effets de ces différents types d'interactions, l'étape suivante a consisté à renouveler les expériences précédemment décrites dans le cas d'une structure d'ADN bien définie : le DrewAT, bien connu comme structure modèle de petit sillon.

2 Les TP-Pys dans un ADN synthétique (DrewAT)

Le DrewAT est un duplex double brin, possédant 14 paires de bases, de séquence autocomplémentaire 5'-CGCGAAATTTTCGCG-3'. Le Drew est un duplex de 12 paires de bases qui a été le premier duplex d'ADN à être synthétisé (Drew-Dickenson-dodecane) [95]. Nous utilisons ici un DrewAT modifié qui possède 6 paires de base AT en position centrale et qui a été utilisé dans des études antérieures pour la modélisation de la fixation de ligands de petit sillon [96]. Ce système modèle nous permet de créer un seul site de fixation spécifique et donc de pouvoir rationaliser les mesures photophysiques (temps de vie, rendement quantique de fluorescence, section efficace d'absorption à deux photons). La figure 70 présente les mesures d'exaltation enregistrées dans le DrewAT. Celles-ci ont été réalisées selon le même protocole que pour les mesures précédemment effectuées dans l'ADN naturel de hareng (figure 68).

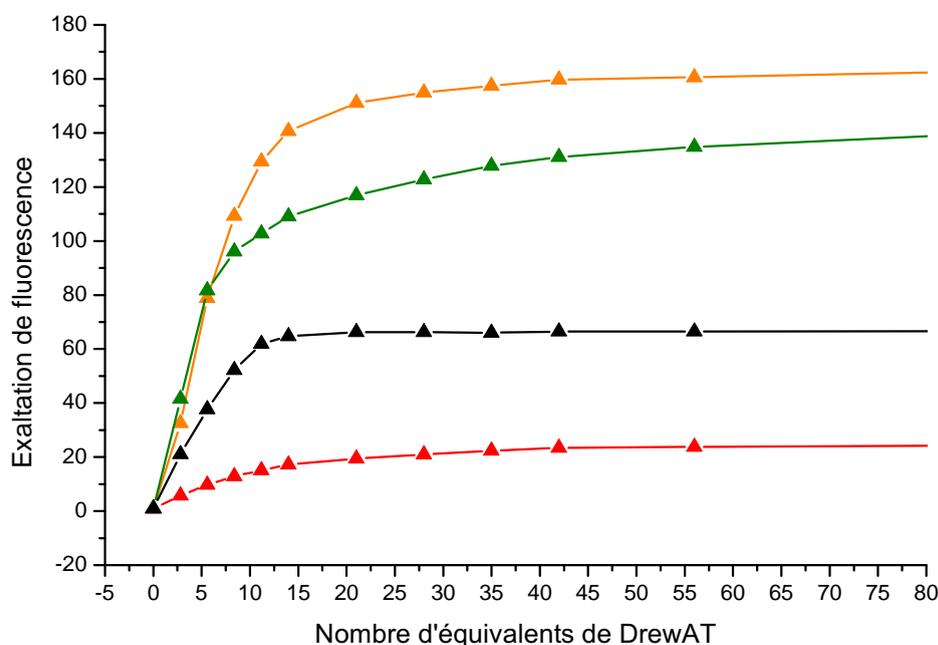


FIGURE 70 – Titrations des analogues de TP-Py [$1\mu\text{M}$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim) dans le DrewAT (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2).

Comme pour l'ADN de hareng, le facteur d'exaltation de la TP-2Py est le plus faible. Celui-ci est proche de 15, ce qui est sensiblement identique à la valeur obtenue dans l'ADN naturel. La TP-2PyO a un facteur d'exaltation deux fois plus grand dans le DrewAT que dans l'ADN de hareng. Faisant de la TP-2PyO, le fluorophore ayant la plus forte exaltation de fluorescence dans le DrewAT. La TP-2Bzim, de même que la TP-3Bzim, a un facteur d'exaltation identique aux incertitudes de mesures près dans la DrewAT et l'ADN de hareng. L'exaltation de fluorescence des TP-2Py et TP-2Bzim étant analogue dans l'ADN naturel et dans le DrewAT, on en déduit l'existence d'interactions déjà très spécifiques entre ces molécules et l'ADN naturel. L'interaction des TP-2Py et TP-2Bzim sont fortement spécifiques même en présence d'ADN naturel. A l'inverse la TP-2PyO a une exaltation de fluorescence qui est plus forte dans le DrewAT qui pourrait résulter

d'interactions non spécifiques (électrostatique en surface, géométrie mal définie, insertion partielle dans le sillon) minimisées.

Au delà de l'évaluation du rendement quantique de fluorescence en fonction de l'ADN, les courbes de la figure 70 sont utilisées pour évaluer l'affinité des différents fluorophores considérés (voir colonne "affinité" du tableau 9). On remarque que ce n'est pas forcément la molécule qui a la plus grande affinité pour l'ADN (TP-2Bzim) qui possède le plus grand facteur d'exaltation. Dans le facteur d'exaltation apparaît le poids relatif des contributions de fluorescence de chaque interaction (spécifique, non-spécifique, tampon).

2.1 A saturation

Le tableau 9 présente les durées de vie de fluorescence obtenues au plateau.

TABLE 9 – Propriétés de fluorescence des dérivés TP à deux branches à saturation, dans le DrewAT.

	ϕ_f	A	τ_f (ns)	k_r (ns ⁻¹)	k_{nr} (ns ⁻¹)	D_r (m ² .s ⁻¹)	affinité
TP-2Py	0.07	1	0.67	0.10	1.39	0.017	1.1 10 ⁶
TP-2PyO	0.22	1	1.69	0.13	0.46	0.037	0.85 10 ⁶
TP-2Bzim	0.54	1	2.35	0.23	0.2	0.004	4.4 10 ⁶

En observant ce tableau, on remarque qu'en présence d'ADN, les trois fluorophores ont des durées de vie mono-exponentielles (comme dans l'ADN de hareng). La durée de vie de fluorescence de la TP-2Py est de 0.67 ns, celle de la TP-2PyO de 1.7 ns et celle de la TP-2Bzim de 2.35 ns. La TP-2Py a la même durée de vie dans le DrewAT et dans l'ADN. On peut supposer qu'elle interagit de la même façon avec le DrewAT et l'ADN. Ainsi, on peut dire que la TP-2Py s'insère vraisemblablement dans le petit sillon. Cette remarque est aussi valable pour la TP-2Bzim, où la durée de vie de fluorescence dans le DrewAT est identique à celle mesuré dans l'ADN de hareng. A l'inverse, la TP-2PyO a une durée de vie plus longue dans le DrewAT ($\tau_f = 1.69ns$) que dans l'ADN de hareng ($\tau_f = 1.10ns$). Lorsqu'un fluorophore est dans le sillon de l'ADN, celui-ci est isolé du solvant et ces mouvements sont contraint (k_{nr} plus faible et τ_f plus long). Sa durée de vie est plus longue que lorsque le fluorophore est en interaction non-spécifique avec l'ADN. On peut supposer que dans notre modèle de DrewAT, la TP-2PyO s'insère dans le petit sillon mais en revanche s'insère dans l'ADN naturel par interaction non-spécifique.

Pour compléter ces mesures, nous avons mesuré la durée de vie d'anisotropie de fluorescence (τ_r). Ces mesures, détaillées dans l'annexe B.4, nous ont permis de déduire le coefficient de diffusion rotationnel (D_r). Sur le tableau 9, on remarque que le coefficient rotationnel de la TP-2Bzim est le plus faible, ce qui est concordant avec les mesures d'affinité. En effet, la molécule va s'insérer dans le petit sillon et va être bloquée, réduisant fortement ses degrés de liberté et donc ses voies de relaxation non radiative. Les mesures de coefficient de diffusion rotationnel ne prennent en compte que le marquage spécifique (celui-qui bloque le plus la molécule).

Afin d'obtenir de plus amples informations sur ces interactions, nous avons étudié la durée de vie de fluorescence en fonction du nombre d'équivalent de DrewAT.

2.2 Évolution de la durée de vie des fluorophores à deux branches dans le DrewAT

La figure 71 présente l'évolution de la durée de vie de fluorescence du signal enregistré pour les fluorophores à deux branches en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT et d'ADN de hareng. En traits pointillés sont indiquées les durées de vie de fluorescence des dérivés TP dans le DrewAT et en traits continus sont rappelées les durées de vie de fluorescence dans l'ADN de hareng.

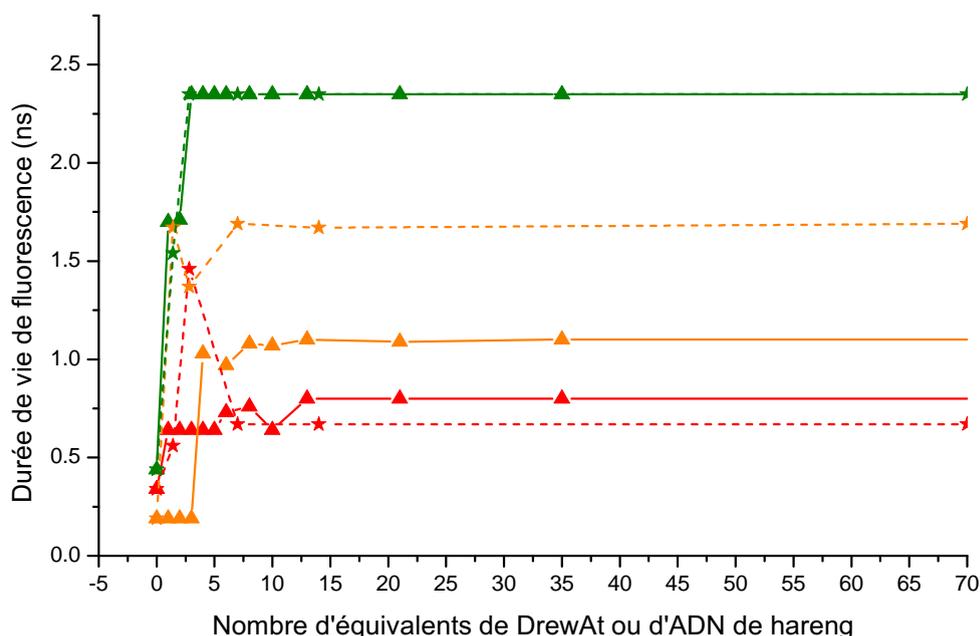


FIGURE 71 – Variation des durées de vie de fluorescence des composés à deux branches (en rouge : TP-2Py, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim) en fonction du nombre d'équivalents d'ADN de hareng ou de DrewAT. En pointillés, les durées de vie dans le DrewAT; en traits continus, les durées de vie dans l'ADN de hareng.

La dynamique de marquage de la TP-2Py et de la TP-2Bzim dans le DrewAT est identique à celles obtenues dans l'ADN.

Pour la TP-2Py et la TP-2Bzim, on note que dès la présence d'une très faible proportion d'ADN (1 equ) la durée de vie de fluorescence du signal mesuré correspond à la durée de vie du signal mesuré "à saturation". Ceci peut avoir deux raisons possibles :

- forte spécificité des interactions entre l'ADN et ces composés,
- la principale contribution au signal provient des molécules interagissant spécifiquement avec l'ADN (en d'autres termes les interactions non spécifiques donnent lieu à un signal négligeable).

Bien que l'affinité de la TP-2PyO soit proche de celle de la TP-2Py, l'évolution de la durée de vie est différente. Dans le cas du DrewAT, celle-ci suit la même évolution que la TP-2Py et la TP-2Bzim. Mais dans le cas de l'ADN naturel de hareng, l'évolution apparaît relativement lente. La durée de vie "maximale" n'est observée qu'à partir de 5 équivalents en paires de bases d'ADN. Ceci semble indiquer l'existence d'interactions TP-2PyO/ADN non spécifiques dans le cas

de l'ADN naturel. Ces interactions non spécifiques donnent visiblement lieu à des contraintes moins importantes sur les molécules ($k_{nr}=0.74$ dans ADN naturel et $k_{nr}=0.46$ dans le DrewAT) ce qui implique des durées de vie de fluorescence mesurées différentes.

2.3 Conclusion

L'observation des caractéristiques de fluorescence des fluorophores en présence d'ADN naturel ou de synthèse, nous a permis de classer les fluorophores selon leurs types d'interactions avec l'ADN.

Globalement les études effectuées dans le DrewAT confirment les études effectuées dans l'ADN naturel. Elles confirment que l'interaction fluorophores/ADN entraîne à la fois une modification de k_r vraisemblablement due à une modification de l'environnement des fluorophores ou de leur conformation et de façon encore plus marquée à une forte diminution de k_{nr} .

On observe assez peu de différence (durée de vie de fluorescence, exaltation de fluorescence) entre l'ADN naturel et le DrewAT pour les molécules TP-2Py et TP-2Bzim. Ceci confirme la spécificité des interactions de ces molécules pour l'ADN contrairement au cas des composés TP-2PyO qui semblent majoritairement agir par interactions non spécifiques dans l'ADN naturel.

Dans le cas de la TP-2PyO, l'augmentation de la durée de vie de fluorescence (et diminution du coefficient de diffusion rotationnel) dans le cas de l'utilisation de DrewAT souligne l'importance de la spécificité des interactions. Dans le cas du DrewAT qui présente des sites de fixation spécifique : notamment l'existence d'un petit sillon, on note une augmentation de la durée de vie de fluorescence associée à une diminution de k_{nr} et à une forte exaltation de fluorescence. Lorsque l'on privilégie les interactions spécifiques, on améliore ainsi les propriétés de marquage. Les plus fortes exaltation de fluorescence proviennent a priori de l'insertion de molécules dans le petit sillon de l'ADN.

L'insertion spécifique fluorophore/ADN est d'ailleurs particulièrement quantitative dans le cas des structures TP-2Py et TP-2Bzim (pas de variation globale des propriétés lors du passage d'ADN naturel vers le DrewAT) Néanmoins, cette insertion dans le petit sillon de l'ADN pourrait modifier la conformation de l'ADN ou du fluorophore et donc leur section efficace d'absorption à deux photons

Dans la partie suivante, nous allons déterminer les variations de la section efficace d'absorption à deux photons.

3 Variation de la section efficace d'absorption à deux photons

3.1 Exaltation dans le DrewAT

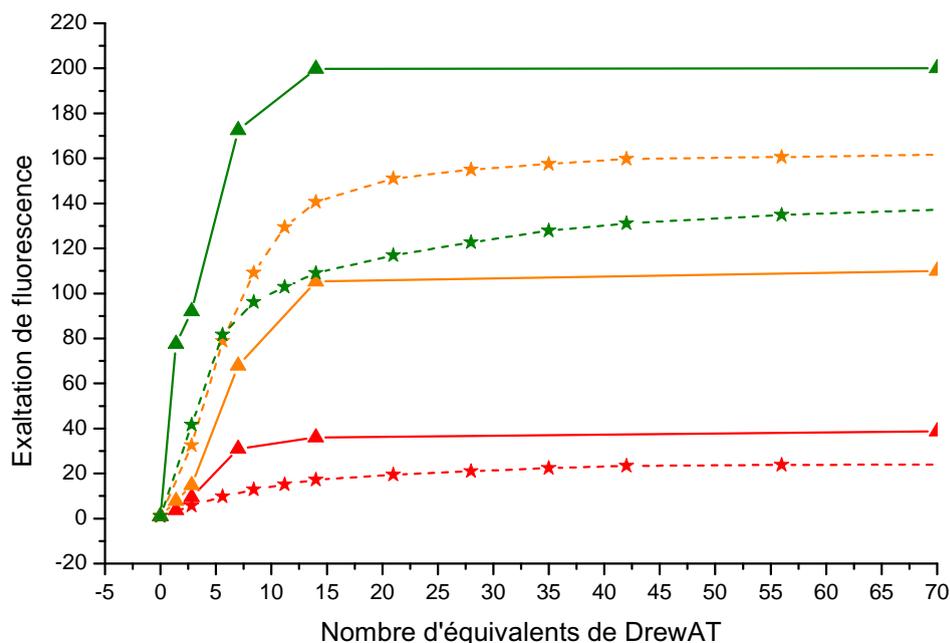


FIGURE 72 – Mesure des facteurs d'exaltation de fluorescence des composés à deux branches (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en vert : la TP-2Bzim) en excitation biphotonique (Δ) et en excitation mono-photonique (\star).

On remarque que la dynamique des facteurs d'exaltation est différentes en excitation mono- et bi-photonique. Pour les molécules qui marquent majoritairement le petit sillon (TP-2Py et TP-2Bzim), on remarque des facteurs d'exaltation est globalement très proches. A l'inverse, la TP-2PyO qui ne marquait pas préférentiellement le petit sillon, présente un facteur d'exaltation plus important lors d'une excitation mono-photonique. A partir de cette constatation, nous nous sommes demandés si l'insertion de molécule dans l'ADN ne donnait pas également lieu à un changement de conformation de la molécule susceptible d'entraîner une variation de ses propriétés d'absorption à deux photons. Par ailleurs, on peut penser que lorsque la molécule passe d'un environnement aqueux (tampon) à un environnement organique (bases d'ADN), outre un changement de conformation éventuel de la molécule, on peut avoir une variation du transfert de charges intramoléculaire (voir equation 42). Nous avons donc déterminé l'évolution de σ_{2p} en considérant les données d'exaltation de fluorescence à un photon d'où a été déduite la variation du rendement quantique de fluorescence, des données d'exaltation de fluorescence à deux photons ($\propto \sigma_{2p}\phi_f$)

Quel que soit le composés considéré, à saturation, c'est a dire en excès de sites de fixation spécifiques, on observe une relative augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons ($\frac{\sigma_n}{\sigma_0}$) d'un facteur 1.5 à 2.

De façon a priori plus inattendue, entre 1 et 14 équivalents c'est a dire dans le cas d'un excès de molécules par rapport aux sites de fixation spécifiques, on constate pour la TP-2Py et la TP-

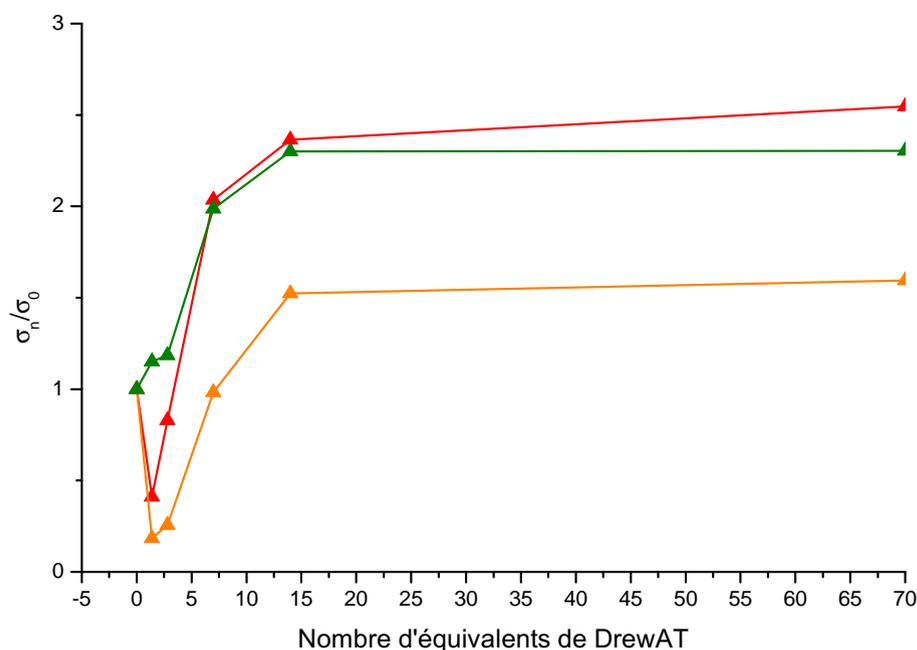


FIGURE 73 – Variation du rapport sections efficace d'absorption à deux photons ($\frac{\sigma_n}{\sigma_0}$) des composés à deux branches [$1\mu M$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO et en vert : la TP-2Bzim) en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT.

2Bzim, une diminution de la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}) par rapport à la valeurs obtenue dans le tampon. Une des hypothèses possibles est la suivante : dans cette gamme de longueurs de proportions d'ADN, les interactions non spécifiques sont a priori favorisées (interaction purement électrostatiques notamment), celles-ci peuvent donner lieu à des déformations de la structure de la molécule d'où une diminution de la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}). De façon assez logique d'ailleurs par rapport à cette hypothèse, la diminution de la section efficace d'absorption à deux photons n'est pas observée pour les composés TP-2Bzim qui présentent, au vu des études précédemment discutées, une forte affinité spécifique pour l'ADN.

Des études complémentaires devraient être menées pour confirmer l'hypothèse précédemment discutée. On notera par exemple que les mesures de σ_{2p} présentées sur la figure 73, sont issues de mesures d'intensité de fluorescence effectuées à une seule longueurs d'onde. Ainsi, il serait notamment intéressant d'effectuer des mesures complémentaires à d'autres longueurs d'onde d'excitation de façon à s'assurer que les variations de σ_{2p} observées ne sont pas également dues à des variations éventuelles de résonance des fluorophores selon leur environnement (tampon ou ADN). Il pourrait également être intéressant de compléter ces mesures par des études utilisant des brins d'ADN ayant un autre type de structure.

3.2 Conclusion

Dans le chapitre précédent, l'optimisation des TPs-Py a permis d'augmenter fortement la brillance ($\sigma_{2p}\phi_f$) en présence d'ADN.

On a montré que l'augmentation du produit $\sigma_{2p}\phi_f$ était corrélé à la fois à l'augmentation de la constante radiative (k_r) et à la diminution de la constante non radiative (k_{nr}). L'amélioration du k_r est à lier à un changement de l'environnement associée à l'insertion de la molécule dans l'ADN induisant éventuellement un changement de conformation. La diminution du k_{nr} est issu du blocage des modes de relaxation non radiatif (mouvement intramoléculaire).

On a vu aussi que l'exaltation de fluorescence est beaucoup plus marquée pour les fluorophores à deux branches car elles s'insèrent totalement dans le petit sillon de l'ADN. L'augmentation du k_r et la diminution du k_{nr} sont très restreintes dans le cas des fluorophores à trois branches, étant donnée leur insertion partielle dans le petit sillon.

L'augmentation de la brillance est d'autant plus importante que l'interaction fluorophore/ADN est spécifique. Les composés TP-2Bzim possèdent visiblement une affinité conséquente pour le petit sillon de l'ADN, ceux-ci disposent d'une brillance extrêmement importante (512 GM). Pour une même structure de cœur, la TP-2Bzim a des propriétés largement supérieures à la TP-2Py.

L'insertion du fluorophore dans le petit sillon d'ADN (interaction spécifique) mène non seulement à une augmentation du rendement quantique de fluorescence (ϕ_f) mais également à un gain de la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p}). Alors que toute interaction non spécifique mène à une diminution de la section efficace d'absorption à deux photons.

Cette optimisation a été conforté par les mesures de durée de vie de fluorescence et par l'augmentation de la constante radiative (k_r)

Le tableau suivant résume les propriétés photophysiques des composés à deux branches dans l'ADN.

TABLE 10 – Propriétés photophysique des dérivés TPs à deux branches dans l'ADN, à saturation (40 équivalents).

	ϕ_f	ε	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Facteur d'exaltation		σ_{2p} (GM)	$\langle\tau_f\rangle$ (ns)	k_r (ns^{-1})	k_{nr} (ns^{-1})
					1 photon	2 photons				
TP-2Py	0.08	31400	509	656	20	38	450	0.8	0.10	1.15
TP-2PyO	0.18	41500	478	627	180	105	760	1.10	0.16	0.74
TP-2Bzim	0.73	44400	476	585	140	200	710	2.35	0.31	0.11

Notre montage optique a permis la caractérisation des effets d'interactions molécule/ADN à l'échelle de la longueur d'onde. Au vu des discussions précédentes, il apparait intéressant de mener des expériences complémentaires en champ proche. Le STM étant aujourd'hui l'instrument de choix pour atteindre de très hautes résolutions (jusqu'à la résolution atomique). Nous avons choisi cet outil pour :

1. Caractériser les modification éventuelles du double brin selon la présence ou non de la molécule.
2. Voir dans quelle mesure on pourrait caractériser la conformation des molécules au sein du double brin d'ADN.

Cinquième partie

Le microscope à effet Tunnel (STM)

Table des matières

1	Principe de fonctionnement	103
1.1	L'effet Tunnel	103
1.2	STM mis en œuvre au laboratoire	105
1.2.1	Fonctionnement du STM	105
1.2.2	La pointe	106
1.2.3	Le STM à l'interface liquide/solide	106
1.2.4	le STM sous Ultra Vide	107
2	Le Substrat	108
2.1	La face (111) de l'or	109
2.2	Préparation du substrat	109
2.3	Maitrise des paramètres de dépôts	110
2.3.1	La vitesse de dépôts de l'Au	110
2.3.2	Le dégazage du mica	111
2.3.3	La pression dans la chambre d'évaporation	111
2.3.4	La composition des pièces se trouvant dans le bâti	112
2.3.5	Le flamage de l'échantillon	112
3	Conclusion	113

Depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN [4], l'observation de l'ADN avec une échelle atomique fut extrêmement difficile. Après la découverte du microscope à effet tunnel (STM), de nombreux articles ont rapporté l'observation de l'ADN [97, 98]. Dans certains d'entre eux, des images fortement résolues furent présentées en 1989-1990. L'ADN était adsorbé sur un substrat de HOPG (highly oriented pyrolytic graphite) par dépôt d'une goutte de solution contenant de l'ADN [99–101]. Cependant, des articles récents ont montré ensuite que ces images d'ADN n'étaient que des joints de grains du graphite [102, 103]. Ce n'est qu'en 1997 que le groupe de Kawai [104], a réussi les premières expériences de dépôt et d'observation convaincantes de l'ADN sur substrat de cuivre (111). Ils ont observé l'ADN sous un STM sous vide (UHV : Ultra High Vacuum), après avoir déposé l'ADN par vanne pulsée sur un substrat de Cu(111). L'ADN utilisé est un simple brin d'ADN extrêmement court (cinq Adénines). Dans la partie précédente, nous avons vu que nos fluorophores s'inséraient vraisemblablement dans le petit sillon de l'ADN. Afin d'obtenir des informations plus précises, nous nous sommes entrepris de mener des caractérisations complémentaires en microscopie à effet tunnel (STM) [105]. Le choix de la microscopie par effet tunnel s'est imposé car c'est le seul microscope à sonde locale qui permet d'obtenir la résolution atomique. Au laboratoire, nous disposons de deux systèmes de mesure par STM, un STM sous ultra-vide et un STM à l'interface liquide/solide. Le STM à l'interface liquide-solide a été utilisé pour contrôler les substrats d'or réalisés. Alors que l'ADN a été observé sous STM ultra-vide. Dans cette partie, nous allons exposer le principe de fonctionnement du STM et les spécificités des configurations utilisées. Puis, nous décrirons la réalisation de substrat d'Or atomiquement plan.

1 Principe de fonctionnement

1.1 L'effet Tunnel

Le STM est devenu un outil répandu dans le domaine des nanotechnologies, où il offre un large éventail d'utilisations (sous ultra-vide, sous atmosphère contrôlée, à l'interface liquide-solide, à différentes températures). Les inventeurs du STM, Binnig* et Rohrer† [105], chercheurs chez IBM, virent leurs efforts récompensés par l'attribution du prix Nobel en 1986. Le caractère très local de l'interaction entre la sonde et l'échantillon donne accès à des résolutions spatiales nanométriques pouvant aller jusqu'à la résolution atomique. Nous allons, grâce à cet instrument, caractériser l'interaction fluorophore/ADN à l'échelle nanométrique. Le STM permet d'accéder directement aux propriétés topographiques et électroniques locales d'une surface. Globalement, le principe du STM est le suivant : une pointe conductrice très fine est approchée si près de la surface d'un échantillon que les électrons peuvent passer de l'un à l'autre par effet tunnel.

La mise en évidence de l'effet tunnel est le résultat des travaux réalisés sur la mécanique quantique. En mécanique classique, une particule, qui n'a pas assez d'énergie E pour surmonter une barrière de potentiel de hauteur V_0 , reste indéfiniment bloquée du côté de la barrière où elle se trouve initialement. En mécanique quantique, par contre, la fonction d'onde associée à cette même particule n'est pas nulle de l'autre côté de la barrière. Il y a donc une certaine probabilité (d'autant plus grande que la barrière est petite) pour que cette particule franchisse la barrière, et ce même si son énergie est inférieure à V_0 , c'est ce que l'on appelle l'effet tunnel. Tout se passe comme si la particule emprunte un " tunnel " au travers de la barrière de potentiel. Dans une

*. Gerd Binnig (1947-)

†. Heinrich Rohrer (1933-)

première approche du fonctionnement d'un microscope à effet tunnel, on considère généralement deux électrodes polarisées, séparées par un isolant (par exemple le vide).

C'est à Tersoff et Hamann [106], sur la base de la théorie de Bardeen [107] sur l'effet tunnel, que l'on doit les premiers calculs " d'images par effet tunnel " sur les reconstructions de la surface d'au(110), à partir de considérations simples sur la géométrie de la pointe et sur la forme des fonctions d'onde en présence. Dans leurs travaux, la pointe est modélisée par un puits de potentiel sphérique (orbitale atomique s). La fonction d'onde Ψ_μ associée à la pointe s'écrit sous la forme :

$$\Psi_\mu \propto C e^{kr} \frac{e^{-k|r-r_0|}}{k|r-r_0|} \quad (44)$$

Sur la Figure 74, l'extrémité de la pointe est représentée comme une sphère de rayon R centrée en r_0 .

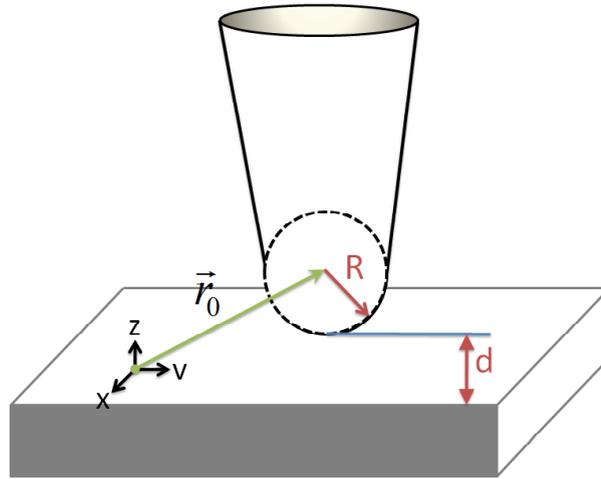


FIGURE 74 – Modèle de la pointe selon Tersoff et Hamann.

A partir de ces considérations, on peut montrer que le courant tunnel peut s'exprimer sous la forme :

$$I_{tunnel} \propto V D_{pointe}(E_F) R^2 k^{-4} e^{2kr} \rho(r_0, E_F) \quad (45)$$

Cette relation montre que le courant I_{tunnel} est proportionnel à la densité d'états de la pointe $D_{pointe}(EF)$, à la densité locale d'états de la surface $\rho(r_0, E_F)$, à la position de la pointe r_0 , au niveau de Fermi (E_F) et à la tension de polarisation ($k = \hbar^{-1} \sqrt{2m\phi}$, ϕ représente le travail de sortie des électrons, considéré comme étant le même pour la surface et la pointe). Les images STM représentent donc une mesure locale des courbes d'isodensités d'états au niveau de Fermi. Il convient de prendre en compte l'influence de cette densité d'états dans l'interprétation des images. De plus, cette théorie montre que la résolution latérale ne dépend que de la forme de la pointe. Dans un autre de ses écrits [108], Tersoff définit cette résolution latérale et l'exprime, tous calculs faits, sous la forme finale simple : $[2k - 1/(R+d)]^{1/2}$ où R et d sont exprimés en angströms et k en \AA^{-1} . Sous STM, il est possible d'imager des molécules isolantes, celles-ci vont modifier la barrière tunnel. Les molécules sont imagées sous une forte tension, typiquement de 500mV à 1500mV, et sous une faible intensité (comprise entre 5 et 100pA).

1.2 STM mis en œuvre au laboratoire

1.2.1 Fonctionnement du STM

Il existe deux modes "usuels" de fonctionnement pour un STM : le mode à courant constant et le mode à hauteur constante. Le mode à courant constant est utilisé pour étudier les surfaces les plus accidentées, car on souhaite alors pouvoir rétracter la pointe lorsqu'elle rencontre un obstacle important. Dans ce mode, un dispositif électronique contrôle et asservit le déplacement vertical de la pointe en comparant le courant tunnel collecté à une valeur de courant imposée comme référence ($I_{consigne}$) par l'expérimentateur. Ainsi, au cours du balayage, la position verticale de la pointe sera ajustée à chaque instant, afin de suivre le relief, en maintenant constante la distance pointe/iso-densité de surface, c'est à dire en maintenant la valeur du courant tunnel à sa valeur de consigne. L'image sera alors obtenue en enregistrant cette fois avec un ordinateur la position Z de la pointe en tout point de la surface. Il s'agit donc ici véritablement d'enregistrer la topographie d'iso-densité d'états de la surface. A l'inverse le mode hauteur constante est utilisé sur de petites aires extrêmement planes où l'on est sûr que la pointe ne rencontrera pas d'obstacle car ce n'est plus la position z de la pointe qui varie mais le courant tunnel enregistré par la pointe. Ce mode permet alors des vitesses d'acquisition supérieures.

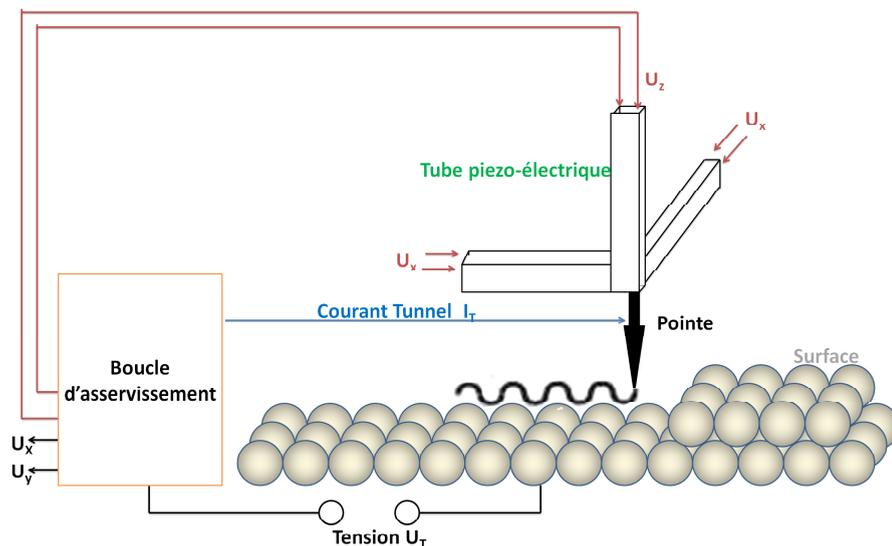


FIGURE 75 – Principe de fonctionnement du STM.

L'échantillon est déposé sur une table isolante acoustique à coussins d'air. Au-dessus de celui-ci est disposé un tripode sur lequel repose la tête de STM. La tête de STM est composée d'un tube piezo-électrique et d'un circuit électronique de conversion courant/tension. La pointe s'insère dans un porte-pointe solidaire du tube piezo. Lors de l'imagerie, le tube piezo se déforme pour permettre le déplacement de la pointe sur le substrat. La tension de polarisation est appliquée à de l'échantillon.

Nous allons décrire le type de pointe utilisée et les STM utilisés au cours de cette thèse :

- le STM à l'interface liquide/solide,
- le STM sous ultra-vide.

1.2.2 La pointe

Nous avons vu dans l'équation 45 que l'apex de la pointe joue un rôle important dans la résolution du STM. La mise en forme de la pointe est une étape importante avant toute image STM. Idéalement, la pointe doit avoir une forme effilée de sorte à avoir un atome en bout de pointe. Dans certains cas, des phénomènes de doubles pointes peuvent apparaître. Ce phénomène se caractérise alors par la présence d'une image fantôme. Il existe deux grandes voies de fabrications de pointes de STM :

- les pointes électrochimiques, celles-ci sont obtenues par attaque électrochimique d'un fil d'Or ou de platine-Iridium.
- les pointes obtenues par sectionnement, avec une pince, d'un fil de Platine-Iridium.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des pointes de Platine-Iridium réalisées par sectionnement d'un fil. Nous n'avons pas utilisé de pointes électrochimiques car ceci ne s'est pas révélé indispensable dans le cadre des objets étudiés. Selon la littérature, le taux de reproductibilité de cette méthode est faible alors qu'avec un peu de pratique l'obtention reproductible de pointes ayant un atome terminal est plus aisée par la deuxième méthode. La figure 76 montre deux images obtenues au microscope à balayage électronique (MEB).

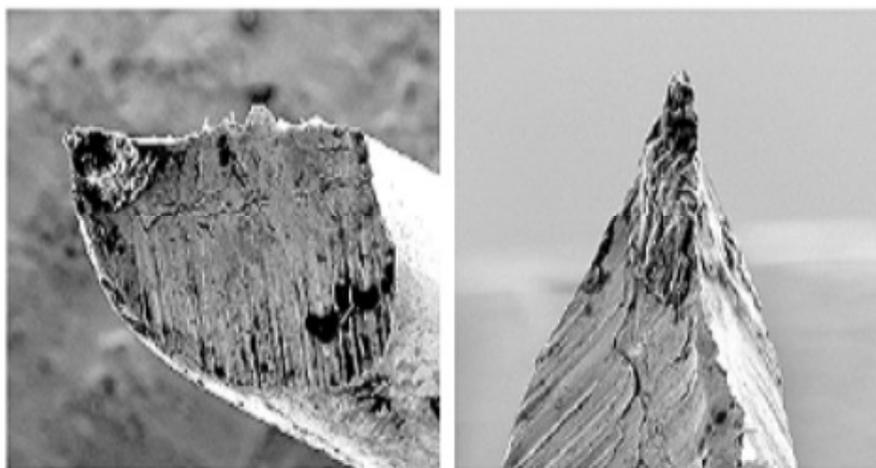


FIGURE 76 – Images MEB des pointes obtenues par sectionnement d'un fil de Platine-Iridium [109].

Les pointes ainsi réalisées disposent d'une forme fine et permettent de faire des images avec une bonne résolution. Les pointes sont par la suite soudées sur les portes-pointes du STM UHV ou disposées dans le porte-pointe du STM à l'interface liquide/solide.

1.2.3 Le STM à l'interface liquide/solide

Le STM à l'interface solide/liquide bénéficie d'une simplicité d'utilisation plus importante que le STM sous vide (pas de système de pompage). Le liquide, dans lequel sont solubilisées les molécules d'intérêt sert également d'enceinte de protection de la surface du substrat de l'environnement. Il permet aussi d'avoir un réservoir de molécules pouvant s'adsorber sur la surface. La monocouche déposée est due à un équilibre entre les molécules présentes en solution et celles qui sont adsorbées sur la surface (équilibre thermodynamique).

La figure 77 montre le dispositif expérimental du STM fonctionnant à l'interface liquide-solide.

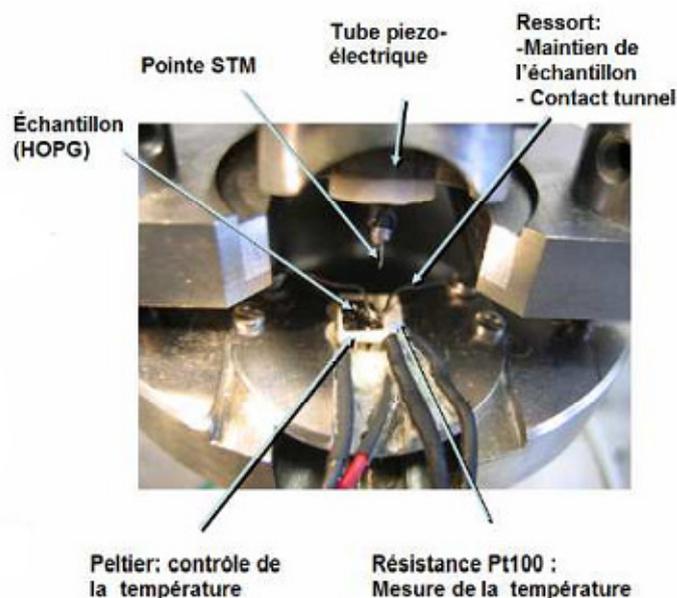


FIGURE 77 – Dispositif expérimental du STM fonctionnant à l'interface solide/liquide [110].

Cette configuration du STM souffre de quelques légers inconvénients, en pratique, se traduisant par un choix limité de :

- substrats : celui-ci ne doit pas se détériorer à la température et atmosphère ambiante,
- solvants : il doit avoir une température d'évaporation extrêmement élevée de façon à ce qu'il y ait toujours une goutte de solvant pendant la durée de l'expérience (~ 1 heure),
- Les molécules à observer doivent être solubles dans le solvant utilisé et présenter une affinité donnée pour le substrat choisi.

Or pour l'utilisation de molécules biologiques, le STM à l'interface solide/liquide est incompatible avec le solvant : l'eau, sa conduction ionique perturbant fortement les mesures localisées du courant tunnel au niveau de la jonction pointe-substrat. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un système de STM sous ultra vide. Nous utilisons seulement le STM à l'interface solide/liquide pour contrôler les substrats d'or que nous fabriquons.

1.2.4 le STM sous Ultra Vide

Lors de cette thèse, le STM utilisé est un STM sous ultra-vide ($\sim 10^{-10} - 10^{-11}$ mbar) de marque Omicron. A l'instar du STM à l'interface solide/liquide, l'électronique de contrôle du STM est de fabrication maison, de même que les logiciels d'acquisition et de traitement. La figure suivante montre les différentes parties du STM UHV.

Le STM sous ultra-vide est composé de trois chambres qui sont :

- la chambre d'analyse STM,
- la chambre de préparation du substrat et des pointes,
- la chambre de préparation des échantillons organiques.

Le principal avantage du STM sous vide est l'absence de modification de l'échantillon au cours de l'expérience. La préparation de l'échantillon est mieux contrôlée, mais beaucoup plus longue qu'à l'interface liquide/solide .

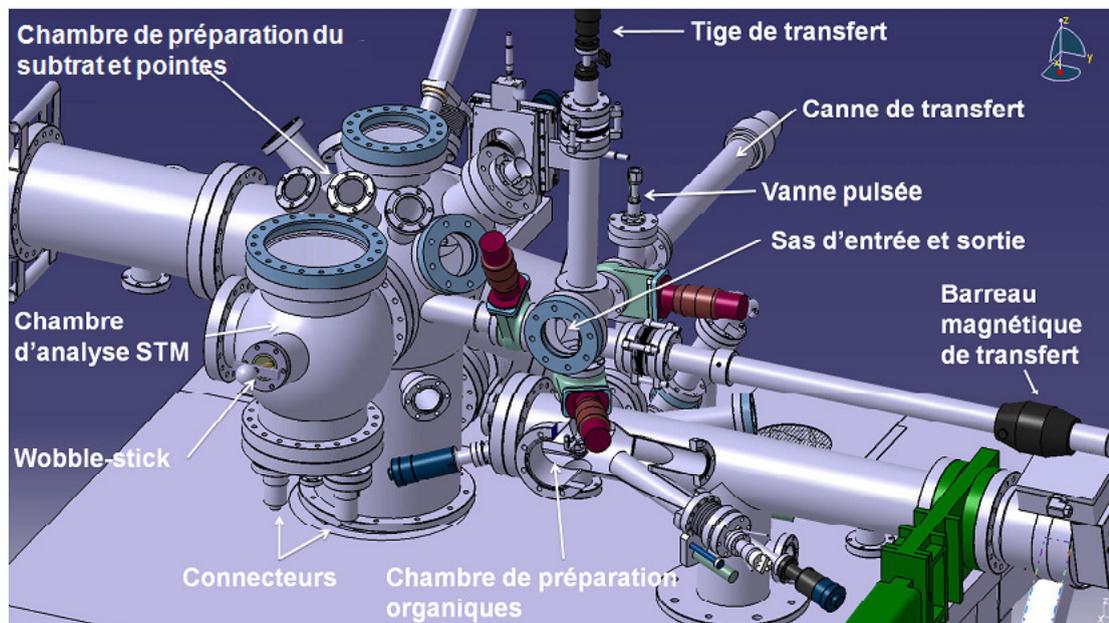


FIGURE 78 – Représentation du STM sous ultra vide.

Pour déposer l'ADN sur nos substrats, nous disposons d'une chambre de préparation dédiée aux organiques.

Dans la chambre de préparation des organiques, on peut faire des dépôts de molécules organiques par évaporation. Pour ce faire, on chauffe un creuset contenant la molécule à évaporer. Par cette technique, on ne peut utiliser de molécules ayant un poids moléculaire trop important ou une température de sublimation trop élevée, car il y aurait dégradation avant évaporation. Pour le dépôt de telles molécules, une des méthodes possibles est le dépôt par disposition d'une goutte de solution s'évaporant à faible pression (drop casting). Cette dernière technique nécessite un calcul précis de la concentration de la solution afin de ne pas avoir de formation d'aggrégats sur la surface. Il existe une autre technique où l'on vaporise une solution contenant la molécule à déposer sur un substrat. Pour cela, on utilise une vanne pulsée. Pour les besoins de la thèse, celle-ci a été intégrée au système existant.

2 Le Substrat

Pour pouvoir observer les doubles brins d'ADN avec une résolution intra-moléculaire, nous devons utiliser un substrat atomiquement plan. Dans le cadre d'application optique, la structure cristallographique (111) de l'or se révèle la plus intéressante : suivant l'épaisseur de la couche d'or déposée sur le substrat initial, nous pouvons avoir, soit un échantillon totalement opaque, soit un échantillon semi-transparent. De plus, la face (111) de l'or est stable à l'air, et l'or est bien connu pour permettre la réalisation d'arrangements moléculaires sur la surface (mono-couches auto-assemblées de thiols) et permettre par ailleurs l'adsorption d'ADN.

2.1 La face (111) de l'or

L'Au(111) est la surface de plus basse énergie de l'or. Cette face a une structure CFC (Cubique Face Centrée), cette organisation représente l'axe préférentiel (selon l'axe (111)) de croissance d'un film mince d'or [111]. La face (111) de l'or, relativement complexe, a été d'abord étudiée via les méthodes classiques d'analyse de surface (diffraction d'électrons lents, d'atomes d'hélium...) avant d'être observée par STM, ce qui a permis de déterminer sa structure exacte. Une surface d'Au(111) est caractérisée par de grandes terrasses atomiquement planes, lesquelles peuvent s'étendre sur plusieurs centaines d'angströms. Les terrasses d'Au sont séparées par des marches monoatomiques de hauteur $\sim 2.4 \text{ \AA}$ (voir figure 79). Les marches suivent des lignes orientées à 120° les unes des autres, qui correspondent aux orientations $\langle 110 \rangle$, les plus denses pour une face (111) de l'Au.

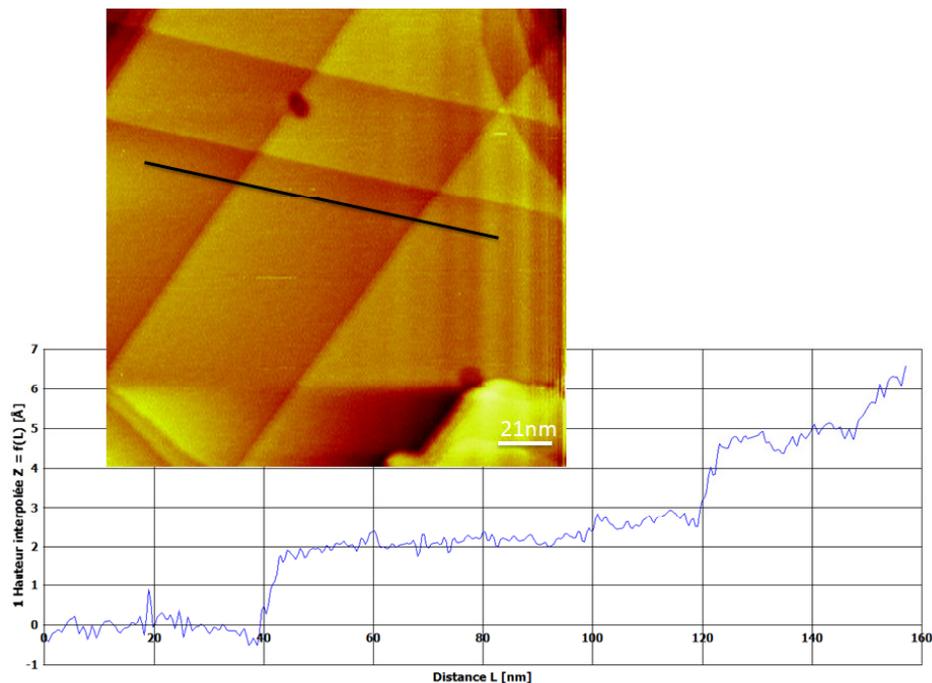


FIGURE 79 – Topographie d'une surface d'Au(111) observée au microscope à effet tunnel (interface liquide/solide). Profils de la ligne sélectionnée avec une hauteur de marche $\sim 2.4 \text{ \AA}$.

L'organisation (111) correspond à un arrangement plus compact des atomes de surface que ceux en volume (reconstruction $22 \times \sqrt{3}$). La préparation de ce type de substrat peut s'effectuer via un ensemble d'étapes décrites ci-dessous.

2.2 Préparation du substrat

L'obtention d'une surface parfaitement plane d'Au nécessite l'utilisation d'un substrat parfaitement plan. Pour cela, on utilise du mica. Les substrats d'Au sont réalisés par évaporation d'or sur une surface de mica fraîchement clivée. Le mica muscovite $[KAl_2(Si_3Al)O_{10}(OH)_2]$ est composé d'une superposition de feuillets atomiques (voir figure 80) liés par des liaisons de van der Waals*. Par clivage, on va séparer les plans hexagonaux les uns des autres. Le clivage du mica s'effectue selon le plan (001) où une monocouche d'ions potassium sépare les feuillets. Ces ions potassium forment un réseau hexagonal, après clivage ils sont également répartis sur les deux surfaces [112].

*. Johannes Diderik van der Waals (1837-1923)

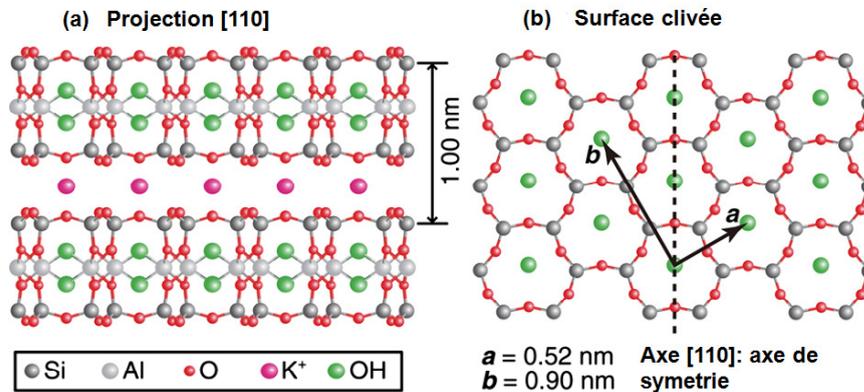


FIGURE 80 – Structure cristalline du mica, (A) : projection [110], (B) : surface clivée [113].

Le support de mica est porté à haute température (350°C) pendant plusieurs jours afin de le dégazer. Le dégazage du mica consiste en une déshydrogénation.

Après dégazage, la pression à l'intérieur de la chambre est d'environ 1×10^{-7} mbar. On utilise de l'or ultra pur à 99,9999% (Strem Chemicals). Les pépites d'or sont placées dans un creuset. Lequel est situé à une distance de 200 mm de l'échantillon de mica. Dans un premier temps, les pépites d'or sont portées à leur température de fusion*. L'évaporation s'effectue par chauffage du liquide d'or, lequel, sous vide, s'évapore avant sa température de sublimation†. L'épaisseur d'or déposé sur le mica est mesurée par une balance à quartz. Pendant toute la préparation de l'échantillon, la balance à quartz est refroidie par un filet d'eau froide circulant autour du cristal de quartz. Lors de l'évaporation, la pression remonte à environ 1×10^{-6} mbar. La vitesse de dépôt a été réglée à $\sim 3 \text{ \AA s}^{-1}$. L'épaisseur finale de l'échantillon peut varier de 60 à 250 nm. Le choix de la vitesse de dépôt a été effectué à partir d'expériences et en tenant compte des descriptions de la littérature [114]; cette vitesse, nous a permis d'avoir des surfaces planes et structurées.

2.3 Maitrise des paramètres de dépôts

2.3.1 La vitesse de dépôts de l'Au

À titre d'exemple, la figure 81 rapporte un dépôt effectué avec une vitesse trop faible (2.6 \AA/s) sur un substrat ayant subi un temps de dégazage du mica trop court ($T=345^\circ\text{C}$, pendant 3 heures).

Cette surface présente une rugosité moyenne importante (15.5 nm) avec des trous pouvant aller jusqu'à 50 nm de profondeur.

La vitesse de dépôt est très importante car si la vitesse de collision des molécules du gaz résiduel sur le mica est du même ordre de grandeur que la vitesse de dépôt de l'Au alors la structure de croissance sera perturbée [115]. Si la vitesse de dépôt est trop faible, la surface sera parfaitement recouverte d'Au mais l'accroche entre l'Au et le mica ne résistera pas au recuit. À l'inverse, si la vitesse de dépôt est trop élevée, le recouvrement de la surface de mica par l'Au n'est pas homogène.

*. $T_{\text{fusionAu}} = 1064^\circ\text{C}$ sous 1 Atm

†. $T_{\text{sublimationAu}} = 2856^\circ\text{C}$ sous 1 Atm

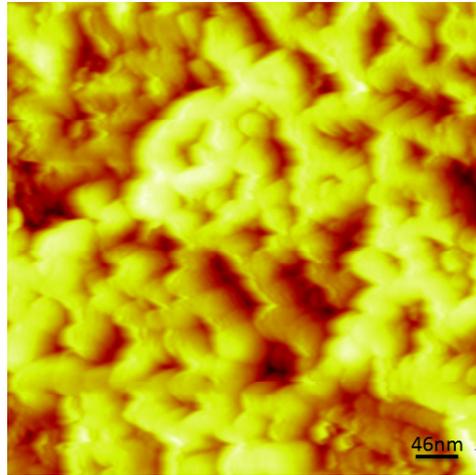


FIGURE 81 – Image STM d'un substrat d'au observé en sortie du bâti pares un mauvais processus de dépôt ($I_t=10$ nA et $V_t=-518$ mV et 446 nm², STM Liquide/solide).

2.3.2 Le dégazage du mica

Le dégazage du mica est un critère important dans l'accroche de l'au sur celui-ci. Le dégazage permet d'enlever les molécules qui pourraient être adsorbées sur la surface de mica, cette étape dure plusieurs jours afin de désorber les contaminants présents dans le volume. La désorption de particules sur le mica commence à partir de 110°C [116] mais ne devient réellement importante qu'à partir de 450°C [117]. Pour cela, il faut permettre à l'ensemble du porte échantillon d'être porté à très haute température. Un mauvais dégazage va impliquer une mauvaise accroche de l'au sur le mica. Lors de l'immersion de l'échantillon dans une solution faiblement visqueuse, la couche d'au se décollera du mica. Ce phénomène est particulièrement important lorsque l'échantillon est immergé dans une solution contenant de l'eau.

2.3.3 La pression dans la chambre d'évaporation

La pression lors de l'évaporation de l'au sur le mica est un des autres éléments qui contribuent à la réussite du substrat. Si celle-ci est trop élevée alors le dépôt ne sera pas homogène et la surface ne sera pas atomiquement plane. En vue d'obtenir un bon vide, il est nécessaire de disposer un peu de graisse sur les joints en viton du bâti. Si la graisse est disposée en excès, on peut avoir une pollution du mica ou de l'échantillon final. Le dépôt peut être modifié par la pollution dans le bâti mais aussi par la pollution extérieure. Dans le bâti de l'évaporateur, la pollution peut intervenir par déposition de graisse du système de pompage ou de celle servant à faire le joint d'étanchéité.

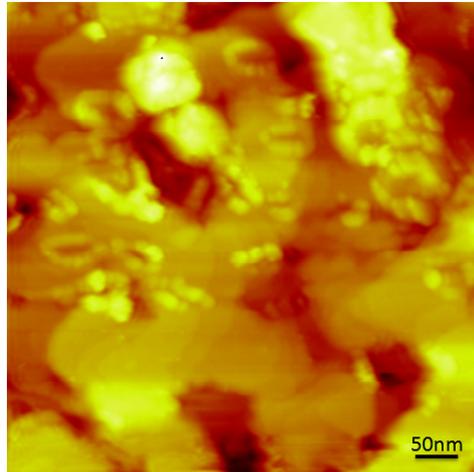


FIGURE 82 – Image STM d'un substrat d'Au en sortie du bâti ($I_t=10$ nA et $V_t=-370$ mV et 500 nm², STM Liquide/solide).

Sur la partie supérieure de la figure 82, on image des fils qui correspondent à une pollution par de la graisse de joint viton. Lors du dégazage du mica, l'échantillon est porté 350°C . Si il y a présence de graisse dans l'enceinte, celle-ci est pyrolysée et est piégée entre le mica et l'Au. A l'échelle microscopique, on a un mauvais accrochage de l'Au sur le mica créant des trous dans le substrat d'Au. Si la graisse provient du système de pompage alors celle-ci est projetée sur l'échantillon lors de la remise à l'air. Dans ce cas, on observe des formes (comme au-dessus) sur le substrat d'Au.

2.3.4 La composition des pièces se trouvant dans le bâti

Les pièces portées à haute température ne doivent pas se modifier sous l'action de la chaleur. Ainsi, les contacts électriques ne doivent être réalisés que par des pièces en cuivre purs. Par exemple, les pièces en laiton (90% cuivre, 10% zinc) sont à proscrire car à haute température le zinc s'évapore et recouvre tout l'ensemble du bâti.

2.3.5 Le flamage de l'échantillon

Lorsque l'échantillon sort directement du bâti d'évaporation, celui-ci est atomiquement plan. Après quelques jours passés à l'atmosphère ambiante celui-ci se recouvre de particules présentes dans l'air et perd sa structure. Toutefois, un recuit (flamage de l'échantillon sous une flamme d'hydrogène, jusqu'à obtenir une couleur rouge-orangé) permet d'obtenir une organisation (111) de l'or. Par ce recuit sous flamme d'hydrogène, on supprime une partie des contaminants se trouvant sur l'échantillon [118] et on réarrange les atomes d'Au de la surface (on agrandit la taille des terrasses). Lorsque le flamage n'est pas optimal, on ne dispose pas d'une surface atomiquement plane. Il arrive cependant que la surface se détériore lors de l'imagerie par STM. Les marches d'Au se déforment sous l'action du champ électrique [119,120] et on peut obtenir une structure de marches en forme de "fingersprints" (voir figure 83).

Les échantillons d'Au sont par la suite disposés sur les plaques portes-échantillon du STM UHV et où ils sont maintenus par deux fils de tantale.

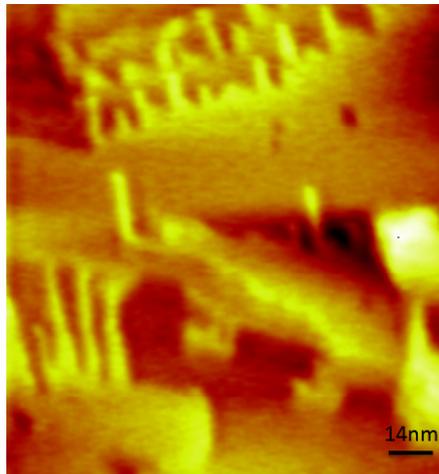


FIGURE 83 – Image STM d'un substrat d'Au en sortie du bâti ($I_t=24.16$ nA et $V_t=-10$ 0mV et 147 nm², STM UHV).

3 Conclusion

En vue de caractériser à l'échelle moléculaire et sub-moléculaire l'interaction fluorophore/ADN, nous nous sommes intéressés à la microscopie à sonde locale. Des échantillons d'Au (111) atomiquement plan ont été réalisés. Le STM sous ultra vide a été utilisé car ce système permet de contrôler tous les paramètres de dépôt et de conservation des échantillons. En général, le dépôt de molécules organiques sous ultra vide est effectué par évaporation thermique. Cependant, cette méthode ne peut être appliquée à des macromolécules telles que l'ADN à cause de la décomposition pyrolytique. Pour le dépôt de l'ADN sous atmosphère contrôlée, nous avons choisi de mettre en œuvre une vanne pulsée. Dans le chapitre suivant, nous détaillerons le mécanisme de fonctionnement de la vanne pulsée.

Sixième partie

Visualisation de l'ADN

Table des matières

1	La vanne pulsée	115
1.1	Principe de fonctionnement	115
1.2	Paramètres de dépôt	116
2	Dépôt sur Au	117
2.1	ADN	117
2.1.1	Double brin	117
2.1.2	Simple brin	118
2.2	ADN marqué par TP-2Py	120
3	Déplacement et accrochage de l'ADN par la pointe	121
3.1	Déplacement de l'ADN par la pointe	121
3.2	Accrochage de l'ADN par la pointe	122
4	Ancrage d'ADN par interaction avec des dérivés thiolés	123
4.1	Mesures optiques	123
4.1.1	Le TP-2Py thiolane	123
4.1.2	Le TP-2Py thiol	124
4.2	Mesures STM	125
5	Dépôt d'ADN par polarisation de la surface	126
6	Molécules chimisorbées sur Au(111)	128
6.1	Principe	128
6.2	Préparation	129
6.3	Structure	129
7	Monocouche de Bisphenylamines pyridinium thiolanes et thiols	130
7.1	Bisphenylamines pyridinium thiolanes	130
7.2	Bisphenylamines pyridinium thiol	133
7.2.1	Structure de la monocouche	133
7.2.2	Dépôt d'ADN sur une monocouche	133
8	Hypochlorure de de 11-amino-1-undecanethiol	134
8.1	Organisation sur Au	135
8.2	Interaction ADN/hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol	136
9	Conclusion	137
	Conclusion générale	138

Le dépôt par vanne pulsée a été choisi pour déposer des macromolécules organiques sur substrat d'Au(111) [121], telles que des molécules de C_{60} [122, 123], des polymères conducteurs [124], des nanotubes de carbone [125]...

Une vanne pulsée permet de déposer des objets lourds, typiquement des polymères ou des macromolécules biologiques (ADN, ARN...) mais aussi des molécules qui ne sont pas compatibles avec les méthodes usuelles de dépôt sur substrat (évaporation notamment par effet joule). Nous allons décrire le mécanisme de la vanne pulsée puis les résultats obtenus avec de l'ADN.

1 La vanne pulsée

1.1 Principe de fonctionnement

On utilise une vanne pulsée de marque Parker, modèle 099 – 0305 – 900 (voir figure 84). Le dépôt se fait par jet d'un spray de solvant contenant la molécule à déposer. Lors de l'ouverture de la vanne pulsée, la différence de pression fait que le liquide passe à l'état gazeux et va s'introduire dans l'enceinte; libérant les molécules solubilisées sur le substrat.

Le processus de dépôt par vanne pulsée génère une quantité importante de contamination par le solvant dans le bâti. Pour réduire le plus possible cette pollution, la vanne pulsée a été isolée de la chambre STM. Elle n'utilise que le pompage du sas d'introduction (voir figure 78).

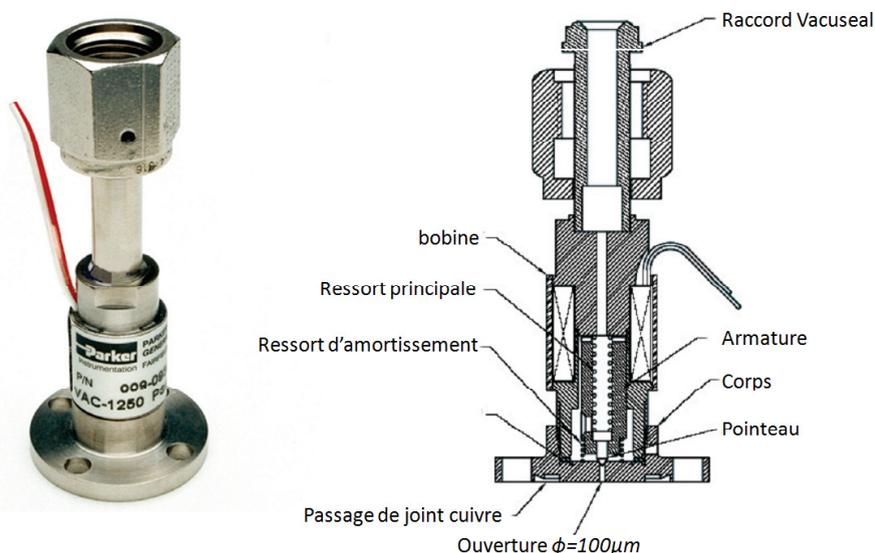


FIGURE 84 – Photographie et schéma de la vanne pulsée.

Dans une vanne pulsée, l'ouverture et la fermeture du pointeau (à droite sur la figure 84) s'effectue par un électroaimant, via une électronique de contrôle. A partir de celle-ci, on peut définir le temps d'ouverture et de fermeture de la vanne. La technique de dépôt par vanne pulsée a été mise en œuvre par le groupe de Grill [126]. L'orifice de la vanne pulsée est de $50 \mu\text{m}$ et la distance entre l'ouverture et le substrat est d'environ 150 mm. Lors de l'injection de la solution d'ADN, la pression dans la chambre varie de $\sim 1 \times 10^{-8}$ mbar à $\sim 1 \times 10^{-3}$ mbar. Après le dépôt de l'ADN, l'échantillon est transféré dans la chambre STM. Dans le dépôt par vanne pulsée, la plus grande source de perturbations provient du solvant qui ne s'est pas évaporé. Plusieurs études ont

montré, qu'immédiatement après le dépôt, les images STM sont bruitées et de mauvaise qualité. Les spécialistes s'accordent à dire que ceci est dû à l'excès de molécules de solvant présentes sur la surface [125]. Des premiers tests ont été réalisés par dépôt d'un polymère PVA sur graphite. Ces tests ont permis de faire une première approximation des paramètres de dépôt.

1.2 Paramètres de dépôt

1. Temps d'ouverture de la vanne pulsée et nombre de cycles.

L'électronique de contrôle de la vanne pulsée, nous permet de jouer sur la durée d'ouverture ($t_{ouverture}$) de la vanne et le temps entre 2 ouvertures ($\Delta_{ouverture}$). Nous décidons le pourcentage de temps d'ouverture (la vanne peut être ouverte 100% du temps si $t_{ouverture} = \Delta_{ouverture}$). Nous pouvons aussi faire fonctionner la vanne en mono-coup ou en cycle. La quantité de liquide injectée par coup étant très faible, nous utilisons le fonctionnement en cycle lorsque nous souhaitons déposer une couche. Pour les différentes expériences, nous avons utilisé différents temps d'ouverture et de fermeture de la vanne pulsée.

2. Angle entre l'échantillon et l'axe de la vanne pulsée .

Selon Tanaka *&al.* [127], le déroulement du double brin d'ADN dépend de l'angle que forme l'échantillon avec l'axe de la vanne pulsée. Nous avons réalisé et posé un système de rotation de l'échantillon sous la vanne pulsée (voir figure 85). Avec ce mécanisme, nous pouvons modifier l'angle θ entre l'axe de la vanne pulsée et la surface de l'échantillon.

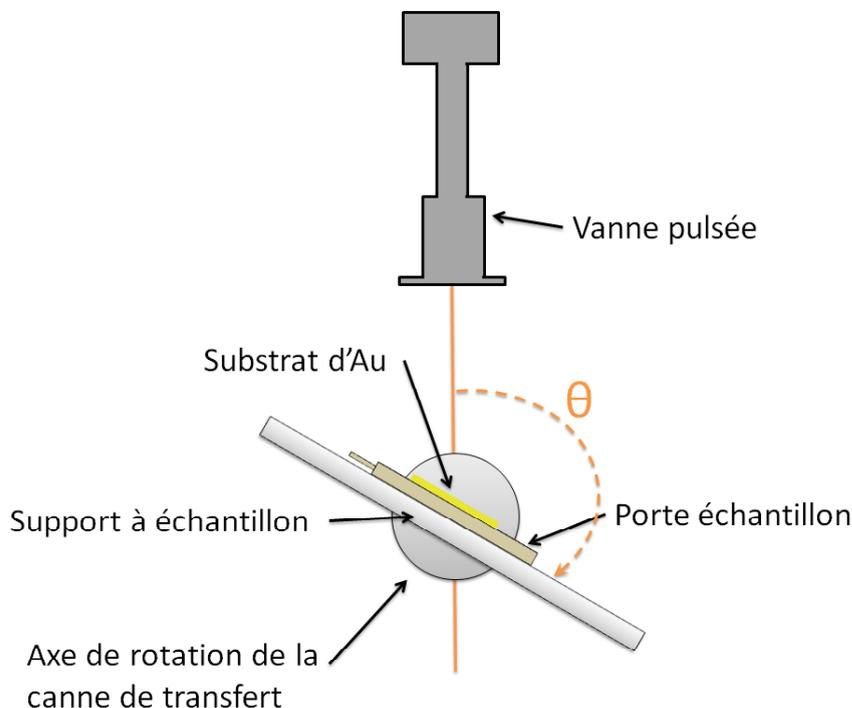


FIGURE 85 – Illustration de l'angle entre l'échantillon et l'axe de dépôt de la vanne pulsée.

L'échantillon est glissé dans un rail, lequel est soudé à une canne de transfert. La canne de transfert a un mouvement de rotation sur elle-même. Lors de nos expériences, nous avons fait varier θ . En accord avec les expériences précédemment décrites par Tanaka, nous avons remarqué qu'un angle de 45° entre l'axe de la vanne pulsée et la surface de l'échantillon per-

mettaient d'observer des brins d'ADN étendus sur la surface d'Au. Cependant, nous n'avons pas remarqué d'orientation spécifique des brins d'ADN.

3. Concentration de la solution.

La technique de la vanne pulsée nécessite une solution à très faible concentration. Une faible concentration permet de limiter la formation d'aggrégats et d'avoir une couche sub-monomoléculaire. Il faut trouver un compromis entre la concentration de la solution et le temps d'ouverture de la vanne. Pour faciliter les expériences, nous avons décidé de travailler avec une concentration en ADN inférieure à 100nM.

Nous avons choisi de faire des dépôts à une concentration volontairement faible. Les concentrations donnant les meilleurs résultats sont comprises entre 50 et 100 nM. Les solutions d'ADN ont été réalisées à partir d'ADN de hareng lyophilisé (SIGMA-ALDRICH) dissout dans une solution d'eau milli-Q. A l'inverse des expériences de microscopie, l'ADN n'est pas solubilisé dans une solution tampon de cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM (pH~7). Le faible taux de sels (intrinsèquement présent au sein de l'échantillon d'ADN commercial) maintient la structure en double hélice de l'ADN, mais lorsque le sel est en excès celui-ci va venir interagir avec la pointe. Cette interaction va déstabiliser la jonction tunnel et donc limiter la résolution lors de l'imagerie STM.

2 Dépôt sur Au

Dans l'optique de l'observation de l'ADN marqué par les fluorophores, nous nous sommes d'abord intéressés à l'imagerie STM de l'ADN sur Au(111). Ceci a pour objectif d'identifier les caractéristiques du dépôt d'ADN sur une surface d'Au (111). Puis dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur l'imagerie de l'ADN marqué sur Au(111).

2.1 ADN

2.1.1 Double brin

Après de nombreux essais, nous avons réussi à obtenir des images de doubles brins d'ADN sur une surface d'Au(111). La figure 86 montre une image STM de l'ADN de hareng sur Au(111). L'image STM a été réalisée à courant tunnel extrêmement faible ($I_t=9.5$ pA) et une tension tunnel importante ($V_t=-2540$ mV). L'ADN de hareng se présente sous la forme d'un long brin en forme de double hélice. De façon inexplicée, La hauteur apparente est de 5\AA et la largeur de 3\AA ce qui est environ $4 \times$ plus faible que les valeurs théoriques (2 nm). Lors de ce dépôt, l'échantillon était placé avec un angle de 45° par rapport à l'axe de la vanne pulsée. L'ADN dont la concentration est de 87.1 nM, a été déposé par vanne pulsée. Nous avons défini un temps d'ouverture de 1.5 ms. La vanne a été ouverte 5 fois. Le volume de solvant pulvérisé dans le bâti est d'environ 100 μL .

Ce type d'objets n'apparaît pas quand on fait la même expérience avec une solution ne contenant que de l'eau milli-Q. Ces expériences ont été reproduites de nombreuses fois sans que l'on puisse obtenir une meilleure résolution. En effet, dans toute autre condition que celle reportée ci-dessous, l'imagerie est impossible. La faible concentration fait, par ailleurs, qu'il est extrêmement fastidieux de trouver un brin d'ADN sur la surface. De plus lors du balayage de la surface par la pointe, on observe un déplacement du brin. L'ADN se déplace d'autant plus que le courant est important. Si on inverse la polarisation, la pointe, qui devient positive, attire l'ADN (globalement négatif).

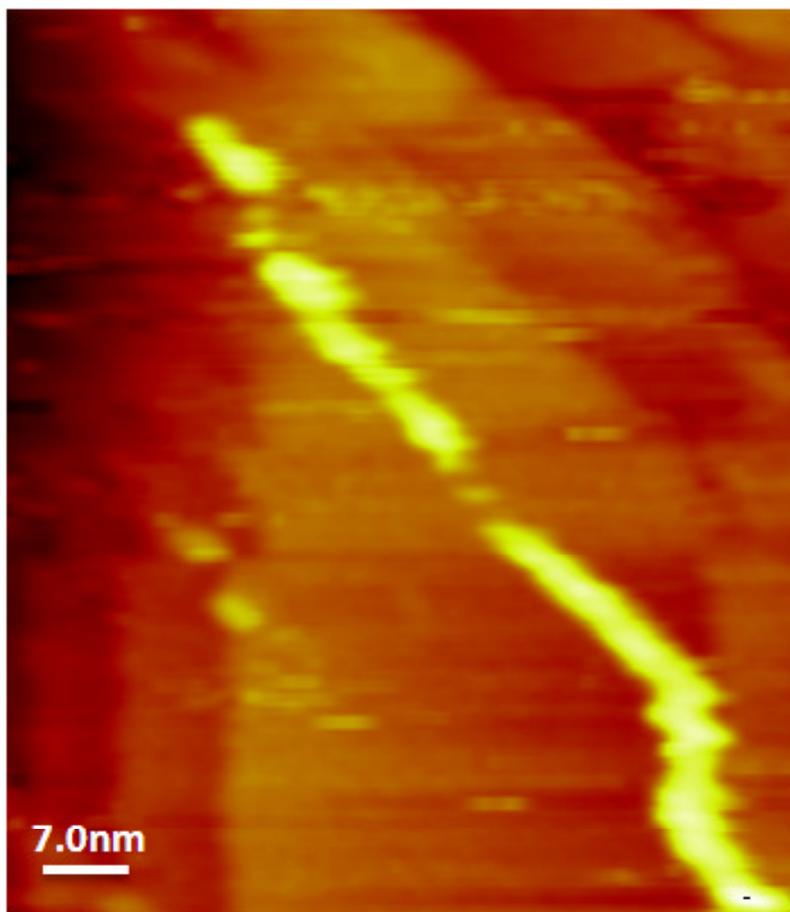


FIGURE 86 – Images STM (68 nm^2 ($I_t=9.5 \text{ pA}$, $V_t=-2540 \text{ mV}$) de l'ADN de hareng [87.1 nM] (5 pulses de 1.5 ms , $\theta \sim 45^\circ$, STM UHV).

2.1.2 Simple brin

Les dépôts de simples brins d'ADN ont été réalisés à partir d'une solution d'ADN de hareng de concentration de 74.4 nM . Pour cela, nous avons chauffé la solution d'ADN dans la vanne pulsée. Nous avons installé une thermorésistante sur le pourtour de la vanne pulsée. Le contrôle de la température est effectué à l'aide d'une sonde PT100. Le contact thermique entre la sonde et la vanne pulsée est établi par de la colle conductrice. La solution d'ADN est chauffée à une température de 90°C . A cette température, les doubles brins d'ADN se deshybrident pour devenir deux simples brins. Nous pulvérisons les simples brins d'ADN sur l'échantillon d'Au(111). A grande échelle (236 nm^2), on remarque de nombreux cercles sur la surface d'Au lesquels pourraient être des mono brins d'ADN. Ceux-ci sont absents lors de la pulvérisation du solvant pur.

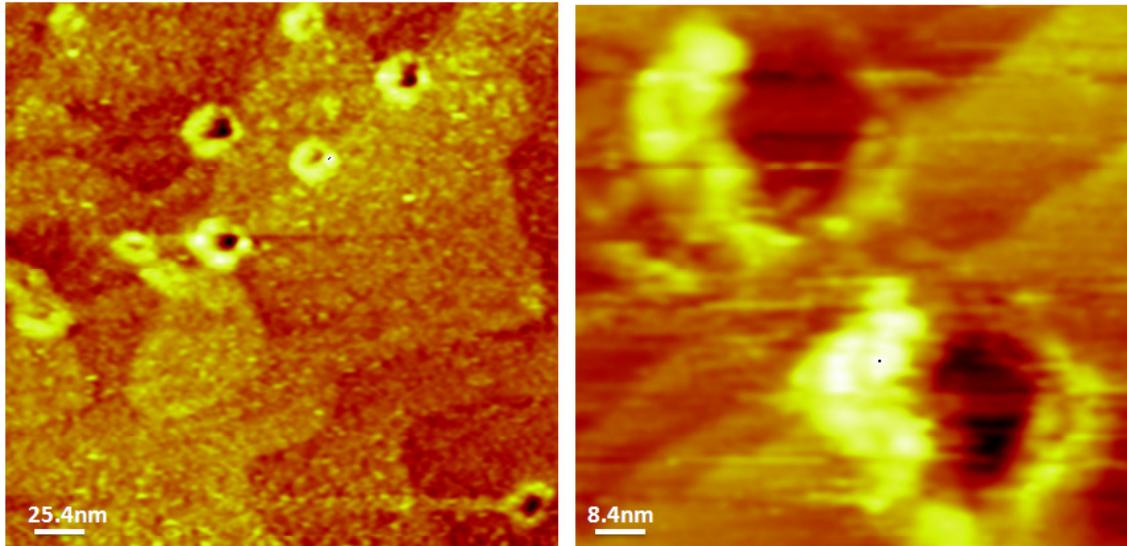


FIGURE 87 – *A gauche, image STM (248×240 nm, $I_t = 51$ pA, $V_t = -2800$ mV) de l'ADN de hareng [74.4 nM] (50 pulses de 1.5 ms $T_{solution} = 91^\circ$, STM UHV). A droite, image STM (80 nm², $I_t = 30$ pA, $V_t = -2068$ mV) de l'ADN de hareng [7.61 nM] (5 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV)*

Les cercles que nous observons sur la figure 87 peuvent être attribués à des simples brins d'ADN repliés sur eux-même. La hauteur apparente de ces objets est plus faible que celle mesurée pour les doubles brins d'ADN observés précédemment. Cette structure est aussi observée lors de dépôt de double brin d'ADN, cependant, leur nombre est beaucoup plus faible. Il est possible que certains brins ne soient pas hybridés dans la solution. L'image de droite de la figure 87 représente deux mono brins d'ADN en forme de cercle. Ces images ont été réalisées dans les mêmes conditions que les dépôts de doubles brins d'ADN.

2.2 ADN marqué par TP-2Py

L'objectif de cette étude STM est d'observer à l'échelle intra-moléculaire l'interaction ADN/fluorophore. Nous avons effectué des dépôts d'ADN marqué par la TP-2Py. A l'aide du STM, l'idée était de visualiser le fluorophore qui a une densité électronique plus importante que les bases de l'ADN. De plus, l'objectif de ces études visait à caractériser l'existence d'une éventuelle modification de la conformation du double brin d'ADN lorsque le fluorophore est inséré.

La concentration de la TP-2Py dans la solution d'ADN est de 0.2 mM. La concentration de l'ADN est du même ordre de grandeur que celle utilisée pour les dépôt d'ADN, environ 50 nM.

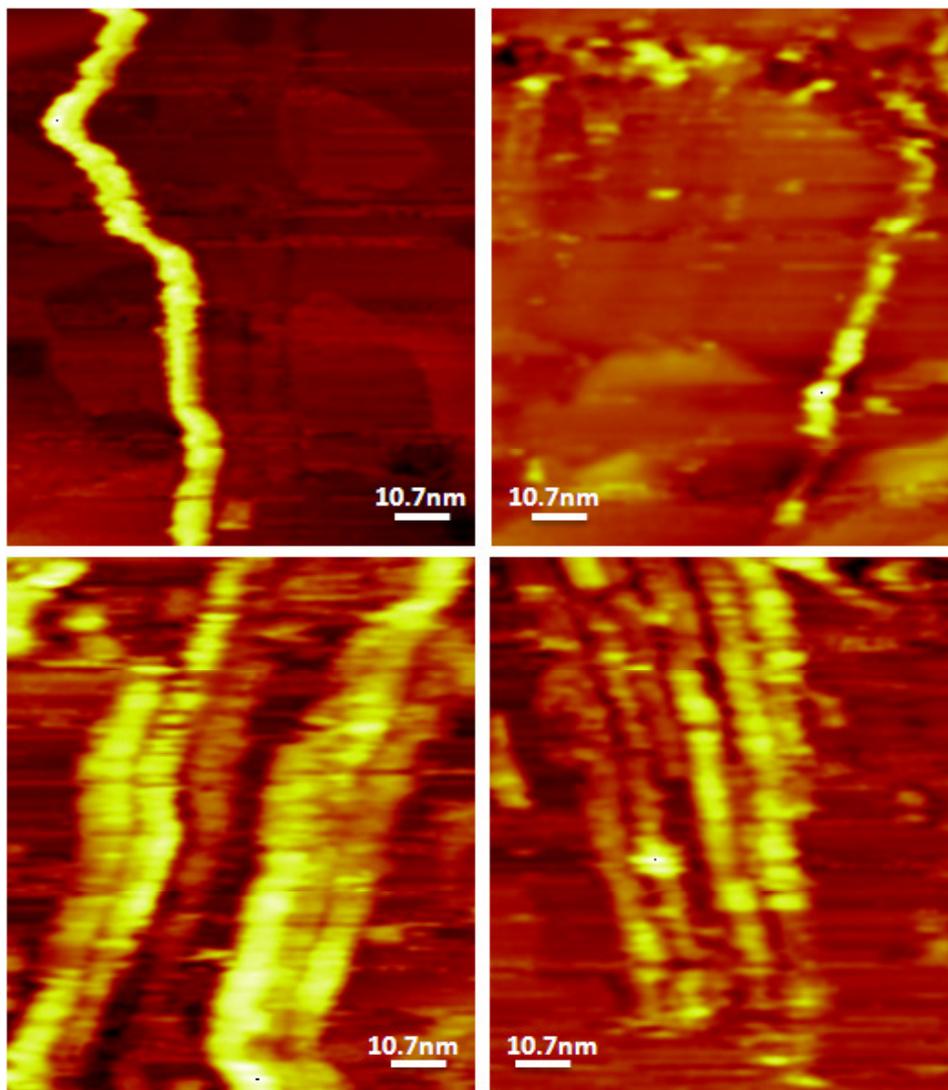


FIGURE 88 – Images STM (100×110 nm ($I_t = 32$ pA, $V_t = -2538$ mV) de l'ADN de hareng [87.1 nM] auquel on a ajouté le fluorophore TP-2Py [0.2 mM] (12 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV).

La figure 88 est composée de quatre images obtenues pour le dépôt d'ADN marqué. On remarque que les fils d'ADN ont des portions plus intenses que d'autres. On a vu qu'avec un STM, on sonde les densités locales d'états électroniques, or les fluorophores TP-2Py sont fortement conjugués.

Cette forte conjugaison implique une importante densité locale électronique à une énergie proche de la tension de polarisation. On a vu que les TP2-Py s'insèrent dans le double brin d'ADN, on peut supposer que les points les plus brillants du fil d'ADN peuvent être liés aux TP-2Py. A l'inverse des expériences d'ADN non marqué, il semblerait que l'insertion du fluorophore dans le double brin d'ADN favorise le regroupement de ceux-ci. L'une des explications pourrait être que le changement de la nature du contre-ions qui peut favoriser les interactions électrostatique entre les doubles brins d'ADN. Nous avons pu observer des doubles brins d'ADN accolés les uns aux autres (voir images trois et quatre, figure 88). Les mesures de la hauteur des doubles brins d'ADN ont confirmé l'absence de superposition des brins. Seules des expériences de spectroscopie pourraient confirmer ou infirmer la présence des TP-2Py dans le double brin d'ADN. Néanmoins, les difficultés d'imagerie empêchent une étude plus détaillée de l'interaction entre brins d'ADN. Lors de ces expériences de dépôt d'ADN sur Au, nous avons rencontré plusieurs problèmes. Ceux-ci sont décrits ci-dessous.

3 Déplacement et accrochage de l'ADN par la pointe

3.1 Déplacement de l'ADN par la pointe

Tout d'abord, l'ADN est physisorbé sur la surface, il y a peu d'interactions entre l'ADN et l'Au. Lors de l'acquisition de l'image, l'ADN est déplacé par la pointe. Sur la figure 89 sont représentées deux images successives, illustrant le déplacement d'un double brin d'ADN.

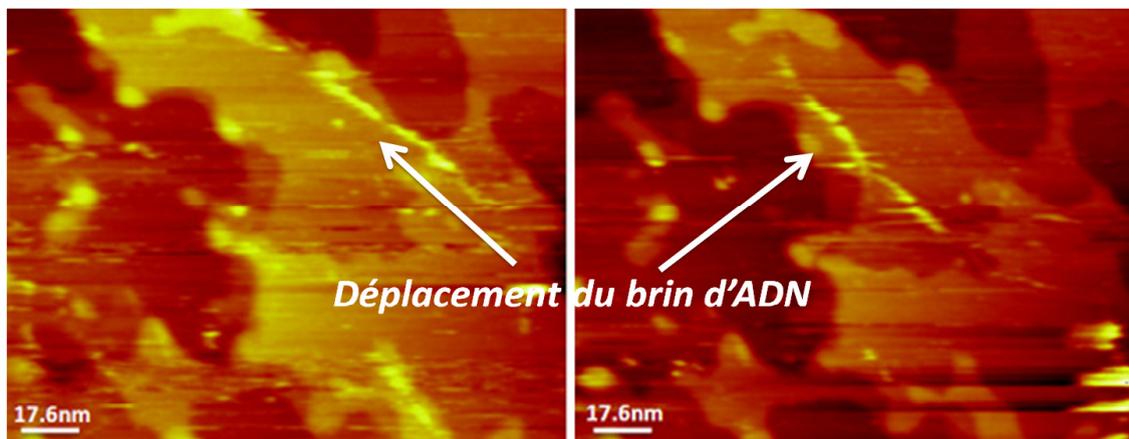


FIGURE 89 – Deux Images STM successives (Images STM (175×160 nm ($I_t = 9.5$ pA, $V_t = -2540$ mV) de l'ADN de hareng [87.1 nM] auquel on a ajouté le fluorophore TP-2Py [0.2 mM] (12 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV).

On observe un cisaillement du double brin d'ADN. Ainsi, après seulement 2 images, le double brin d'ADN a disparu. L'interaction de l'ADN avec la pointe peut se manifester par l'accrochage de l'ADN par la pointe. Dans ce cas, l'ADN visible sur une image ne l'est plus sur les suivantes. De plus, la qualité de la jonction tunnel se trouve grandement perturbée réduisant fortement la résolution de l'image (modification de la pointe).

3.2 Accrochage de l'ADN par la pointe

Sur la figure 90, ces deux images successives montrent l'accrochage de l'ADN par la pointe. Sur l'image de gauche, on voit un double brin d'ADN au centre de l'image puis sur l'image suivante celui-ci a disparu. Lorsque l'on agrandit la zone de balayage, on ne retrouve pas ce double brin d'ADN. Le double brin d'ADN a été accroché par la pointe.

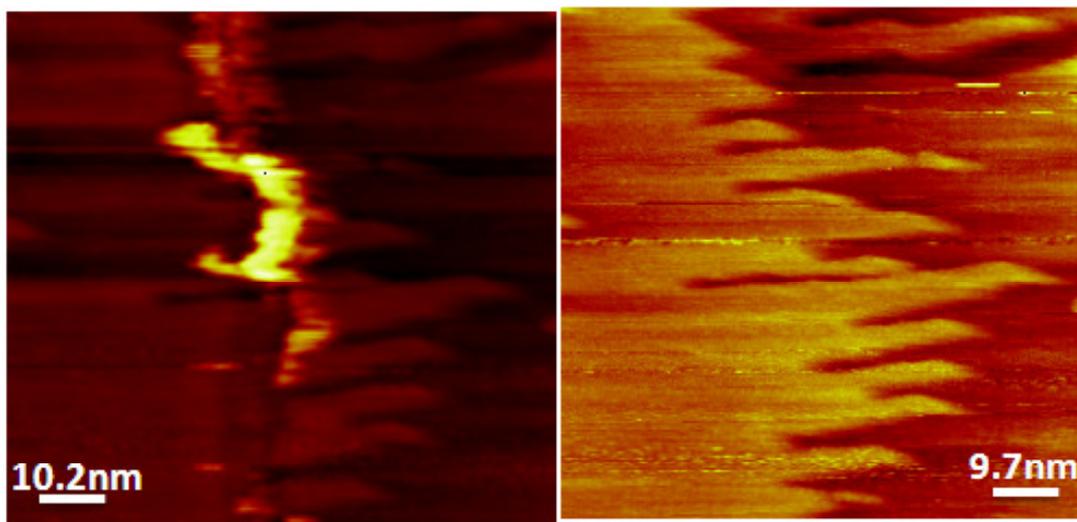


FIGURE 90 – Images STM (200 nm^2 ($I_t=20 \text{ pA}$, $V_t=-2538 \text{ mV}$) de l'ADN de hareng [87.1 nM] (15 pulses de 1.5 ms , $\theta \sim -15^\circ$, STM UHV).

4 Ancrage d'ADN par interaction avec des dérivés thiolés

Pour résoudre le problème de déplacement du double brin d'ADN par la pointe, nous avons décidé d'ancrer l'ADN à la surface du substrat. Différents moyens ont été envisagés [128]. Etant données les propriétés des molécules TP-Py développées, nous avons décidé de les utiliser comme "ancres". Nous avons choisi la TP-2Py, dont nous avons montré l'interaction avec l'ADN, à laquelle nous avons ajouté une chaîne alkyle possédant à son extrémité un thiolane ou un thiol en vue d'une chimisorption sur l'Au. La figure 91 présente la structure des fluorophores utilisés et leurs fonctionnalités.

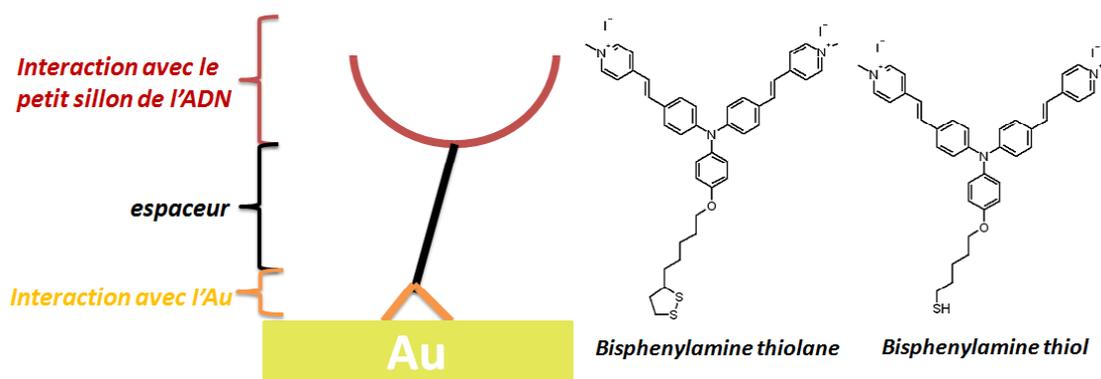


FIGURE 91 – Schéma des fonctionnalités des fluorophores utilisés et structures chimiques des Bisphenylamine thiol et thiolane mis en œuvre.

L'intérêt pour ces molécules est qu'elles peuvent s'insérer dans la double hélice d'ADN et s'accrocher à la surface d'Au(111). Dans un premier temps, nous avons fait des mesures optiques afin de vérifier que le thiol (ou thiolane) ne modifie pas l'interaction de la molécule de triphenylamine avec la double hélice d'ADN.

4.1 Mesures optiques

Comme développé précédemment le paramètre clef permettant de caractériser globalement l'interaction fluorophore/ADN est la fluorescence et plus particulièrement l'exaltation de fluorescence en présence d'ADN, de même que la durée de vie de fluorescence.

4.1.1 Le TP-2Py thiolane

Nous avons mesuré le signal de fluorescence et la durée de vie de fluorescence de la TP-2Py thiolane en solution d'ADN et en solution tampon ($\lambda_{exc}=820$ nm et $P_{ech} = 2GW/cm^2$).

En A, on peut voir le spectre de durée de vie de fluorescence de la TP-2Py thiolane dans une solution tampon. En B, on observe la décroissance de fluorescence dans une solution tampon contenant de l'ADN de hareng [40mM]. On remarque que la décroissance de fluorescence est la somme de deux exponentielles décroissantes, dont la première a une durée de vie longue ($\tau_{f_1} = 2.03ns$) et la deuxième a une durée de vie courte ($\tau_{f_2} = 0.47ns$). Lorsque le fluorophore est dans une solution tampon (cacodylate de sodium, pH 7.2 10mM, NaCl 100mM), la durée de vie est courte

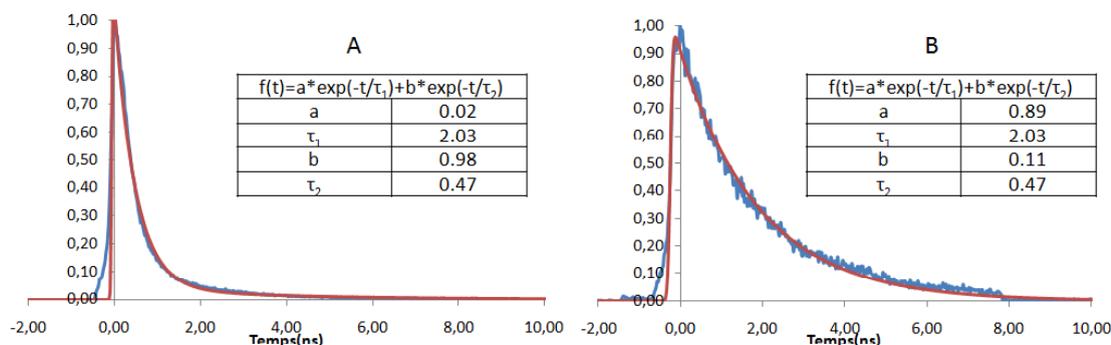


FIGURE 92 – A : Durée de vie de fluorescence des TP-2Py thiolanes dans une solution tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM. B : Durée de vie de fluorescence des TP-2Py thiolanes dans une solution d'ADN naturel(40 equ)(tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM).

($\tau_f = 0.47ns$). Cette durée de vie est issue de la fluorescence du fluorophore lorsque celui-ci n'est pas bloqué dans la double hélice d'ADN. La durée de vie de fluorescence est identique à celles observées pour la TP-2Py dans des conditions similaires. Alors que dans la solution contenant l'ADN, la composante principale est celle correspondant à la durée de vie la plus longue. De plus, à même puissance incidente, on a 2500 cps pour le fluorophore dans la solution d'ADN et 180 cps pour le fluorophore dans la solution tampon. Ce qui donne un facteur d'exaltation de 13.8. A partir de ces mesures, on peut dire que la TP-2Py thiolane s'insère dans la macromolécule d'ADN.

4.1.2 Le TP-2Py thiol

De la même façon, nous nous sommes assurés que les molécules de TP-2Py thiol s'inséraient dans l'ADN. Nous avons mesuré le signal de fluorescence et la durée de vie de fluorescence en solution d'ADN et en solution tampon. Ces mesures de durée de vie de fluorescence ont été réalisées à $\lambda_{exc}=780$ nm avec une puissance sur l'échantillon de 2 GW/cm².

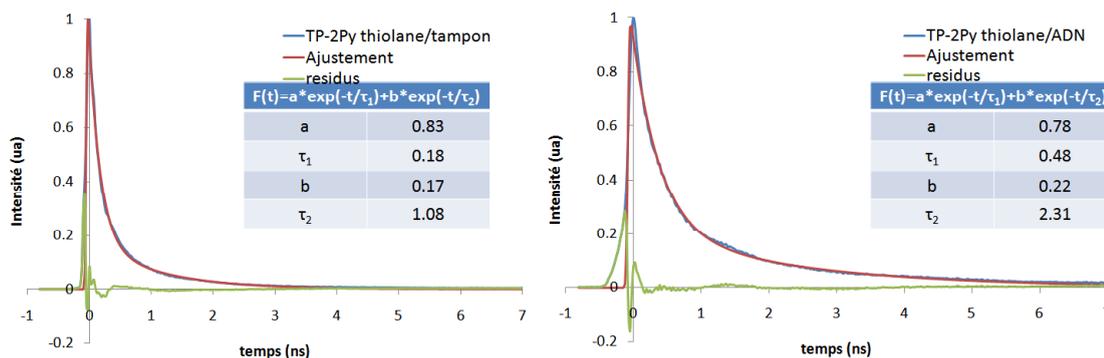


FIGURE 93 – A : Durée de vie de fluorescence des TP-2py thiols dans une solution tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM. B : Durée de vie de fluorescence des TP-2py thiols dans une solution d'ADN naturel (40 equ)et de la solution tampon.

On peut voir sur la figure 93, les courbes de décroissance de fluorescence de la TP-2Py thiol en solution tampon (cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM) et en solution d'ADN de hareng à 40 équivalents en paires de bases d'ADN. En solution tampon sans ADN la durée de vie de fluorescence est très courte ($\sim 0.2\text{ns}$) alors qu'avec l'ADN de hareng, la durée de vie de fluorescence est légèrement plus longue ($\sim 0.5\text{ns}$). L'effet du thiol semble plus perturbateur que celui du thiolane, la durée de vie en solution tampon avec ADN est beaucoup plus courte que celle de la TP-2Py thiolane. Ces mesures de durée de vie sont à corrélérer avec les mesures d'exaltation de fluorescence. Pour une même puissance incidente sur l'échantillon, l'intensité de fluorescence de la TP-2Py thiol en solution tampon est de 16 cps. Alors que dans la solution tampon avec ADN, l'intensité de fluorescence de la TP-2Py thiol est de 226 cps. Ainsi, le facteur d'exaltation de la fluorescence en présence d'ADN est de 14. Les mesures optiques confirment l'interaction entre la TP-2Py thiol et l'ADN. Comme pour la TP-2Py thiolane, la chaîne alkyle ne limite pas l'interaction avec l'ADN cependant elle n'a pas le même effet que la TP-2Py thiol.

4.2 Mesures STM

Le dépôt s'effectue de manière analogue à ceux du dépôt de l'ADN seul (temps d'ouverture de la vanne 1.5ms et 10 pulses). Cependant, l'ADN a été préalablement mélangé à une solution de TP-2P thiolane. Nous avons pulvérisé un volume de $100\mu\text{L}$ de solution d'ADN de hareng marqué par la TP-2Py thiolane. La figure 94 montre une image de l'ADN marqué sur substrat d'Au(111). La hauteur de ces fils est de 8 \AA , ce qui est supérieur à celui du double brin d'ADN déposé sur Au. Sur cette image, on observe à certains endroits la présence d'une forme "fantôme" ceci est une conséquence de l'absence de fixation forte de l'ADN sur la surface d'Au. A l'instar des dépôts d'ADN marqués ou pas, les doubles brins d'ADN se déplacent lors de l'imagerie de la surface. Ainsi, on n'observe aucun effet d'ancrage lié à l'interaction thiol-Au.

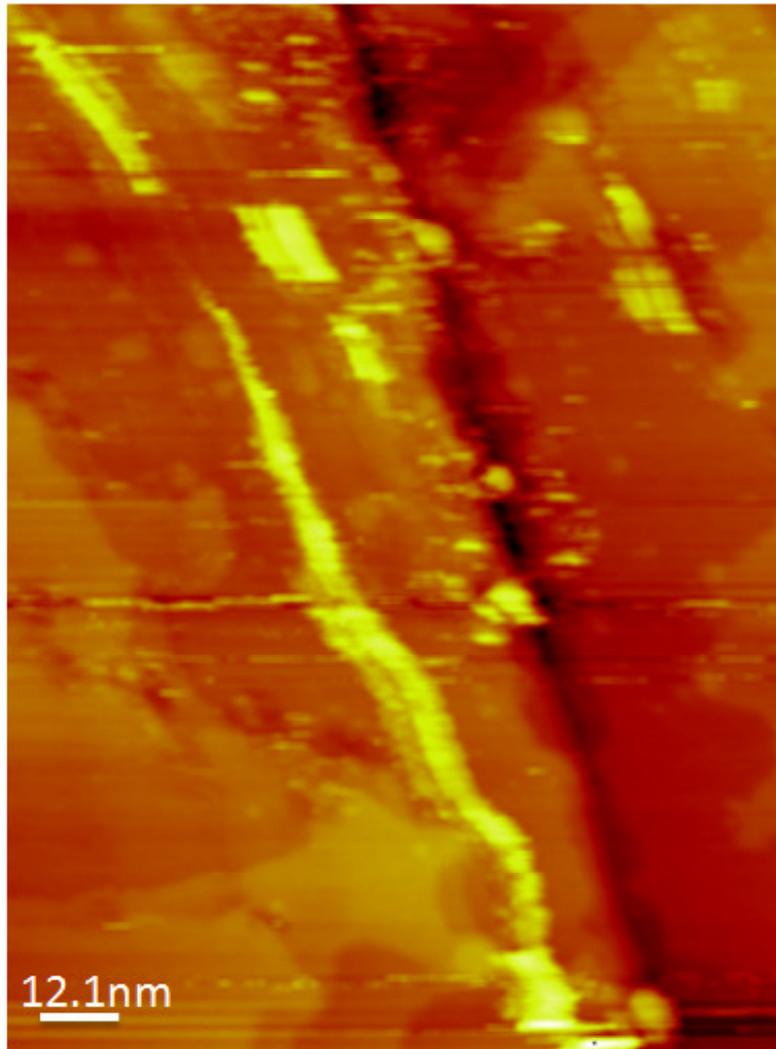


FIGURE 94 – Images STM (156×115 nm ($I_t = 21$ pA, $V_t = -2784$ mV)) de l'ADN de hareng marqué par des TP-2Py thiolanes (solution d'ADN de hareng [87.1 nM] avec une concentration de TP-2Py thiolane qui est de 0.2 mM, 10 pulses de 1.5 ms $\theta \sim -15^\circ$, STM UHV).

En vue de résoudre ce problème de déplacement de l'ADN marqué, nous avons décidé de procéder différemment. On commence par la fonctionnalisation de la surface d'Au via la chimisorption d'une solution de TP-2Py thiolane ou la TP-2Py thiol. Suite à quoi nous procédons à un dépôt d'ADN par vanne pulsée. Cependant, nous n'avons réussi aucune observation conjointe d'ADN. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé une méthode mise au point par Porath *et al.* [129]. Nous allons décrire cette méthode qui a été employée pour faire interagir l'ADN avec une monocouche auto-organisée.

5 Dépôt d'ADN par polarisation de la surface

Le groupe de Porath [129] a mis au point une méthode dite "électrostatique". Par cette technique, on polarise la surface d'Au positivement. Une goutte de $10 \mu\text{L}$ d'ADN simple brin ou du

poly(G)-poly(C) à [10nM] est versée sur une surface d'Au(111) à laquelle une tension de 180mV est appliquée pendant 15 minutes (voir figure 95). Les brins d'ADN vont venir se déposer sur l'Au par interaction électrostatique.

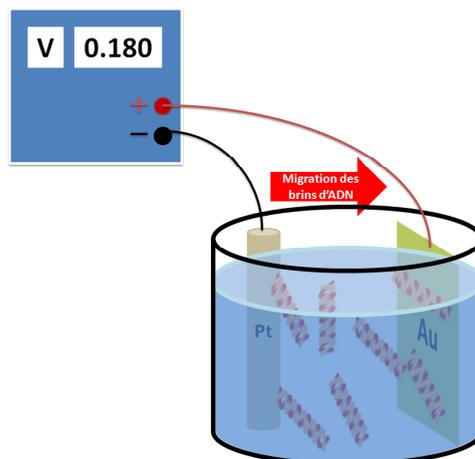


FIGURE 95 – Schéma de la méthode de dépôt par polarisation de l'échantillon [130] ($V_s=2.8$ V et $I_t=20$ pA).

La figure 96 montre un exemple d'image STM de l'ADN G4 obtenue par le groupe de Porath suite à la mise en œuvre de cette méthode.

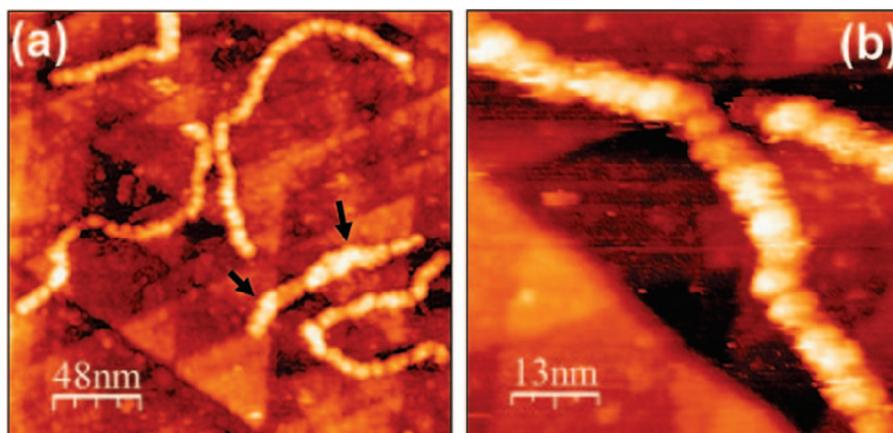


FIGURE 96 – Images STM d'une molécule d'ADN G4 sur un substrat d'Au (111) [130] ($V_s=2.8$ V et $I_t=20$ pA).

Par cette méthode, on utilise la charge négative de l'ADN pour venir interagir avec des groupements chargés positivement. Dans notre cas, nous avons utilisé des réseaux auto-organisés sur la surface d'Au(111). Le groupement terminal possède des fonctions chimiques chargées positivement. Celles-ci vont interagir, via interactions électrostatiques, avec l'ADN. En polarisant la surfaces d'Au positivement, on va favoriser l'édifice de la mono-couche et l'ADN chargé négativement (groupements périphériques phosphates).

Pour réaliser cette accroche, nous devons fonctionnaliser la surface d'Au(111). Dans le chapitre suivant, nous allons revenir sur les mécanismes de chimisorption de chaînes alkanethiols sur

l'Au(111).

6 Molécules chimisorbées sur Au(111)

6.1 Principe

Les mono-couches auto-organisées sont des assemblage 2D spontanément formés par adsorption de molécules sur la surface d'un solide. Durant les processus d'auto-organisation, les sous-unités constitutantes se combinent pour former des structures complexes. Un cas particulièrement étudié est celui des thiols linéaires, ceux-ci sont composées de trois parties :

- La tête (-SH sur la figure 97), thiolane ou disulfure
- L'espaceur (-R-)
- Le groupe terminal (X)

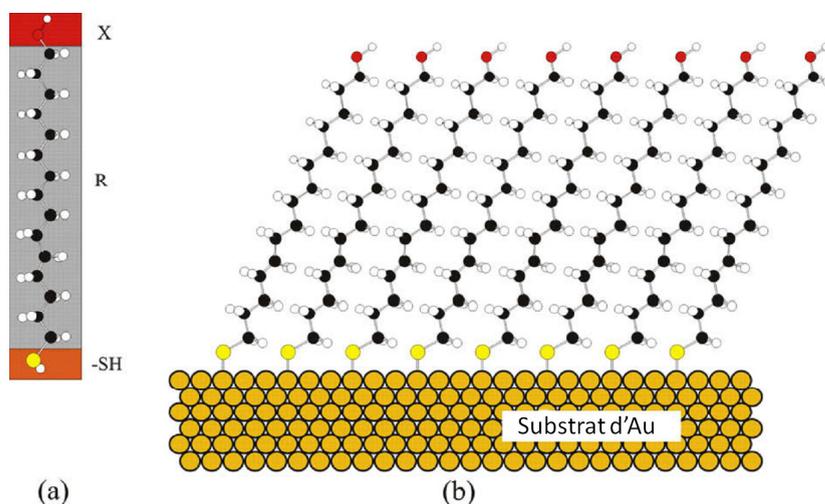


FIGURE 97 – (a) Structure schématique d'un organothiol (structure général en HS-R-X). (b) Structure de la mono-couche auto-organisée après immersion d'un substrat d'Au dans une solution d'organothiol [128].

La tête est composée de la fonction chimique qui va réagir avec la surface. Celle-ci va guider les processus d'auto-assemblage sur le substrat. Dans notre cas, la fonction thiol (-SH), est utilisée comme groupement d'attache sur le substrat d'Au. En présence d'Au, la liaison S-H va s'ouvrir pour laisser place à un liaison covalente entre l'atome de soufre et l'atome d'Au.

L'espaceur est composé d'une chaîne alkyle. Celle-ci va permettre de découpler le groupement terminal de la surface. L'interaction entre les chaînes alkyles s'apparente à des forces de van der Waals. Elles vont stabiliser la structure de la mono-couche. Ces forces dépendent de la longueur des chaînes et de la densité. Pour des raisons de synthèse, nous nous sommes intéressés aux chaînes du type $(R=-(CH_2)_n)$.

Le groupe terminal va conférer, à la mono-couche, des propriétés spécifiques. Un léger changement du groupe terminal peut modifier les propriétés physiques et chimiques de la mono-couche et perturber fortement son organisation. Par exemple, les groupements $-CH_3$ et $-CF_3$ confèrent des propriétés hydrophobes ou metallophobes à la mono-couche. Alors que les groupements $-COOH$,

-NH₂ ou -OH donnent des propriétés hydrophiles à la mono-couche. Les groupements -SH permettent quant à eux l'accrochage d'ions métalliques ou de nanoparticules à la mono-couche.

Le principal avantage de ce type d'organisation est sa grande simplicité de fabrication.

6.2 Préparation

La réalisation de mono-couches auto-organisées s'effectue en immergeant le substrat d'Or dans une solution de thiols. La durée d'immersion peut varier de quelques heures à plusieurs jours, suivant la concentration de la solution, laquelle s'étend de 1 à 10 mM. Les solvants les plus couramment utilisés sont l'éthanol et le méthanol mais le benzène, le toluène et l'hexane peuvent être utilisés pour les longues chaînes alors que les alcanes thiols à petites chaînes peuvent se dissoudre dans l'eau. En une heure, la surface d'Or est recouverte d'une mono-couche. La réorganisation de la surface nécessite beaucoup plus de temps (environs de 1 à plusieurs heures). Malheureusement, ce type d'organisation est extrêmement sensible à la qualité du substrat. Les défauts de formation d'une monocouche organisée sont généralement issus :

- d'une pollution du substrat,
- de la méthode de préparation du substrat,
- de la pureté de la solution de thiols.

6.3 Structure

Il a été démontré par simulations de dynamique moléculaire qu'une surface d'Or(111) [131] disposait de deux sites de fixation. Sur la figure 98, on peut voir la structure hexagonale de l'Or(111) (cercles blancs). Les points noirs représentent les sites de chimisorption des alkanethiols. Ceux-ci sont arrangés en structure hexagonale. Il y a deux sortes de sites d'accroches sur une surface (111), lesquels se réfèrent aux structures A et aux structure B. Dans les sites A, les atomes de Soufre interagissent avec les atomes d'Or de la sous-couche. Dans les sites B, les atomes de soufres interagissent avec une parties des atomes d'Or de la surface. Les thiols se situent soit dans les sites A soit dans les sites B.

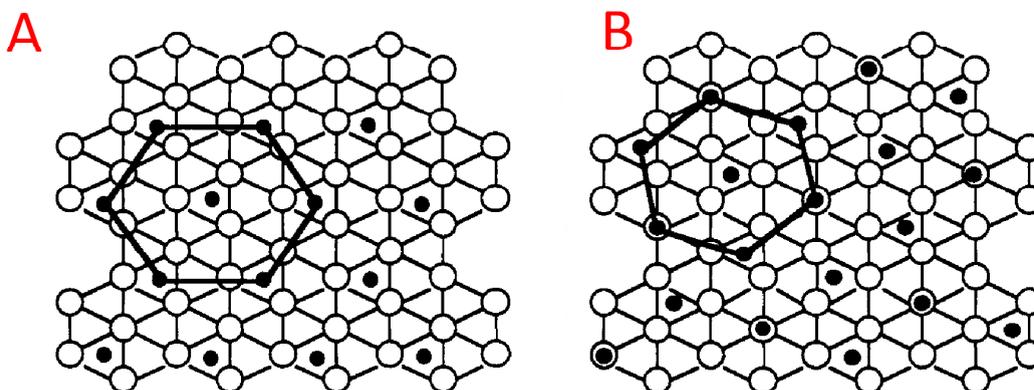


FIGURE 98 – Recouvrement hexagonal de l'Or(111) composé de sites fantômes alternatifs [131].

A partir de ces sites de fixation, on a déterminé la structure d'adsorption des alkanethiols sur l'Or (111). Quel que soit le site de fixation, la maille élémentaire est une structure hexagonale

compacte.

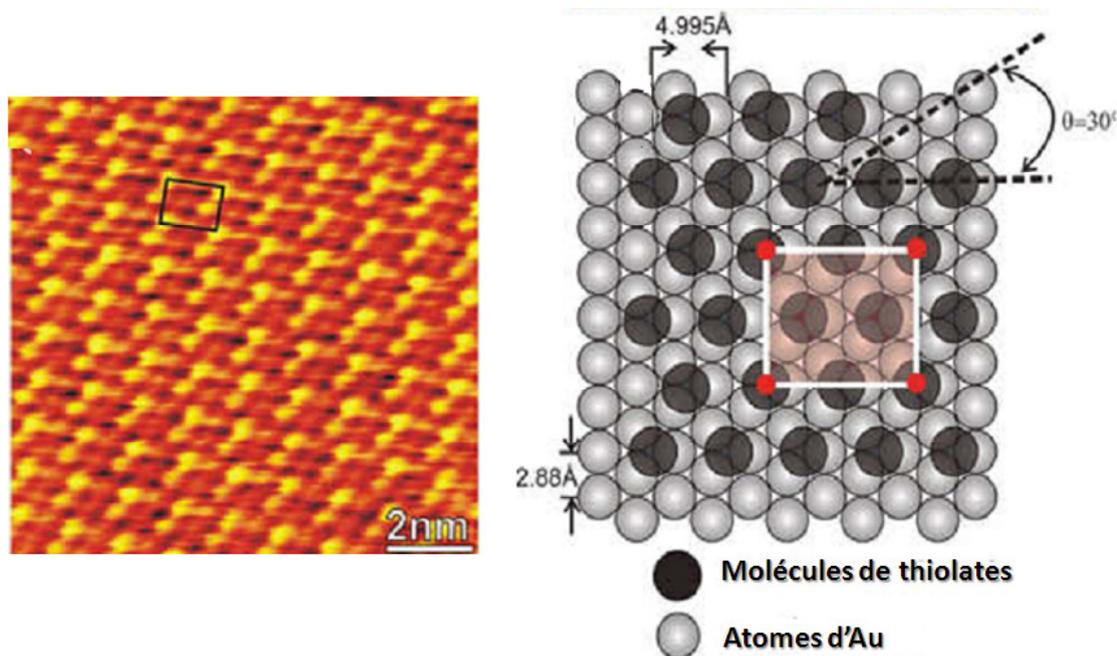


FIGURE 99 – Image STM d'une mono-couche auto-organisée de dodecanethiols ($C_{10}H_{21}SH$) et schéma représentant la structure de surface des dodecanethiols [128].

7 Monocouche de Bisphenylamines pyridinium thiolanes et thiols

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'organisation des TP-2Py thiolanes et des TP-2Py thiols sur la surface d'Or (111). Nous avons préparé des solutions de TP-2Py thiolanes et thiols à 1mM dans l'éthanol. Après avoir observé la reconstruction, l'échantillon d'Or a été immergé pendant plusieurs heures dans la solution utilisée. Nous avons observé la structure de la mono-couche par STM à l'interface solide-liquide.

7.1 Bisphenylamines pyridinium thiolanes

La figure 100 présente deux images successives de la TP-2Py thiolanes sur un substrat d'Or(111).

On observe la présence de points ayant une hauteur plus importante. Cependant, ceux-ci se déplacent suivant le mouvement de la pointe. On remarque, par ailleurs, une absence d'organisation, celle-ci pouvant résulter d'effets de répulsion des groupes terminaux chargés.

Des mesures de spectrométrie infrarouge ont été réalisées afin de caractériser macroscopiquement l'accrochage des TP-2Py thiolanes à la surface d'Or(111). En spectroscopie infrarouge, on mesure la réflexion en fonction de la longueur d'onde, 0.7-50 μm (200-1400 cm^{-1}). L'absorption de radiations infrarouges par une molécule induit une transition vibrationnelle. On remarque qu'à 537 cm^{-1} , on a une transition vibrationnelle qui correspond à la liaison disulfure, laquelle est présente dans la molécule en poudre. A l'inverse, sur le spectre infrarouge de la molécule chimisorbée

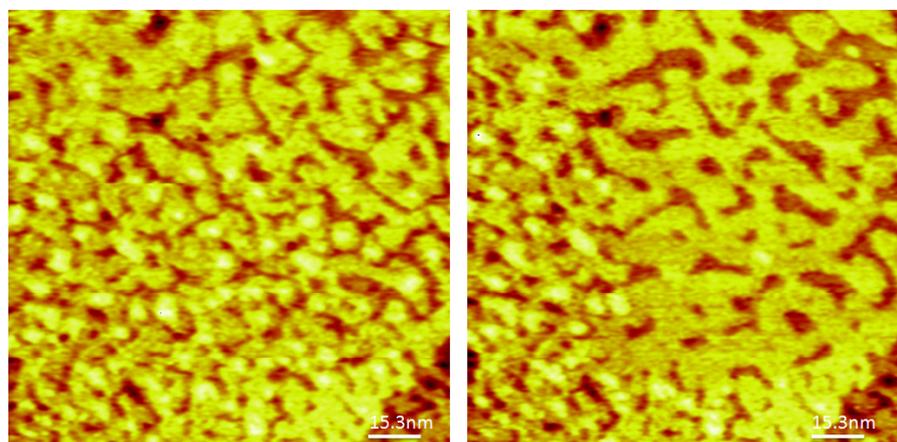


FIGURE 100 – Images STM (115 nm^2 ($I_t=40 \text{ pA}$, $V_t=-1889\text{mV}$) du TP-2Py thiolane (15 jours d'incubation de l'échantillon d'or dans une solution [1 mM]).

sur le substrat d'Au, cette transition vibrationnelle n'est plus observable. Lorsque la molécule de TP-2Py thiolane s'adsorbe sur la surface, la liaison thiolane se casse. Les atomes de Soufre vont alors réagir avec les atomes d'Au de la surface, permettant l'absorption des TP-2Py thiolanes.

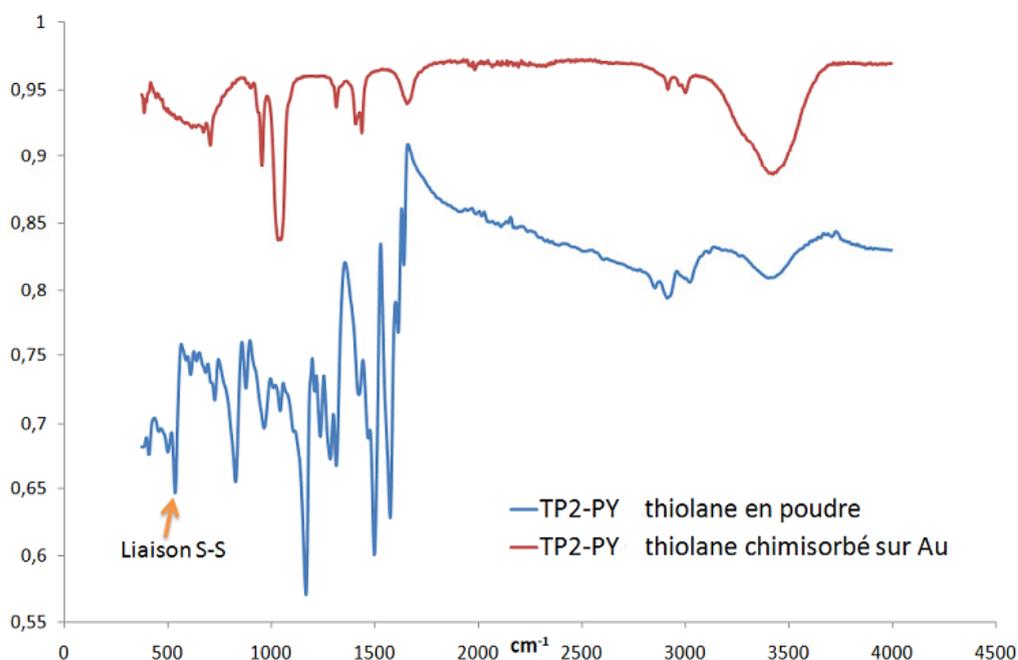


FIGURE 101 – Spectres infra-rouge de la poudre de TP-2Py thiolane et de la TP-2Py thiolane chimisorbée sur une surface d'Au(111).

Ces mesures confirment l'accrochage des TP-2Py thiolanes sur le substrat d'Au. Mais au STM, on n'observe aucune organisation particulière des TP-2Py thiolanes.

Outre les interactions entre groupes terminaux, on peut penser que l'angle entre le thiolane et la chaîne alkyle est trop faible pour permettre une organisation perpendiculaire au substrat. Il est probable que les molécules soient adsorbées à plat sur la surface, ce qui les rend indisponibles pour

toute interactions avec le petit sillon d'ADN ce qui peut expliquer qu'aucun effet d'ancrage d'ADN n'ait pu être observé dans les expériences précédemment décrites. Pour remédier à ce problème, nous avons effectué des essais préliminaires de co-adsorption de molécules de mercaptohexanol et des TP-2Py thiolanes les mercaptohexanols ayant pour objectif de relever les TP-2Py thiolanes couchées [132]. La figure 102 présente un schéma représentant l'organisation attendue de ce type de mono-couche, où les mercaptohexanols entraînent la desorption des groupements terminaux des TP-2Py thiolanes. Les mercaptohexanols se placeraient entre les fluorophores.

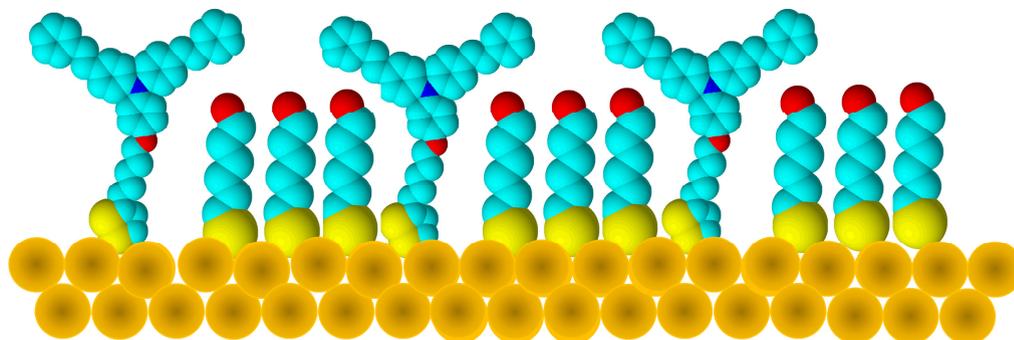


FIGURE 102 – Schéma de co-adsorption des mercaptohexanols et de la TP-2Py thiolane sur Au.

Au lieu de cette couche mixte, nous avons cependant observé un remplacement complet des TP-2Py thiolanes par les mercaptohexanols. D'autres études de co-adsorption des TP-2Py thiolanes et des mercaptohexanols devront être poursuivies, comme décrit dans le paragraphe suivant, d'autres essais ont été effectués avec des dérivés de TP-2Py thiols..

7.2 Bisphenylamines pyridinium thiol

7.2.1 Structure de la monocouche

Sur la figure 103, on observe une image de la mono-couche de TP-2Py thiol organisée sur Au(111). Le substrat d'au a été placé dans une solution de TP-2Py thiol/éthanol ([1 mM]) pendant 24 heures.

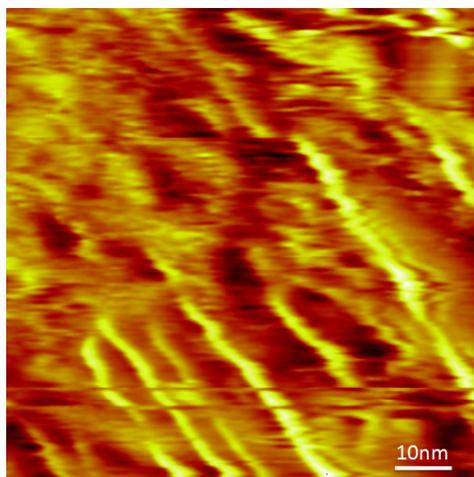


FIGURE 103 – Images STM (100 nm^2 ($I_t=21 \text{ pA}$, $V_t=+2072 \text{ mV}$) du TP-2Py thiol (24 heures d'incubation de l'échantillon d'au dans une solution de TP-2Py thiol[1 mM]/éthanol).

Sur cette image, on observe des fils que l'on attribue aux TP-2Py thiol. En effet, en l'absence de TP-2Py thiol, les fils ne sont pas présents. La structure en fil n'est visible que lorsque la tension tunnel, appliquée entre la pointe et le substrat est positive. Dans ce cas, les électrons circulent de l'échantillon vers la pointe favorisant l'imagerie des TP-2Py thiols chargés positivement. Les interactions entre les groupements terminaux environnants peuvent être à l'origine de cette structure : le recouvrement π a stabilisé la structure de la mono-couche, on n'observe pas ce type de structure avec la TP-2Py thiolane car le thiolane limite la mobilité de la tête de la molécule. Des structures analogues ont déjà été observées sur des colonnes de HexaBenzoCoronene chimisorbées sur Au(111) [133]

7.2.2 Dépôt d'ADN sur une monocouche

A partir de la mono-couche précédemment définie (voir sous section 7.2.1), nous avons déposé l'ADN de hareng par voie électrostatique (voir section 5). Après la réalisation de la monocouche, l'échantillon est rincé à l'éthanol puis séché. L'échantillon est ensuite plongé dans une solution d'ADN/eau mili-Q ([87.1 nM]). Le dépôt est effectué par polarisation de la surface. Pendant 5 minutes, une tension de +250 mV est appliquée entre l'échantillon et le fil de platine. Cette tension positive est sensée attirer le cœur chargé négativement (phosphate) de l'ADN vers l'au. Pour finir, l'échantillon est rincé à l'eau mili-Q puis placé sous vide. La figure 104 représente une image obtenue par STM sous ultra vide.

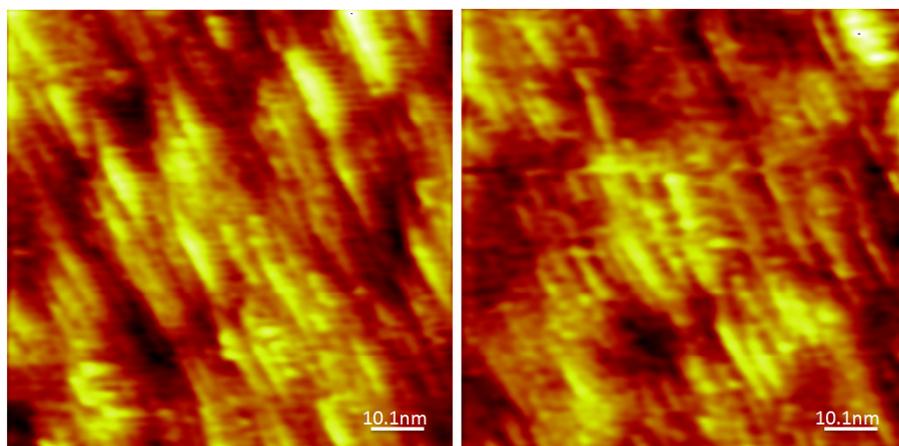


FIGURE 104 – Images STM (100 nm^2 ($I_t=21 \text{ pA}$, $V_t=-2726 \text{ mV}$) d'ADN de hareng [87.1 nM] déposé par polarisation de la surface d'Au (5 minutes à $V=250 \text{ mV}$), sur laquelle une mono-couche de TP-2Py thiol avait été déposée (24 heures dans solution à [1 mM] dans l'éthanol).

Sur cette image, on remarque qu'il y a un nombre important de fils pouvant être attribués à des doubles brins d'ADN. Ceux-ci ne sont pas visibles sur la surface d'Au lorsqu'elle n'est pas fonctionnalisée. Dans ce cas, on observe des agrégats d'ADN. La hauteur de ceux-ci est de 8 \AA ce qui correspond à la hauteur mesurée pour l'ADN néanmoins la présence de multicouches ne permet pas de voir la hauteur de l'ensemble ADN/TP-2Py thiol. Sur ces deux images non-consécutives, on remarque que les fils ne se déplacent pas. Puisque les interactions spécifiques TP-2Py thiol/ADN sont difficiles à mettre en œuvre nous avons décidé d'utiliser des alkanethiols fonctionnalisés par des groupements terminaux plus simples.

8 Hypochlorure de de 11-amino-1-undecanethiol

A la place des dérivés TP-2Py thiols, nous nous sommes intéressés à des alkanethiols fonctionnalisés par des fonctions différentes que celles de nos marqueurs à ADN. Plus précisément, nous avons utilisé le hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol (voir figure 105).

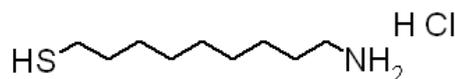


FIGURE 105 – Structure chimique du hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol et son contre-ion (HCl).

Nous avons choisi cet alkanethiol puisque celui-ci peut gagner un proton et devenir chargé positivement. Dans une solution d'éthanol, le groupement NH_2 va se modifier en groupement NH_3^+ . L'objectif de ces expériences est d'échanger le contre-ion Cl^- par le double brin d'ADN. L'ADN, grâce à la charge négative des groupements phosphates, sera maintenu sur la monocouche par des interactions électrostatiques.

8.1 Organisation sur Au

Pour organiser les thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol sur une surface d'Au, on immerge le substrat d'Au dans une solution de hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol /éthanol à 1mM pendant 30 minutes. L'échantillon a été observé par STM sous ultra-vide.

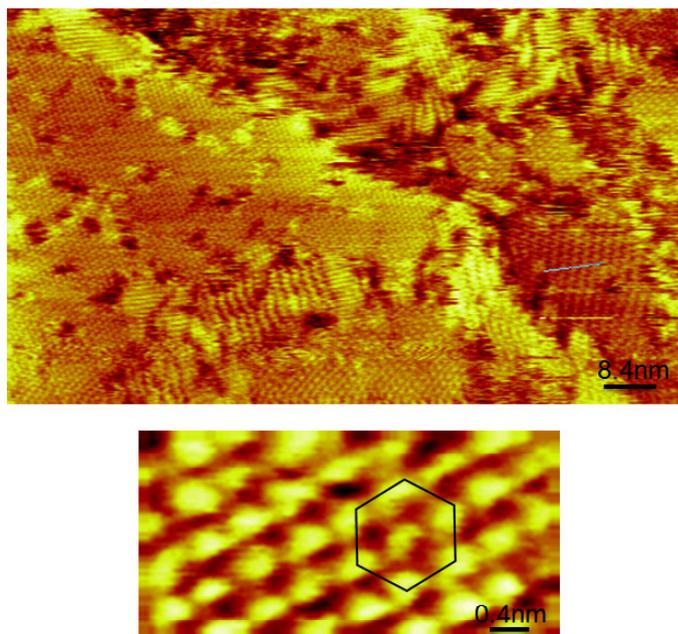


FIGURE 106 – Organisation des thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol sur une surface d'or ($91 \times 50 \text{ nm}$ et $4 \times 2 \text{ nm}$ ($I_t = 18 \text{ pA}$, $V_t = 1680 \text{ mV}$)).

La figure 106 illustre l'auto-organisation des thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol sur une surface d'Au. Sur la première image de la figure 106, il y a différents domaines. Lorsque l'on agrandit une zone de l'image, on observe une structure hexagonale compacte identique aux alcanethiols non fonctionnalisés. A l'inverse des dérivés TP-2Py thiols, les thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol forment une mono-couche dense et organisée sur la surface d'Au.

8.2 Interaction ADN/hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol

Le dépôt d'ADN sur la monocouche de thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol a été réalisé par polarisation de la surface comme explicité précédemment. Il est nécessaire de polariser la surface d'au afin de favoriser l'échange des contre-ions. Après avoir déposé les thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol sur la surface, nous avons immergé l'échantillon dans une solution d'ADN/eau mili-Q [87.1 nM]. Une tension de 180 mV a été appliquée pendant 5 minutes. La figure 107 présente des images STM obtenues sous ultra-vide.

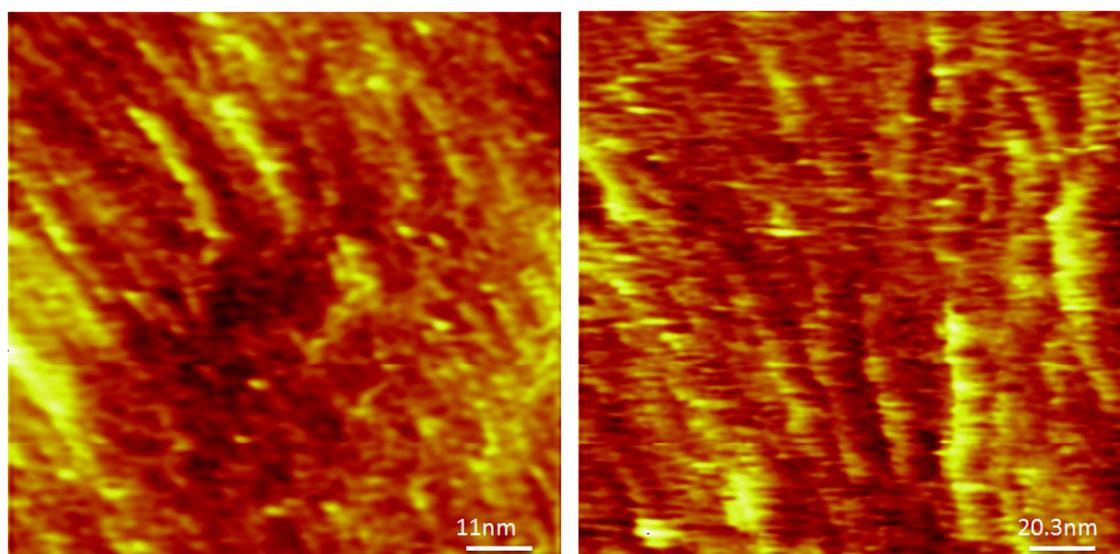


FIGURE 107 – Images STM 110 nm^2 ($I_t=17 \text{ pA}$, $V_t=-2356 \text{ mV}$) d'ADN de hareng [87.1 nM] déposé par polarisation de la surface d'au (1 minute à $V=180 \text{ mV}$), sur laquelle une mono-couche d'hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol avait été déposée (5 minutes dans solution ethanol/hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol [1 mM]).

On remarque qu'il y a de nombreux fils à la surface de l'au. Ceux-ci sont attribués aux doubles brins d'ADN qui sont en interactions avec la mono-couche de hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol. La hauteur mesurée est de 8 \AA ce qui correspond à la hauteur mesurée pour les brins d'ADN seuls. A l'instar des dépôts d'ADN effectués sur une mono-couche de TP-2Py thiolane, on remarque une forte densité de fils. Les brins d'ADN ne sont pas déplacés par la pointe.

9 Conclusion

Après avoir caractérisé l'interaction ADN/fluorophore à l'échelle sub- λ à l'aide de la microscopie biphotonique (voir chapitre 4), nous avons utilisé un STM en vue de caractérisations complémentaires à l'échelle nanométrique. A l'aide d'une vanne pulsée, nous avons réussi à déposer l'ADN double et simple brin sur une surface d'Au. Cependant, l'absence d'ancrage de l'ADN n'a pas permis d'obtenir des images par STM avec une résolution permettant d'observer la complexation par le marqueur. Nous avons utilisé les propriétés d'interaction de la TP-2Py pour l'ADN pour tenter d'ancrer celui-ci à l'Au (111). Pour cela, nous avons modifié la TP-2Py en lui ajoutant un thiol ou un thiolane. Les premiers dépôts d'ADN marqué par ces molécules n'ont pas permis de fixer l'ADN à l'Au. Nous avons finalement décidé de fonctionnaliser la surface par des thiols ayant une terminaison avec une charge positive pour réagir avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Dans la perspective de favoriser l'échange des contre-ions, nous avons utilisé une méthode dite "électrostatique" où l'on polarise la surface d'Au (méthode développé dans le groupe de Porath). Grâce à ce type d'organisation et de dépôt, nous avons vraisemblablement réussi à fixer les double brins d'ADN à une surface d'Au (111). Néanmoins, la prochaine étape consistera à diminuer le taux de recouvrement de la surface afin d'avoir une concentration de double brin d'ADN sub-monocouche permettant l'analyse de molécules individuelles.

Conclusion générale

Lors de travaux précédents [15], les composés triphénylaminés vinylpyridinium (TPs-Py) avaient montré un ensemble de propriétés adaptées pour le marquage d'ADN en microscopie confocale et biphotonique : forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN, section efficace d'absorption à deux photons élevée et marquage spécifique de l'ADN nucléaire. L'objectif de cette thèse était de comprendre l'origine de l'exaltation de la fluorescence observée dans le cas d'interactions non covalentes TP/ADN. Ces effets apparaissant particulièrement intéressants en vue de la mise au point de marqueurs d'ADN optimisés.

Dans cet objectif, nous avons mis en place une plate-forme de microscopie biphotonique résolue en temps de façon à pouvoir analyser à la fois l'intensité des signaux émis (de façon à caractériser la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{2p})) et la dynamique du signal. Des mesures conjointes de durées de vie du signal et de durées de vie d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées. Elles ont permis d'aboutir à la caractérisation complète des différents voies de relaxation radiatives et non radiatives des fluorophores considérés. Nous avons pu mettre en évidence que, lorsque les TP interagissent avec l'ADN (insertion vraisemblable dans le petit sillon) ils voient leurs mouvements fortement restreints ; on observe en effet une forte diminution de la constante de relaxation non radiative (k_{nr}). Cette insertion des TPs dans l'ADN est également associée à une forte augmentation de la constante de relaxation radiative (k_r) qui peut être attribuée, à la fois, à une variation de conformation ou une variation de l'environnement des fluorophores qui passent d'un environnement aqueux propice au quenching à un environnement organique (bases d'ADN).

Différents fluorophores ont été conçus, optimisés et étudiés. Contrairement à ce qui avait pu être observé dans le cas des analogues neutres en milieu organique, nous avons pu mettre en évidence que les composés possédant la plus forte brillance étaient non pas les dérivés à trois branches, de symétrie octupolaire, mais les dérivés à deux branches, de symétrie a priori quadrupolaire.

Dans le cas des trois branches, étant donnée leur taille, l'interaction avec l'ADN est limitée. En l'occurrence la totalité de la molécule ne peut s'insérer dans le sillon. Selon les simulations, une branche reste à l'extérieur de l'ADN.

De la même façon, les propriétés des dérivés Trinaphtylamine en milieu organique s'avèrent très décevante au regard des propriétés des analogues neutres. Ceci met en exergue, l'importance des interactions fluorophores/ADN au delà de l'effet de taille (entre deux et trois branches). Ainsi pour une structure de cœur donnée TP, les substituants ont une grande influence. Par exemple, le substituant Bzim est bien connu pour interagir avec le petit sillon de l'ADN (forte affinité) et permet aux composés TPs-bzim d'obtenir une très forte *brillance* ($\sigma_{2p}\phi_f$). Néanmoins, on ne peut pas seulement s'en tenir à l'interaction avec l'ADN (affinité). Il faut prendre en compte la spécificité de l'interaction. Ainsi, pour une structure donnée : la TP-2PyO, nous avons montré que si on augmentait la spécificité des interactions en augmentant le nombre de sites de fixation spécifiques de type petit sillon (drewAT), l'exaltation de fluorescence en présence d'ADN était plus importante. Ceci se caractérise par une augmentation de la durée de vie de fluorescence et par une diminution de la constante de relaxation non radiative (k_{nr}) par rapport à l'ADN naturel.

Pour aller au delà des caractérisations optiques, nous avons cherché à caractériser à l'échelle nanométrique le complexe fluorophore/ADN. Pour cela, nous avons mis en œuvre un dispositif de dépôt par vanne pulsée. Nous avons réussi à déposer l'ADN double et simple brin sur une surface d'Au. Néanmoins, l'absence d'interaction forte entre l'ADN et le substrat entraîne des effets

indésirables de déplacements des brins d'ADN par la pointe STM. Nous avons essayé de mettre à profit l'interaction fluorophore/ADN en vue d'"ancrer" l'ADN à la surface d'Au. Les premiers dépôts d'ADN marqué par ces molécules n'ont pas permis de fixer l'ADN à l'Au. Nous avons décidé de fonctionnaliser la surface par des thiols ayant une terminaison avec une charge positive pour réagir avec les groupements phosphate chargés négativement de l'ADN. Les premiers résultats obtenus devraient nous permettre, à terme, de caractériser à très haute résolution les complexes fluorophores/ADN. Ainsi, nous pourrions voir dans quelle mesure le fluorophore ou l'ADN change de conformation.

Toutes ces études nous ont amené à mieux comprendre l'origine des bonnes propriétés de la TP-2Bzim ($\sigma_{2p}\phi_f \sim 20\times$ celui de la TP-2Py) La meilleure conjugaison intramoléculaire de la TP-2Bzim permet d'obtenir un grand rendement quantique de fluorescence et une grande section efficace d'absorption à deux photons. De plus, la très bonne interaction avec l'ADN et la bonne affinité pour le petit sillon font de la TP-2Bzim un excellent marqueur d'ADN pour la microscopie biphotonique.

Les perspectives de ce travail sont de plusieurs ordres.

En ce qui concerne les fluorophores pour la microscopie biphotonique, on pourrait croiser un cœur CBZ avec des substituants Bzim, afin de profiter de l'effet de rigidification du cœur avec le carbazole et de l'effet de transfert des charges issu du substituant benzimidazole. Cependant la prise en compte des interactions fluorophore/ADN complique la démarche d'ingénierie moléculaire. Au delà de l'ingénierie moléculaire, on pourrait associer les fluorophores avec des nanoparticules et ainsi augmenter l'intensité de fluorescence des fluorophores via des effets d'exaltation locale de champ.

En ce qui concerne l'observation de l'ADN marqué à haute résolution, un co-dépôt d'ADN marqué et non marqué sur une mono-couche de thiols pourrait permettre l'observation de fluorescence localisée, induite par le courant tunnel.

Lexique

ϕ_f : rendement quantique de fluorescence	ARN : Acide RiboNucléique
λ : longueurs d'onde	A : Adénine
k_r : constante de vitesse radiative de fluorescence	C : Cytosine
k_p : constante de vitesse de phosphorescence	G : Guanine
k_{nr} : constante de vitesse non-radiative	T : Thymine
ε : coefficient d'extinction molaire	S_n : état stable singulet de niveau n
τ_f : la durée de vie de fluorescence	T_1 : état excité triplet de niveau 1
I_{abs} : l'intensité lumineuse absorbée	Stoke shift : déplacement de Stoke
I_{inc} : l'intensité lumineuse incidente	d_{xy} : résolution latérale
I_{trans} : l'intensité lumineuse transmise	d_z : résolution longitudinale
I_f : l'intensité de fluorescence	V_{UPC} : volume d'excitation en microscopie mono-photonique confocale
C : la concentration en fluorophore	V_{UPE} : volume d'excitation en microscopie mono-photonique d'épifluorescence
SHG : génération de second harmonique	V_{DP} : volume d'excitation en microscopie biphotonique
THG : génération de troisième harmonique	MCP-PMTs : MultiChannel Plate - PhotoMultiplier Tubes
GM : $\sim 10^{-50} cm^4 s$	Z_0 : distance de Rayleigh longitudinale
σ_{2p} : section efficace d'absorption à deux photons	CCD : Charged Coupled Device
NA : numerical aperture (ouverture numérique)	TAC : Time-Amplitude-Converter
PSF : Point Spread Function (fonction d'appareille d'un point)	CFD : Constant Fraction Discriminator (discriminateur)
IPSF : Illumination Point Spread Function	PVA : PolyVinyl Alcohol
r : coefficient d'anisotropie	UHV : Ultra High Vacuum
τ_r : durée de vie d'anisotropie de fluorescence	
I_{\parallel} : intensité de fluorescence selon la polarisation parallèle	
I_{\perp} : intensité de fluorescence selon la polarisation perpendiculaire	
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching	
FLIP : Fluorescence Loss In Photobleaching	
TP : Triphenylamine	
TN : TriNaphtylamine	
Py : pyridinium	
PyO : pyridinium ortho	
Bzo : benzoxazole	
Bzt : benzotriazole	
Bzim : benzimidazole	
CBZ : carbazole	
D_r : coefficient de diffusion rotationnelle	
ADN : Acide Désoxyribonucléique	

Septième partie

Annexe

Table des matières

A	Caractérisation de l'instrumentation	143
A.1	Montage électrique de la photodiode rapide	143
A.2	Les dicrisminateurs : Principe de fonctionnement	143
A.3	Traitement des données	145
A.4	Traitement des données pour le calcul des sections efficaces d'absorption à deux photons	147
A.4.1	Facteur de correction sur le microscope	147
A.4.2	Taux de collection pour chaque fluorophore sur le banc de mesure de section efficace d'absorption à deux photons (système en L)	149
A.5	Section efficace d'absorption à deux photons des composés étudiés	149
A.5.1	Dans l'ADN le dichloromethane	149
A.5.2	Dans l'ADN de hareng	150
B	Propriétés des fluorophores	151
B.1	Spectres d'absorption et d'émission des composés étudiés	151
B.2	Mesures de durées de vie de fluorescence	153
B.2.1	TP-2Py	153
B.2.2	TP-3Py	154
B.2.3	TP-2PyO	155
B.2.4	TP-3PyO	156
B.2.5	TP-2Bzim	157
B.2.6	TP-3Bzim	159
B.3	Influence de la concentration en sel	160
B.3.1	TP-2Py dans le DrewAT	160
B.3.2	TP-2Bzim dans le DrewAT	161
B.4	Anisotropie de fluorescence	162
B.4.1	Hoechst 33258	162
	Références	164

A Caractérisation de l'instrumentation

A.1 Montage électrique de la photodiode rapide

Pour réaliser et déclencher des mesures de durée de vie de fluorescence, nous avons utilisé une photodiode (START). Pour obtenir un temps de montée extrêmement rapide, nous avons inscrit la photodiode dans un schéma électrique optimisé. Celui-ci est décrit dans la figure 108.

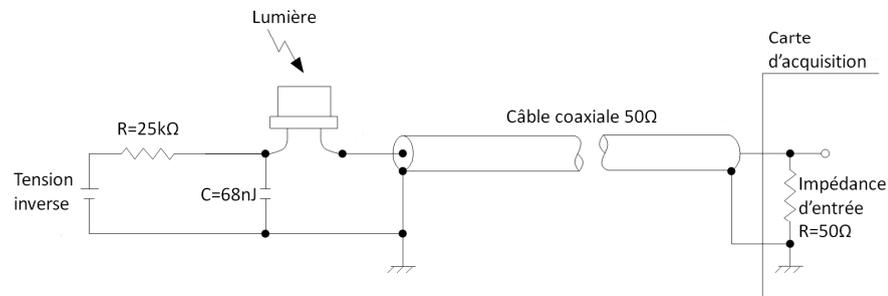


FIGURE 108 – Schéma de montage électrique de la photodiode rapide.

A.2 Les dicrisminateurs : Principe de fonctionnement

Avec ce composant électronique, on va sélectionner les impulsions issues de l'excitation laser. On utilise aussi ce composant pour mettre en forme le signal électrique issu de la photodiode (élargissement de l'impulsion) et pour supprimer le bruit de fond. Le discriminateur à fraction constante fait la comparaison du signal d'origine du détecteur avec un signal amplifié et retardé de ce même signal originel. Le signal issu de cette comparaison change sa polarité exactement quand la fraction constante de l'amplitude de l'impulsion du détecteur est atteinte. Ce système fonctionne pour des détecteurs qui ont des temps de montée supérieurs à la nanoseconde.

Il existe trois facteurs limitant la résolution temporelle dans l'utilisation d'un discriminateur à fraction constante.

- les oscillations temporelles (jitter),
- la dérive (drift),
- le décalage temporel (walk ou time slewing).

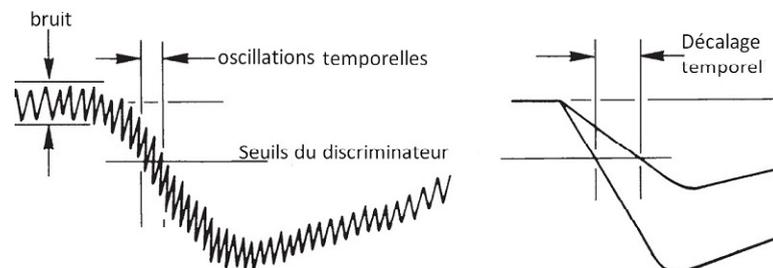


FIGURE 109 – Deux facteurs limitatifs de la résolution temporelle [Hamamatsu].

Lorsque le front montant d'une impulsion électrique traverse le seuil préalablement défini, le comparateur génère une impulsion logique. L'impulsion se termine lorsque le front descendant de l'impulsion électrique croise à nouveau le seuil. La première transition de l'impulsion logique est utilisée pour marquer le temps d'arrivée de l'impulsion électrique, et cette durée correspond au dépassement du seuil par le front montant de l'impulsion électrique. Les oscillations temporelles (jitter) correspondent aux petites variations de l'impulsion électrique en sortie du détecteur.

Suivant l'intensité du signal de fluorescence, le CPM-PMTs génère un nombre variable de photoélectrons. Lorsque l'intensité de fluorescence captée par la photocathode est élevée, l'amplitude de l'impulsion électrique de sortie du CPM-PMTs est grande. Selon le même principe, si l'intensité est faible, l'amplitude du signal électrique sera faible. Cette différence d'amplitude peut créer un décalage temporel (walk ou time slewing) lors de l'utilisation d'un discriminateur (voir partie droite de la figure 109).

La dérive est une erreur qui est induite par le vieillissement des composants et par des variations de température des circuits du discriminateur. Cette erreur n'est perceptible que lors de longues périodes d'expérimentation et lorsque la température n'est pas régulée. On retrouve ce type de problème lors d'utilisation du laser Titane-Saphir, afin d'éviter tout problème de ce type, l'expérience a été montée dans un laboratoire climatisé ($T=23^{\circ}\text{C}$).

Pour l'utilisation de détecteurs dont le temps de montée est plus rapide que la nanoseconde, les discriminateurs à résolution sub-nanoseconde ont été mis au point. Avec les discriminateurs à résolution sub-nanoseconde, les problèmes d'oscillations et de décalage temporel ont été réduits de tel sorte que l'on puisse obtenir une résolution de quelques picosecondes. Cependant, ce type de discriminateur n'a d'intérêt que pour des détecteurs dont les oscillations sont déjà très faibles. Généralement, on utilise les discriminateurs à résolution sub-nanoseconde avec les CPM, les CPM-PMTs, les photodiodes rapides et les PMTs rapides. Dans notre cas, on utilise ce type de détecteur après le CPM-PMTs.

A.3 Traitement des données

Les mesures effectuées par le TAC sont enregistrées par une carte National Instrument. Cette carte est codée en 16bits : sur toute la plage de valeurs on a $2^{16} = 65536$ valeurs. La résolution maximale pouvant être obtenue est le rapport entre la tension maximale de sortie du TAC (qui correspond à une durée maximale de 50ns) et le nombre de valeurs possibles pour la carte NI. Celle-ci est de $50\text{ns}/65536 = 0.7629\text{ps}$. Ainsi, la largeur minimale des histogramme d'occurrence peut être de 0.7629ps . Dans nos expériences, nous utilisons une résolution d'affichage de $0.7629 \times 32 = 24.4140\text{ps}$, à cette valeur nous supprimons les erreurs statistiques de mesures. Ces données sont enregistrées dans un fichier ASCII où sont conservées les tensions de chaque mesure. A l'aide du logiciel ORION d'Origine, on recrée les histogrammes du nombre d'occurrence et on ajuste la décroissance de fluorescence par une ou plusieurs fonctions exponentielles décroissantes (voir équation 46). Pour cela, nous avons utilisé un logiciel réalisé en Fortran par Thomas Gustavsson (Laboratoire F. Perrin, CEA) où par la méthode des moindres carrés, on fait l'ajustement de la décroissance de fluorescence après déconvolution de la fonction d'appareil.

$$I_f(t) = A_1 e^{-t/\tau_{f1}} + A_2 e^{-t/\tau_{f2}} + A_3 e^{-t/\tau_{f3}} \quad (46)$$

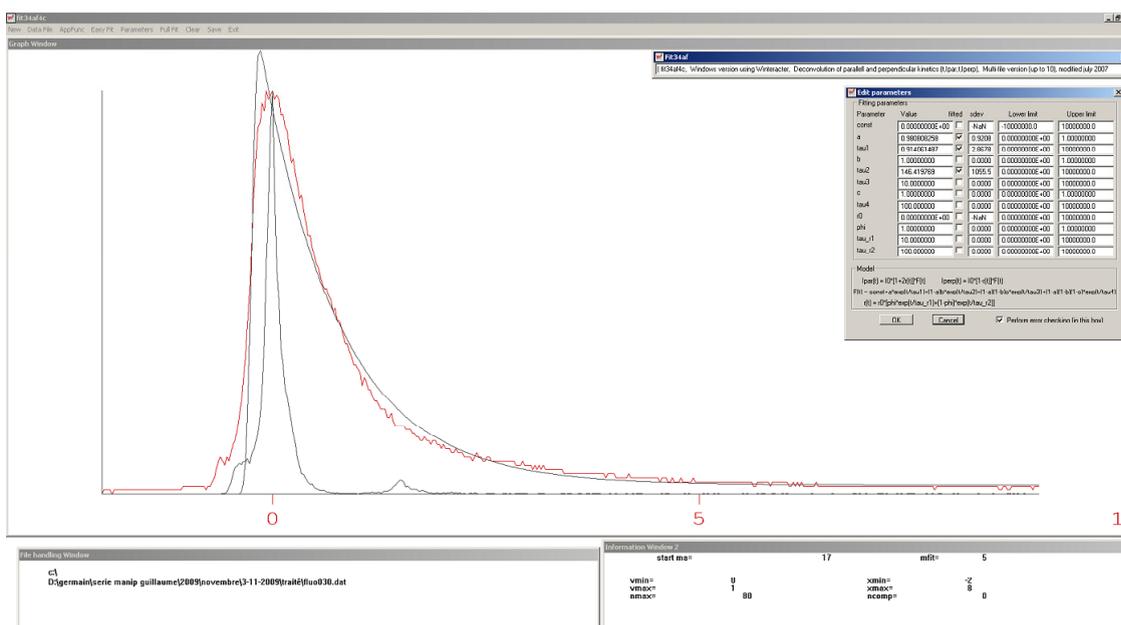


FIGURE 110 – Interface du logiciel de régression exponentielle décroissante.

Pour les calculs des caux de relaxation radiative k_r et non-radiative k_{nr} , dans le cas de déclin multiexponentiels nous avons utilisé la définition de la durée de vie moyenne $\langle \tau_f \rangle$ décrite par Lakowicz [23] (voir equation 47).

$$\langle \tau_f \rangle = \int_0^{\infty} t I(t) dt = \int_0^{\infty} I(t) dt \quad (47)$$

$\langle \tau_f \rangle$ correspond au temps moyen passé par la molécule dans son état excité.

Si on considère l'équation 46 alors la durée de vie moyenne ($\langle \tau_f \rangle$) est définie par :

$$\langle \tau_f \rangle = \frac{A_1 \tau_{f_1}^2 + A_2 \tau_{f_2}^2 + A_3 \tau_{f_3}^2}{A_1 \tau_{f_1} + A_2 \tau_{f_2} + A_3 \tau_{f_3}} \quad (48)$$

Avec cette valeur de la durée de vie moyenne, on peut définir les constantes de vitesse de relaxation radiative k_r (voir equation 49) et non radiative k_{nr} (voir equation 50).

$$k_r = \frac{\phi_f}{\langle \tau_f \rangle} \quad (49)$$

$$k_{nr} = \frac{(1 - \phi_f)}{\langle \tau_f \rangle} \quad (50)$$

A.4 Traitement des données pour le calcul des sections efficaces d'absorption à deux photons

A.4.1 Facteur de correction sur le microscope

Pour pouvoir comparer les mesures de section efficaces d'absorption à deux photons de différents composés, il faut tenir compte des variations éventuelles du taux de collection de la fluorescence des différents composés. Par ailleurs, selon la longueur d'onde de fluorescence, le rendement quantique du détecteur peut varier. De plus, selon la longueur d'onde de fluorescence, le signal de fluorescence émis peut se trouver partiellement absorbé par les filtres utilisés pour couper le faisceau laser excitateur résiduel au niveau du détecteur.

La figure 111 présente les spectres de transmission de tous les filtres utilisés pour bloquer le signal excitateur.

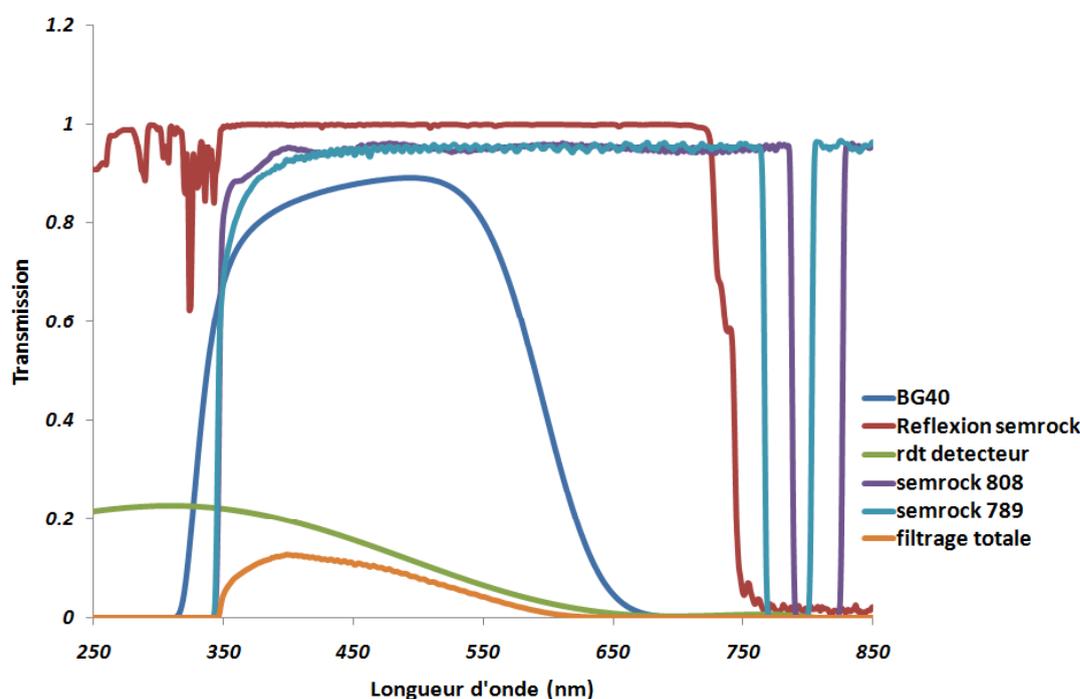


FIGURE 111 – Spectres de transmission des différents filtres sur la passage de la fluorescence et le spectre de filtration vis par la fluorescence avant le CPM-PMTs.

Si l'on considère l'absorption des différents filtres utilisés ainsi que le rendement quantique du détecteur, on s'aperçoit que la part de fluorescence détectée pour certains composés est extrêmement faible. Ainsi, pour chaque espèce, nous avons multiplié la fluorescence mesurée lors d'une excitation monophotonique par le spectre de transmission total (en orange). A titre d'exemple, nous avons calculé la part mesurée par le détecteur de la fluorescence provenant d'une solution de Fluorescéine. La figure 112 présente les spectres de fluorescence de la Fluorescéine (eau, pH 11) sans absorption et par absorption des filtres du système.

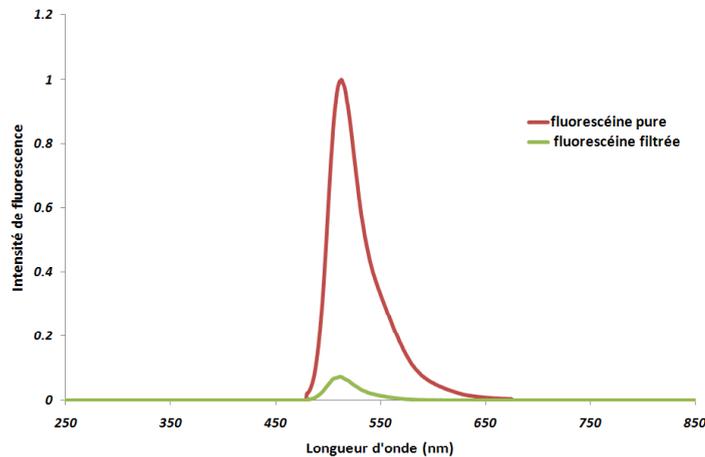


FIGURE 112 – Spectre de fluorescence de la fluorescéine sans filtre et le spectre de fluorescence de la fluorescéine atténué par les filtres placés entre la solution et le détecteur.

Lorsque l'on fait le rapport des aires des deux spectres ci-dessus, on trouve le taux de collection. Nous avons utilisé les valeurs de ce taux de collection différentiel pour évaluer les sections efficaces d'absorption à deux photons de chacun des composés testés. Le tableau suivant donne le taux de collection évalué pour chaque molécules en préalable aux mesures de section efficace d'absorption à deux photons.

TABLE 11 – Taux de collection évalués pour les principaux fluorophores testés sur le microscope (dans l'ADN et le DrewAT).

	taux de collection
TP-2Py	0.00325
TP-2PyO	0.00535
TP-3Py	0.00192
TP-3PyO	0.00529
TP-2Bzim	0.01575
TP-3Bzim	0.01440
Fluorescéine	0.05864
Rhodamine 6G	0.09346
Hoechst 33258	0.09398

A.5.2 Dans l'ADN de hareng

A partir des taux de collection précédemment décrits, nous avons tracé les courbes de la section efficace d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde.

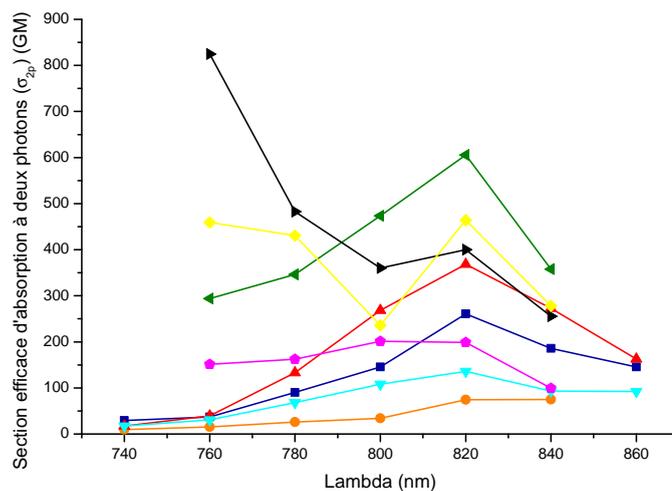


FIGURE 114 – Section efficace d'absorption à deux photons des composés dans l'ADN de hareng à 40 équivalents en paires de bases [$1\mu M$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim ; en noir : la TP-3Bzim, en jaune : la CBZ-3PyO et en rose la CBZ-2Py) (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2).

B Propriétés des fluorophores

B.1 Spectres d'absorption et d'émission des composés étudiés

Les spectres d'émission normalisés des différents composés étudiés dans l'ADN, sont donnés sur la figure 115.

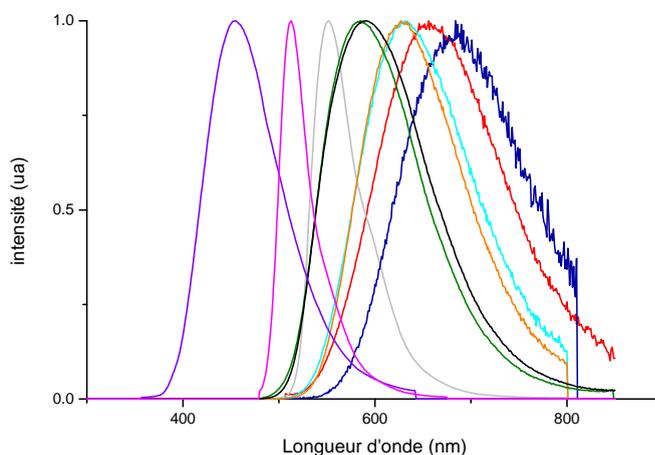


FIGURE 115 – Spectres d'émission normalisés de fluorescence des dérivés triphénylaminés [$100\mu\text{M}$] en présence d'ADN [40 équivalents], (en rouge : TP-2Py, en bleu : TP-3Py, en bleu ciel : TP-3PyO, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim, en noir : TP-3Bzim, en violet : Hoechst 33258). Spectre d'émission de fluorescence de la Fluorescéine [$50\mu\text{M}$] dans l'eau (ph11) (en magenta : Fluorescéine). Spectre d'émission de fluorescence de la Rhodamine 6G [$50\mu\text{M}$] dans l'éthanol (en gris : Rhodamine 6G).

Les spectres d'absorption normalisés des composés étudiés dans l'ADN, dans l'eau pH11 pour la Fluorescéine et dans l'éthanol pour la Rhodamine 6G sont donnés sur la figure 116.

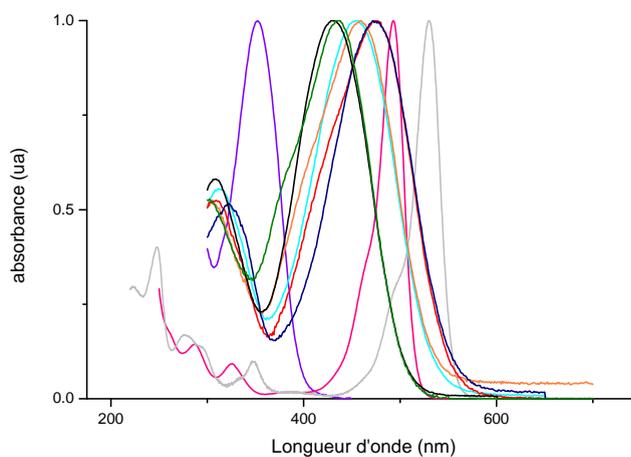


FIGURE 116 – Spectres d'absorption normalisés des dérivés triphénylaminés [$100\mu\text{M}$] en présence d'ADN [40 équivalents], (en rouge : TP-2Py, en bleu : TP-3Py, en bleu ciel : TP-3PyO, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim, en noir : TP-3Bzim, en violet : Hoechst 33258). Spectre d'absorption de la Fluorescéine [$50\mu\text{M}$] dans l'eau (ph11) (en magenta : Fluorescéine). Spectre d'absorption de la Rhodamine 6G [$50\mu\text{M}$] dans l'éthanol (en gris : Rhodamine 6G).

Les spectres d'absorption normalisés des composés étudiés TP_s et TN_s dans le dichlorométhane sont donnés sur la figure 117.

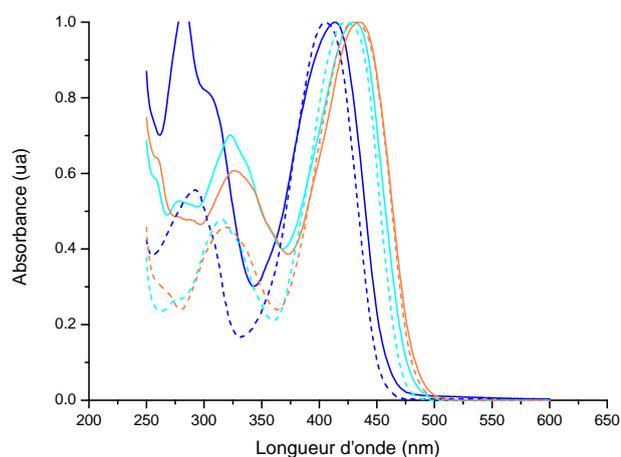


FIGURE 117 – Spectres d'absorption normalisés des TP_s (pointillé) et TN_s (continu)[100 μ M] dans le dichlorométhane (en bleu : Py, en bleu ciel : Bzo, en orange : Bzt).

Les spectres d'émission normalisés des composés étudiés TP_s et TN_s dans le dichlorométhane sont donnés sur la figure 118.

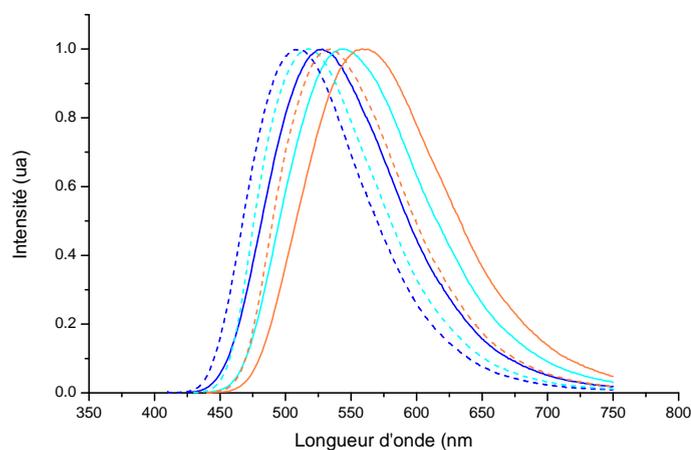


FIGURE 118 – Spectres d'émission de fluorescence normalisés des TP_s (pointillé) et TN_s (continu)[100 μ M] dans le dichlorométhane (en bleu : Py, en bleu ciel : Bzo, en orange : Bzt).

B.2 Mesures de durées de vie de fluorescence

B.2.1 TP-2Py

Dans l'ADN naturel Nous nous sommes intéressés aux durées de vie de fluorescence de la première génération de fluorophores dans l'ADN de hareng. A l'aide de notre système, nous avons mesuré la durée de vie de fluorescence de la TP-2Py dans l'ADN. Les composantes obtenues pour des ajustements tri-exponentiels sont rapportées dans le tableau 13 ainsi que les coefficients k_r et k_{nr} .

TABLE 13 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py (100 μ M) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.0045	1	0.34	0	0.68	0	0.80	0.34	0.013	2.93
1 equ	0.006	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.009	1.55
2 equ	0.008	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.012	1.55
3 equ	0.01	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.015	1.54
4 equ	0.017	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.026	1.53
5 equ	0.020	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.031	1.53
6 equ	0.025	0	0.34	0.48	0.64	0.52	0.8	0.034	0.11	1.33
8 equ	0.028	0	0.34	0.31	0.64	0.69	0.8	0.036	0.10	1.27
10 equ	0.03	0	0.34	1	0.64	0	0.8	0.64	0.046	1.55
13 equ	0.032	0	0.34	0	0.64	1	0.8	0.8	0.04	1.21
21 equ	0.04	0	0.34	0	0.64	1	0.8	0.8	0.05	1.20
35 equ	0.06	0	0.34	0	0.64	1	0.8	0.8	0.075	1.17
80 equ	0.08	0	0.34	0	0.64	1	0.8	0.8	0.10	1.15

En solution tampon, la durée de vie de fluorescence des TP-2Py est de 0.34ns. Ceci correspond à la durée de vie de la molécule libre. Dès la présence d'un brin d'ADN dans la solution, la durée de vie est allongée pour aller jusqu'à 0.8ns. La durée de vie courte (0.34ns) n'est plus visible puisque son rendement quantique de fluorescence est extrêmement faible au regard de celui du fluorophore en interaction avec l'ADN.

Dans le DrewAT Les résultats obtenus pour la mesure des durées de vie de fluorescence dans le DrewAT sont réunis dans le tableau 14.

TABLE 14 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py ($100 \mu\text{M}$) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à $\text{pH } 7,2$.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.0045	1	0.34	0	0.68	0	0.80	0.34	0.013	2.93
1.4 equ	0.042	0.48	0.34	0.52	0.68	0	0.80	0.56	0.075	1.71
2.8 equ	0.052	0	0.34	0.75	0.68	0.25	2.2	1.46	0.036	0.65
7 equ	0.07	0	0.34	1	0.67	0	0.80	0.67	0.10	1.39
14 equ	0.07	0	0.34	1	0.67	0	0.80	0.67	0.10	1.39
70 equ	0.07	0	0.34	1	0.67	0	0.80	0.67	0.10	1.39

B.2.2 TP-3Py

Dans l'ADN naturel A l'instar du fluorophore TP-2Py, nous avons mesuré les durées de vie de fluorescence de la TP-3Py dans l'ADN de hareng.

Les mesures de durées de vie de la TP-3Py ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles de la TP-2Py. Le tableau 15, nous donne les composantes A_1 , A_2 , τ_{f_1} et τ_{f_2} lorsque l'on fait un ajustement bi-exponentiel de la fonction de décroissance de fluorescence (voir equation 46). k_r et k_{nr} sont aussi consignés dans ce tableau.

TABLE 15 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Py ($100 \mu\text{M}$) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à $\text{pH } 7,2$.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.0005	1	0.32	0	0.8	0.32	0.002	3.12
21 equ	0.005	0.87	0.32	0.13	0.9	0.49	0.010	2.03
35 equ	0.006	0.80	0.32	0.20	0.8	0.50	0.012	1.98
50 equ	0.01	0.79	0.32	0.21	0.8	0.51	0.0196	1.94

Sans ADN dans la solution, la durée de vie de fluorescence est courte : 0.32ns . on remarque que globalement, il y a peu de variations de la durée de vie moyenne en fonction du nombre d'équivalent d'ADN. Il y a peu d'interactions avec l'ADN, ceci est lié à la taille de la molécule.

Dans le DrewAT Les résultats obtenus pour la mesures des durées de vie de fluorescence dans le DrewAT sont réunis dans le tableau 16.

TABLE 16 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Py (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A	τ_f	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.0005	1	0.32	0.32	0.002	3.13
1.4 equ	0.0058	1	0.33	0.33	0.017	3.01
2.8 equ	0.0063	1	0.37	0.37	0.017	2.68
7 equ	0.01	1	0.22	0.22	0.04	4.5
14 equ	0.01	1	0.22	0.22	0.045	4.5
70 equ	0.01	1	0.23	0.23	0.045	4.5

Dans le DrewAT, les résultats sont très intéressants puisque la décroissance de fluorescence est toujours mono-exponentielle avec une durée de vie correspondant à la durée de vie de fluorescence du fluorophore en solution. La TP-3Py ne se fixe aucunement dans le petit sillon du DrewAT. La composant longue mesurée dans l'ADN de hareng, pourrait être due à un mode de fixation non-spécifique.

B.2.3 TP-2PyO

Dans l'ADN Nous avons mesuré la durée de vie de fluorescence de la deuxième génération de molécules : les TPs-PyO. Le tableau 17 consigne les mesures obtenues pour la TP-2PyO.

TABLE 17 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-PyO (100 μ M) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00318	1	0.19	0	1.1	0.19	0.017	5.25
1 equ	0.008	0.98	0.19	0	1.1	0.19	0.042	5.22
2 equ	0.016	1	0.19	0	1.1	0.19	0.084	5.17
3 equ	0.02	1	0.19	0	1.1	0.19	0.1	5.15
4 equ	0.023	0.31	0.19	0.69	1.1	1.03	0.022	0.95
6 equ	0.028	0.48	0.19	0.52	1.1	0.97	0.028	1.00
8 equ	0.04	0.12	0.19	0.88	1.1	1.08	0.037	0.88
10 equ	0.05	0.17	0.19	0.83	1.1	1.07	0.046	0.88
13 equ	0.08	0.01	0.19	0.99	1.1	1.10	0.072	0.83
21 equ	0.10	0.02	0.19	0.98	1.1	1.09	0.091	0.82
35 equ	0.15	0	0.19	1	1.1	1.10	0.136	0.77
80 equ	0.18	0	0.19	1	1.1	1.10	0.16	0.74

En solution tampon, la TP-2PyO a une durée de vie de fluorescence de 0.19ns. De 1 à 3 équivalents d'ADN, la durée de vie de fluorescence est mono-exponentielle, le fluorophore n'interagit pas avec l'ADN. Ce n'est qu'à partir de 4 équivalents que l'on observe une deuxième composante

caractérisant une durée de vie plus longue (1.1ns). A 35 équivalents d'ADN, la composante longue est majoritaire.

Dans le drewAT Le tableau 18 rapporte les valeurs obtenues dans le drewAT.

TABLE 18 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-PyO (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00318	1	0.19	0	1.10	0	1.69	0.19	0.017	5.25
1.4 equ	0.13612	0	0.19	0.04	1.10	0.96	1.69	1.67	0.08	0.52
2.8 equ	0.18465	0	0.19	0.65	1.10	0.35	1.69	1.37	0.134	0.595
7 equ	0.22	0	0.19	0	1.10	1	1.69	1.69	0.13	0.46
14 equ	0.22	0	0.19	0.04	1.10	0.96	1.69	1.67	0.13	0.46
70 equ	0.22	0	0.19	0	1.10	1	1.69	1.69	0.13	0.46

Dans ce cas, la durée de vie mesurée à saturation est égale à 1.69ns. On notera que, dans l'ADN de hareng, la composante que l'on mesure est de 1.1ns, celle-ci est plus courte que celle mesurée dans le DrewAT. La constante de vitesse de relaxation non-radiative est plus faible dans le DrewAT que dans l'ADN, ceci signifie que la fluorophore a une interaction plus forte avec le DrewAT.

B.2.4 TP-3PyO

Dans l'ADN Les durées de vie de fluorescence de la TP-3PyO sont données par le tableau 19.

TABLE 19 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-PyO (100 μ M) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00278	1	0.25	0	1.27	0.25	0.011	3.99
10 equ	0.038	0.14	0.25	0.86	1.27	1.24	0.030	0.77
21 equ	0.056	0.04	0.25	0.96	1.27	1.26	0.044	0.75
35 equ	0.074	0.08	0.25	0.92	1.27	1.25	0.059	0.74
50 equ	0.08	0	0.25	1	1.27	1.27	0.063	0.72

A 0 équivalent d'ADN, la durée de vie de fluorescence de la TP-3PyO est de 0.25ns, ce qui correspond à la durée de vie de la molécule en solution. La TP-3PyO possède les mêmes caractéristiques que la TP-3Py. On retrouve la composante issue de la durée de vie en solution tampon à laquelle s'ajoute une composante longue (1.27ns) correspondant à une durée de vie du fluorophore vraisemblablement fixé sur l'ADN.

Dans le DrewAT Les mesures de durées de vie de la TP-3PyO dans le DrewAT sont retenues dans le tableau 20.

TABLE 20 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-PyO (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f1}	A_2	τ_{f2}	A_3	τ_{f3}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00278	1	0.25	0	0.70	0	1.27	0.25	0.011	3.99
1.4 equ	0.07241	0.3	0.25	0.7	0.70	0	1.27	0.64	0.113	1.45
2.8 equ	0.08134	0	0.25	1	0.70	0	1.27	0.70	0.116	1.31
7 equ	0.09	0	0.25	0.93	0.70	0.07	1.27	0.77	0.117	1.18
14 equ	0.09	0	0.25	1	0.70	0	1.27	0.70	0.128	1.3
70 equ	0.09	0	0.25	1	0.70	0	1.27	0.70	0.128	1.3

B.2.5 TP-2Bzim

Dans l'ADN Avec notre système, nous avons mesuré les durées de vie de fluorescence de la troisième génération de fluorophore. Le tableau 21 consigne les valeurs obtenues pour la TP-2Bzim dans l'ADN de hareng.

TABLE 21 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μ M) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f1}	A_2	τ_{f2}	A_3	τ_{f3}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00622	1	0.44	0	1.12	0	2.35	0.44	0.014	2.26
1 equ	0.06	0	0.44	0.70	1.12	0.30	2.35	1.70	0.035	0.55
2 equ	0.1	0	0.44	0.67	1.12	0.33	2.35	1.71	0.058	0.52
3 equ	0.15	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.063	0.361
4 equ	0.22	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.093	0.331
5 equ	0.25	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.106	0.319
6 equ	0.29	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.123	0.302
8 equ	0.34	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.144	0.280
10 equ	0.41	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.174	0.251
13 equ	0.55	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.234	0.191
21 equ	0.67	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.285	0.140
35 equ	0.73	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.31	0.114
80 equ	0.73	0	0.44	0.15	1.12	0.85	2.35	2.25	0.32	0.12

Dans la solution tampon, la durée de vie de fluorescence de la TP-2Bzim est de 0.44ns. Dès le premier ajout d'ADN, la composante correspondant à la durée de vie de fluorescence du fluorophore en solution disparaît pour laisser place à deux composantes correspondant à deux durées de vie (1.12ns et 2.35ns). Les résultats obtenus pour les solutions à 1 et 2 équivalents d'ADN, montrent la coexistence des deux modes de fixation du fluorophore sur l'ADN. Dès 3 équivalents d'ADN, la fonction de durée de vie est mono-exponentielle correspondant à la durée de vie longue (2.25ns).

A 80 équivalents d'ADN, la fonction de décroissance de fluorescence est décrite à nouveau par une fonction bi-exponentielle.

Si on compare la TP-2Bzim aux précédentes générations de fluorophores, la TP-2Bzim a les mêmes caractéristiques que la TP-2Py, avec la présence de deux modes de fixation différents. On remarque que la TP-2Bzim est le seul fluorophore où la composante de longue durée apparaît dès un très faible nombre d'équivalent d'ADN (3 équivalents d'ADN). Ces résultats confirment l'excellente affinité de la TP-2Bzim pour l'ADN.

Dans le DrewAT Le tableau 22 fait la synthèse des mesures de durées de vie de fluorescence de la TP-2Bzim à différents équivalents de DrewAT.

TABLE 22 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00622	1	0.44	0	1.12	0	2.35	0.44	0.014	2.26
1.4 equ	0.41922	0	0.44	0.8	1.12	0.20	2.35	1.54	0.272	0.377
2.8 equ	0.48258	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.20	0.22
7 equ	0.54	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.23	0.196
14 equ	0.54	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.23	0.196
70 equ	0.54	0	0.44	0	1.12	1	2.35	2.35	0.23	0.196

B.2.6 TP-3Bzim

Dans l'ADN Pour finir, nous avons regardé la durée de vie de fluorescence de la TP3-Bzim. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le tableau 23.

TABLE 23 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Bzim ($100 \mu\text{M}$) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00591	1	0.28	0	0.54	0	2.0	0.28	0.021	3.55
1 equ	0.009	0	0.28	0.96	0.54	0.04	2.0	0.74	0.012	1.33
2 equ	0.01	0	0.28	0.73	0.54	0.27	2.0	1.38	0.007	0.717
3 equ	0.03	0	0.28	0.45	0.54	0.55	2.0	1.73	0.017	0.560
4 equ	0.06	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.030	0.470
5 equ	0.10	0	0.28	0.1	0.54	0.9	2.0	2.0	0.050	0.450
6 equ	0.13	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.065	0.435
8 equ	0.15	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.075	0.425
10 equ	0.17	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.085	0.415
13 equ	0.25	0	0.28	0.01	0.54	0.99	2.0	2.0	0.125	0.375
21 equ	0.31	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.155	0.345
35 equ	0.38	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2.0	0.19	0.31
80 equ	0.38	0	0.28	0	0.54	0.99	2.0	2.0	0.19	0.31

A 0 équivalent d'ADN, la durée de vie de la TP-3Bzim est de 0.28ns. Des l'ajout d'ADN, on observe une durée de vie de fluorescence bi-exponentielle. La composante correspondant à la durée de vie de fluorescence en solution disparaît au profit de deux composantes, une moyenne (0.54ns) et une longue (2.0ns).

Dans le DrewAT Nous avons mesuré les durées de vie de fluorescence de la TP-3Bzim dans plusieurs concentrations de DrewAT. Les durées de vie de fluorescence sont répertoriées dans le tableau 24.

TABLE 24 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Bzim ($100 \mu\text{M}$) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	A_3	τ_{f_3}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}
0 equ	0.00591	1	0.28	0	0.54	0	2.0	0.28	0.021	3.55
1.4 equ	0.30246	0	0.28	0.15	0.54	0.85	2.0	1.93	0.157	0.351
2.8 equ	0.33230	0	0.28	0.10	0.54	0.90	2.0	1.96	0.17	0.34
7 equ	0.34	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2	0.17	0.33
14 equ	0.34	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2	0.17	0.33
70 equ	0.34	0	0.28	0	0.54	1	2.0	2	0.17	0.33

Lorsque la concentration de DrewAT est très largement supérieure à celle du fluorophore, la décroissance de fluorescence est mono-exponentielle. La durée de vie de fluorescence mesurée est

égale à 2.0ns. Si le fluorophore est en excès, il apparaît une deuxième composante dont la durée de vie est plus courte (0.54ns).

B.3 Influence de la concentration en sel

Nous avons mené des expériences complémentaires en augmentant la concentration en sel (NaCl) dans la solution afin de diminuer les interactions non-spécifiques au profit des interactions spécifiques.

B.3.1 TP-2Py dans le DrewAT

Le tableau 25 répertorie les valeurs de durées de vie de la TP-2Py dans une solution de DrewAT à différentes concentrations. La solution tampon dispose d'une concentration en NaCl de 200mM. La concentration en sel a été multipliée par deux par rapport aux mesures précédemment effectuées.

TABLE 25 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 200mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}	r	τ_r
0 equ	0.0045	1	0.20	0	0.68	0.20	0.225	4.77		
1.4 equ	0.042	0	0.20	1	0.60	0.60	0.07	1.596	0.30	11.4
2.8 equ	0.052	0	0.20	1	0.65	0.65	0.08	1.46	0.37	5.65
7 equ	0.08	0	0.20	1	0.66	0.66	0.121	1.39	0.49	320
14 equ	0.08	0	0.20	1	0.69	0.69	0.116	1.33	0.45	7
70 equ	0.08	0	0.20	1	0.68	0.68	1.118	1.35	0.42	6

Le tableau 26 répertorie les valeurs de durées de vie de la TP-2Py dans une solution de DrewAT à différentes concentration. La solution tampon dispose d'une concentration en NaCl de 400mM. La concentration de sel a été multiplié par quatre.

On remarque que les mesures conjointes d'anisotropie de fluorescence (r et τ_r) donnent lieu parfois à des mesures aberrantes (manque de signal). Les mesures effectuées sont à confirmer mais globalement on ne constate pas de variation majeure de l'anisotropie avec l'augmentation de la proportion d'ADN.

TABLE 26 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à pH 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f_1}	A_2	τ_{f_2}	$\langle \tau_f \rangle$	k_r	k_{nr}	r	τ_r
0 equ	0.045	1	0.27	0	0.68	0.20	0.225	4.77		
1.4 equ	0.042	0	0.27	1	0.61	0.61	0.069	1.57	0.20	3.68
2.8 equ	0.052	0	0.27	1	0.60	0.60	0.087	1.58	0.43	9.35
7 equ	0.08	0	0.27	1	0.63	0.63	1.127	1.46	0.35	5.34
14 equ	0.08	0	0.27	1	0.64	0.64	0.125	1.43	0.46	5.7
70 equ	0.08	0	0.27	1	0.64	0.64	0.125	1.43	0.51	11.45

Pour la TP-2Py, on remarque qu'il n'y a aucune modification des durées de vie par rapport à celles mesurées dans une solution tampon moins concentrée en sel.

B.3.2 TP-2Bzim dans le DrewAT

Le tableau 27 répertorie les valeurs de durées de vie de la TP-2Bzim dans une solution de DrewAT à différentes concentrations. La solution tampon dispose d'une concentration en NaCl de 200mM. La concentration de sel a été multipliée par deux.

TABLE 27 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 200mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f1}	A_2	τ_{f2}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}	r	τ_r
0 equ	0.00622	1	0.72	0	0.68	0.72	0.009	1.38		
1.4 equ	0.41922	0.63	0.72	0.37	2.45	1.87	0.224	0.31	0.51	14.5
2.8 equ	0.48258	0.13	0.72	0.87	2.45	2.40	0.203	0.218	0.37	4.16
7 equ	0.54	0	0.72	1	2.50	2.50	0.22	0.18	0.30	6.09
14 equ	0.54	0	0.72	1	2.47	2.47	0.22	0.19	0.36	7.81
70 equ	0.54	0	0.72	1	2.50	2.50	0.22	0.18	0.35	7.38

Le tableau 28 répertorie les valeurs de durées de vie de la TP-2Bzim dans une solution de DrewAT à différentes concentrations. La solution tampon dispose d'une concentration en NaCl de 400mM. La concentration de sel a été multipliée par deux.

TABLE 28 – Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μ M) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à ph 7,2.

	ϕ_f	A_1	τ_{f1}	A_2	τ_{f2}	$\langle\tau_f\rangle$	k_r	k_{nr}	r	τ_r
0 equ	0.00622	1	0.72	0	2.45	0.73	0.008	1.38		
1.4 equ	0.41922	0.98	0.72	0.02	2.45	0.832	0.504	0.698	0.45	5.34
2.8 equ	0.48258	0.58	0.72	0.27	2.33	1.688	0.286	0.306	0.45	25.26
7 equ	0.54	0	0.72	1	2.56	2.56	0.22	0.18	0.33	7.30
14 equ	0.54	0	0.72	1	2.49	2.49	0.22	0.18	0.36	8.45
70 equ	0.54	0	0.72	1	2.46	2.46	0.22	0.19	0.35	6.16

Comme pour la TP-2Py, la TP-2Bzim ne présente aucune modification des durées de vie par rapport à celles mesurées dans une solution tampon moins concentrée en sel. Ce qui confirme qu'il n'y a pas de marquage non-spécifique.

B.4 Anisotropie de fluorescence

B.4.1 Hoechst 33258

Le tableau 29 répertorie les valeurs mesurées, pour le Hoechst 33258 à différentes concentrations dans le DrewAT, du coefficient de diffusion rotationnel et de l'anisotropie statique.

TABLE 29 – *Variation du coefficient de diffusion rotationnel et de la durée de vie de fluorescence du Hoechst 33258 (100 μ M) en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à ph 7,2.*

	r_{statique}	τ_r	D_r	τ_f
0 equ	0.41	1.65	0.1	0.83
1.4 equ	0.5	7.6	0.021	2.83
2.8 equ	0.35	6.91	0.024	2.65
7 equ	0.39	7.33	0.022	2.82
14 equ	0.41	6.55	0.025	2.82
70 equ	0.29	4.25	0.039	2.77

Références

- [1] M.J. Hannon. Supramolecular dna recognition. *Chem. Soc. Rev.*, 2007.
- [2] A.M. MacMillan. Fifty years of "watson-crick". *Pure Appl. Chem.*, 2004.
- [3] A.M. MacMillan. Chemistry of nucleic acids part 3 - preface. *Pure Appl. Chem.*, 2004.
- [4] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxy-ribose nuclaic acid. *Nature*, 1953.
- [5] *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, 1984.
- [6] R.E. Dickerson, H.R. Drew, B.N. Conner, R.M. Wing, A.V. Fratini, and M.L. Kopka. The anatomy of a-dna, b-dna, and z-dna. *Science*, 1982.
- [7] H.R. Drew, S. Samson, and R.E. Dickerson. Structure of a b-dna dodecamer at 16°k. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982.
- [8] R.E. Dickerson and H.R. Drew. Kinematic model for b-dna. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981.
- [9] S. Neidle. Dna minor-groove recognition by small molecules. *Nat. Prod. Rep.*, 2001.
- [10] P. Belmont, J-F. Constant, and M. Demeunynck. Nucleic acid conformation diversity : from structure to function and regulation. *Chem. Soc. Rev.*, 2001.
- [11] P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, and S. Neidle. Loop-lenght-dependent folding of g-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004.
- [12] N.J. Wheate, C.R. Brodie, J.G. Collins, S. Kemps, and J.R. Aldrich-Wright. Dna intercalators in cancer therapy : Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Med. Chem.*, 2007.
- [13] D Onidas, D Markovitsi, S Marguet, A Sharonov, and T Gustavsson. Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides : A refined steady-state and femtosecond investigation. *Journal Of Physical Chemistry B*, 106(43) :11367–11374, Oct 31 2002.
- [14] W Denk, JH Strickler, and WW Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, Apri 6 1990.
- [15] C. Allain. *Sondes fluorescentes pour l'ADN : Marquage covalent et non-covalents*. PhD thesis, Université paris VI, 2006.
- [16] C. Allain, F. Schmidt, R. Lartia, G. Bordeau, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, P. Tauc, and M. P. Teulade-Fichoua. Vinyl-pyridinium triphenylamines : Novel far-red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for staining DNA. *Chembiochem*, 2007.
- [17] A. Jablonski. Uber den mechanisms des photolumineszenz von farbstoffphosphores. *Z phys*, 1935.
- [18] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday society*, (9) :14–19, 1950.
- [19] J Enderlein and R Erdmann. Fast fitting of multi-exponential decay curves. *Optics Commu-nications*, 134(1-6) :371–378, Jan 15 1997.
- [20] Eaton D. F. Recommended methods for fluorescence decay analysis. *Pure and Appl. Chem.*, 1990.
- [21] V.V. Apanasovich and E.G. Novikov. Methods of analysis of fluorescence decay curves in pulsed fluorometry (review). *Journal of Applied Spectroscopy*, 56(4) :317–27, April 1992.

- [22] TN Solie, EW Small, and I Isenberg. Analysis of non-exponential fluorescence decay data by a method of moments. *Biophysical Journal*, 29(3) :367–378, 1980.
- [23] *Principles of fluorescence spectroscopy*. springer, 2002.
- [24] M Goepfert-Mayer. Elementary processes with two quantum transitions. *Annalen Der Physik*, 18(7-8) :466–479, Aug 2009.
- [25] M. Oheim. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug delivery review*, 2006.
- [26] O. Nakamura. Fundamental of two-photon microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 1999.
- [27] *Molecules and radiation*. Cambridge, 1989.
- [28] C. Xu and W. W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 1996.
- [29] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied Optics*, 1998.
- [30] A. Hopt and E. Neher. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 2001.
- [31] P Metezeau, G Tachdjian, H Kiefer, V Cacheux, and M Bensaada. Analysis of laser effects on chromosomal structure by fluorescence in situ hybridization and image cytometry : Methodological approach for precise microdissection. *Lasers in Medical Science*, 10(4) :261–266, DEC 1995.
- [32] *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. De Boeck, 2004.
- [33] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Physik*, 1948.
- [34] S. Hell and M. kroug. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B*, 1997.
- [35] D. Axelrod, T. P. Burghardt, and N. L. Thompson. Total internal reflection fluorescence. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1984.
- [36] *Fluorescence Microscopy., 2nd edition.,* 1998.
- [37] *Confocal Laser Scanning Microscopy*. Oxford, 1997.
- [38] *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy, The Genesis of Live cell Imaging*. 2005.
- [39] *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York, 1995.
- [40] K. Konig. Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy-Oxford*, 2000.
- [41] Z. Huang and C. Yanez.
- [42] M. Gu and C.J.R Sheppard. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy. *J. Microsc.*, 1995.
- [43] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 2003.
- [44] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems .2. structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London series A-Mathematical and Physical Sciences*.

- [45] R. M. Williams, D. W. Piston, and W. W. Webb. 2-Photon Molecular-Excitation Provides Intrinsic 3-Dimensional Resolution for Laser-Based Microscopy and Microphotochemistry. *Faseb Journal*, 1994.
- [46] S. Hell and E.H.K Stelzer. Fundamental improvement resolution with 4-pi-confocal fluorescence microscope using two photon excitation. *Opt. Commun*, 1992.
- [47] Agard David A. Gustafsson, Mats.G.L and and John W. Sedat. Sevenfold improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Proc. SPIE*, 1995.
- [48] *Time Correlated Single Photon Counting*. Academic Press, 1984.
- [49] M. Wahl, R. Erdmann, K. Lauritsen, and H.J. Rahn. Hardware solution for continuous times resolved burst detection of single molecules in flow. *Proc. SPIE*, 1998.
- [50] D Magde, R Wong, and PG Seybold. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents : Improved absolute standards for quantum yields. *Photochemistry and Photobiology*, 75(4) :327–334, APR 2002.
- [51] N. Boens, W. W. Qin, N. Basaric, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J. P. Lefevre, B. Valeur, E. Gratton, M. Vandeven, N. D. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, G. Rumbles, D. Phillips, Ajwg Visser, A. van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai, and A. Miura. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2007.
- [52] Espacesciences. <http://www.espacesciences.com>.
- [53] M. Albota, D. Beljonne, J. L. Bredas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Rockel, M. Rumi, C. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu, and C. Xu. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, 1998.
- [54] M Albota, Beljonne D., J.L. Bredas, J.E. Ehrlich, J.Y. Fu, A.A. Heikal, S.E. Hess, T. Kogej, M.D. Levin, S.R. Marder, D. McCord-Maughon, J.W. Perry, H. Rockel, M. Rumi, C. Subramaniam, W.W. Webb, X.L. Wu, and C. Xu. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, 1998.
- [55] S.J. Chung, M. Rumi, V. Alain, S. Barlow, J.W. Perry, and S.R. Marder. Strong, low-energy two-photon absorption in extended amine-terminated cyano-substituted phenylenevinylene oligomers. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005.
- [56] W.H. Lee, M.H. Cho, S.J. Jeon, and B.R. Cho. Two-photon absorption and second hyperpolarizability of the linear quadrupolar molecule. *J. Phy. Chem. A*, 2000.
- [57] L. Ventelon, L. Moreaux, J. Mertz, and M. Blanchard-Desce. New quadrupolar fluorophores with high two-photon excited fluorescence. *Chem. Comm.*, 1999.
- [58] M. Blanchard-Desce. Molecular engineering of nlo-phores for new nlo microscopies. *C. R. Physique*, 2002.
- [59] O. Mongin, L. Porres, L. Moreaux, J. Mertz, and M. Blanchard-Desce. Synthesis and photophysical properties of new conjugated fluorophores designed for two-photon-excited fluorescence. *Org. Lett.*, 2002.
- [60] O. Mongin, L. Porres, M. Charlot, C. Katan, and M. Blanchard-Desce. Synthesis, fluorescence, and two-photon absorption of a series of elongated rodlike and banana-shaped quadrupolar fluorophores : A comprehensive study of structure-property relationships. *Chem. Eur. J.*, 2007.

- [61] S.K. Lee, W.J. Yang, J.J. Choi, C.H. Kim, S.J. Jeon, and B.R. Cho. 2,6-bis[4-(p-dihexylaminostyryl)styryl]anthracene derivatives with large two-photon cross sections. *Org. Lett.*, 2005.
- [62] S. Ohira, I. Rudra, K. Schmidt, S. Barlow, S.-J. Chung, Q. Zhang, J. Matichak, S.R. Marder, and J.-L. Bredas. Electronic and vibronic contributions to two-photon absorption in donor-acceptor-donor squaraine chromophores. *Chem. Eur. J.*, 2008.
- [63] S.A. Odom, S. Webster, L.A. Padilha, D. Peceli, H. Hu, G. Nootz, S.-J. Chung, S. Ohira, J.D. Matichak, O.V. Przhonska, A.D. Kachkovski, S. Barlow, J.-L. Bredas, H.L. Anderson, D.J. Hagan, E.W. Van Stryland, and S.R. Marder. Synthesis and two-photon spectrum of a bis(porphyrin)-substituted squaraine. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009.
- [64] K.D. Belfield, M.V. Bondar, F.E. Hernandez, and O.V. Przhonska. Photophysical characterization, two-photon absorption and optical power limiting of two fluorenylperylene diimides. *J. Phys. Chem. C*, 2008.
- [65] Z. Liu, T. Chen, B. Liu, T. Huang, S. Li, Y. Xu, and J. Qin. Two-photon absorption of a series of v-shape molecules : the influence of acceptor's strength on two-photon absorption in a noncentrosymmetric d- π -a- π -d system. *Mater. Chem.*, 2007.
- [66] H.M. Kim, Y.O. Lee, C.S. Lim, J.S. Kim, and B.R. Cho. Two-photon absorption properties of alkynyl-conjugated pyrene derivatives. *J. Org. Chem.*, 2008.
- [67] J. Zyss and I. Ledoux. Nonlinear optics in multipolar media : theory and experiments. *Chem. Rev.*, 1994.
- [68] W.H. Lee, H. Lee, J.A. Kim, J.H. Choi, M.H. Cho, S.J. Jeon, and B.R. Cho. Two-photon absorption and nonlinear optical properties of octupolar molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001.
- [69] S.J. Chung, K.S. Kim, T.H. Lin, G.S. He, J. Swiatkiewicz, and P.N. Prasad. Cooperative enhancement of two-photon absorption in multi-branched structures. *J. Phys. Chem. B*, 1999.
- [70] D. Beljonne, W. Wenseleers, E. Zojer, Z.G. Shuai, H. Vogel, S.J.K. Pond, J.W. Perry, S.R. Marder, and J.L. Bredas. Role of dimensionality on the two-photon absorption response of conjugated molecules : The case of octupolar compounds. *Advanced Functional Materials*, 2002.
- [71] C. Katan, F. Terenziani, O. Mongin, M.H.V. Werts, L. Porres, T. Pons, J. Mertz, S. Tretiak, and M. Blanchard-Desce. Effects of (multi)branching of dipolar chromophores on photophysical properties and two-photon absorption. *J. Phys. Chem. A*, 2005.
- [72] R. Kannan, G.S. He, T.C. Lin, P.N. Prasad, R.A. Vaia, and L.S. Tan. Toward highly active two-photon absorbing liquids. synthesis and characterization of 1,3,5-triazine-based octupolar molecules. *Chem. Mater.*, 2004.
- [73] Xin Jiang Feng, Po Lam Wu, Frederic Bolze, Heidi W. C. Leung, King Fai Li, Nai Ki Mak, Daniel W. J. Kwong, Jean-Francois Nicoud, Kok Wai Cheah, and Man Shing Wong. Cyanines as New Fluorescent Probes for DNA Detection and Two-Photon Excited Bioimaging. *Organic Letters*, 12(10) :2194–2197, May 21 2010.
- [74] J.T. Dy, K. Ogawa, A. Satake, A. Ishizumi, and Y. Kobuke. Water-soluble self-assembled butadiyne-bridged bisporphyrin : A potential two-photon-absorbing photosensitizer for photodynamic therapy. *Chem. Eur. J.*, 2007.
- [75] Y. Nakamura, S.Y. Yang, T. Tanaka, N. Aratani, J.M. Lim, K.S. Kim, D. Kim, and A. Osuka. Borametallophenes of group 4 metals : Synthesis and structure. *Chem. Eur. J.*, 2008.

- [76] J. Arnbjerg, A. Jiménez-Banzo, M.J. Paterson, S. Nonell, J.I. Borell, O. Christiansen, and P.R. Ogilby. Two-photon absorption in tetraphenylporphycenes : Are porphycenes better candidates than porphyrins for providing optimal optical properties for two-photon photodynamic therapy? *J. Am. Chem. Soc.*, 2007.
- [77] J-W. Seo, S.Y. Jang, D. Kim, and H-J. Kim. Octupolar trisporphyrin conjugates exhibiting strong two-photon absorption. *Tetrahedron*, 2008.
- [78] M. Williamns-Harry, A. Bhaskar, G. Ramakrishna, T. Goodson III, M. Imamura, A. Mawatari, K. Nakao, H. Enozawa, T. Nishinaga, and M. Iyoda. Giant thienylene-acetylene-ethylene macrocycles with large two-photon absorption cross section and semishape-persistence. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008.
- [79] G.P. Bartholomew, M. Rumi, S.J.K. Pond, J.W. Perry, S. Tretiak, and G.C. Bazan. Two-photon absorption in three-dimensional chromophores based on [2.2]-paracyclophane. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004.
- [80] G.P. Bartholomew, I. Ledoux, S. Mukamel, G.C. Bazan, and J. Zyss. Three-dimensional nonlinear optical chromophores based on through-space delocalization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002.
- [81] Michael R. Harpham, Oezguen Suezer, Chang-Qi Ma, Peter Baeuerle, and Theodore Goodson, III. Thiophene dendrimers as entangled photon sensor materials. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3) :973–979, Jan 28 2009.
- [82] A. D'Aleo, G. Pompidor, B Elena, J. Vicat, P.L. Baldeck, L. Toupet, R. Kahn, C. ANDraud, and O. Maury. Two-photon microscopy and spectroscopy of lanthanide bioprobes. *Chem. Phys. Chem.*, 2007.
- [83] A. Picot, O. Maury, F. Malvolti, B. Le Guennic, P.L. Baldeck, J.A.G. Williams, and C. Andraud. Two-photon antenna effect induced in octupolar europium complexes. *Inorg. Chem.*, 2007.
- [84] A. Abbotto, L. Beverina, S. Bradamante, A. Facchetti, and G.A. Pagani. Design and synthesis of heterocyclic multi-branched dye for two-photon absorption. *Synthetic, Metals*, 2003.
- [85] G. Bordeau, R. Lartia, G. Metgé, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, and M-P Teulade-Fichou. Trinaphthylamines : robust organic materials for two-photon induced fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008.
- [86] G. Bordeau. *Nouvelles triarylamines pour la microscopie biphotonique : application au marquage des acides nucléiques*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2009.
- [87] A Hayek, F Bolze, JF Nicoud, PL Baldeck, and Y Mely. Synthesis and characterization of water-soluble two-photon excited blue fluorescent chromophores for bioimaging. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 5(1) :102–106, 2006.
- [88] Thatavarathy R. Krishna, Manuel Parent, Martinus H. V. Werts, Laurent Moreaux, Said Gmouh, Serge Charpak, Amie-Marie Caminade, Jean-Pierre Majoral, and Mireille Blanchard-Desce. Water-soluble dendrimeric two-photon tracers for in vivo imaging. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(28) :4645–4648, 2006.
- [89] D.R. Boer, A. Canals, and M. Coll. Dna-binding drugs caught in action : the latest 3d pictures of drug-dna complexes. *Dalton Trans*, 2009.
- [90] L.S. Ierman. Structure of dna-acridine complex. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1963.
- [91] P. Herzyk, S. Neidle, and J.M. Goodfellow. Conformation and dynamics of drug-dna intercalation. *J. Biomol. Struct. Dyn. A*, 1992.

- [92] *Nucleic acids in chemistry and biology*. IRL Oxford, 1996.
- [93] C. Bailly and J.B. Chaires. Sequence-specific dna minor groove binders : Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. *Bioconjugate Chem.*, 1998.
- [94] Y. Pommier, G. Kohlhagen, C. Bailly, M. Waring, A. Mazumber, and K.W. Kohn. Dna sequence and structure-selective alkylation of guanine n2 in the dna minor groove by ecteinascidin 743, a potent entitumor compound from the caribbean tunicate ecteinascidin turbinata. *Biochemistry*, 1996.
- [95] D. Tevis, A. Kumar, C. Stephens, D. Boykin, and W. Wilson. Large sequence-dependent effects on dna conformation by minor groove binding compounds. *Nucleic Acids Research*, 2009.
- [96] F. Wolter, K. Schneider, B. Davies, E. Socher, G. Nicholson, O. Seitz, and R. Sussmuth. Total synthesis of proximicin a-c and synthesis of new furan-based dna binding agents. *Organic Letters*, 2009.
- [97] *Scanning Tunneling Microscopy II*. Springer, 1992.
- [98] *Scanning probe microscopy and spectroscopy*. Cambridge University Press, 1994.
- [99] TP Beebe, TE Wilson, DF Ogletree, JE Katz, R Balhorn, MB Salmeron, and WJ Siekhaus. Direct observation of native DNA structures with the scanning tunneling microscope. *Science*, 243(4889) :370–372, Jan 20 1989.
- [100] G Lee, PG Arscott, VA Bloomfield, and DF Evans. Scanning tunneling microscopy of nucleic-acids. *Science*, 244(4903) :475–477, APR 28 1989.
- [101] PG Arscott, G Lee, VA Blommfield, and DF Evans. Scanning tunnelling microscopy of z-DNA. *Nature*, 339(6224) :484–486, JUN 8 1989.
- [102] CR Clemmer and TP Beebe. Graphite - a mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscope studies. *Science*, 251(4994) :640–642, FEB 8 1991.
- [103] WM Heckl and G Binnig. Domain-walls on graphite mimic DNA. *Ultramicroscopy*, 42(Part B) :1073–1078, JUL 1992.
- [104] H. Tanaka and T. Kawai. Scanning tunneling microscopy imaging and manipulation of dna oligomer adsorbed on cu(111) surfaces by a pulse injection method. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 1997.
- [105] G. Binnig and H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Physica Acta*, 55(6) :726–735, 1982.
- [106] J. Tersoff and DR. Hamann. Theory and Application for the Scanning Tunneling Microscope. *Physical Review Letters*, 50(25) :1998–2001, 1983.
- [107] J. Bardeen. Tunnelling from a Many-Particle Point of View. *Physical Review Letters*, 6(2) :57–&, 1961.
- [108] J. Tersoff and DR. Hamann. Theory of the Scanning Tunneling Microscope. *Physical Review B*, 31(2) :805–813, 1985.
- [109] A. Dazzi and D. Nutarelli. Travaux pratique d’initiation à la microscopie à effet tunnel (stm). Technical report, Université Paris Sud XI, 2004-2005.
- [110] G. Schull. *Dynamique d’auto-assemblages moléculaire bidimensionnels*. PhD thesis, ENS Cachan, 2006.
- [111] C. E. D. Chidsey, D. N. Loiacono, T. Sleator, and Nakahara. Stm study of the surface morphology of gold on mica. *S. Surf. Sci.*, 1988.

- [112] I.G. Higginbotham, R.H. Williams, and A.J. McEvoy. Metal/non-metal interfaces : Adhesion of gold on mica. *J. Phy. D : Appl. Phy.*, 1975.
- [113] T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, and Asakawa H. Atomic-scale distribution of water molecules at the mica-water interface visualized by three-dimensional scanning force microscopy. *Physical Review Letters*, 2010.
- [114] M. Levlin, A. Laakso, H.E. Niemi, and P. Hautajarvi. Evaporation of gold thin films on mica : effect of evaporation parameters. *Applied Surface Science*, 1997.
- [115] D.W. Pashley. Nucleation growth structure and epitaxy of thin surface films. *Adv. Phy.*, 1965.
- [116] *Applied Clay Mineralogy*. New York, 1962.
- [117] H. Poppa and E.H. Lee. Quantitative measurements of nucleation and growth kinetics of gold on mica. *Thin Solid Films*, 1976.
- [118] M. H. Disner, M.M. Ivey, S. Gorer, and J. C. Hemminger. Preparation of gold thin films by epitaxial growth on mica and the effect of flame annealing. *J. Vac. Sci. Technol. A*, 1998.
- [119] F. Yin, R. E. Palmer, and Q. Guo. Faceting of nanoscale fingers on the (111) surface of gold. *Surface Science*, 2006.
- [120] N. Toto, R. Ferrando, Q. M. Guo, and R. L. Johnston. Nanofinger growth on au(111) arising from kinetic instability. *Physical Review B*, 2007.
- [121] S. Guo and A. Kandel. Scanning tunneling microscopy studies of pulse deposition of dinuclear organometallic molecules on au(111). *J. Chem. Phys.*, 2008.
- [122] Y Shirai, AJ Osgood, YM Zhao, KF Kelly, and JM Tour. Directional control in thermally driven single-molecule nanocars. *Nano Letters*, 5(11) :2330–2334, NOV 2005.
- [123] Y Shirai, AJ Osgood, YM Zhao, YX Yao, L Saudan, HB Yang, YH Chiu, LB Alemany, T Sasaki, JF Morin, JM Guerrero, KF Kelly, and JM Tour. Surface-rolling molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(14) :4854–4864, APR 12 2006.
- [124] Y Terada, BK Choi, S Heike, M Fujimori, and T Hashizume. Injection of molecules onto hydrogen-terminated Si(100) surfaces via a pulse valve. *J. of Appl. Phys.*, 93(12) :10014–10017, JUN 15 2003.
- [125] Y Terada, BK Choi, S Heike, M Fujimori, and T Hashizume. Placing conducting polymers onto a H-terminated Si(100) surface via a pulse valve. *Nano Letters*, 3(4) :527–531, APR 2003.
- [126] L. Grill, Stass I., K-H. Rieder, and F. Moresco. Preparation of self-ordered molecular layers by pulse injection. *Surface Science*, 2006.
- [127] Hiroyuki Tanaka and Tomoji Kawai. Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunnelling microscope. *Nature Nanotechnology*, 4(8) :518–522, AUG 2009.
- [128] Martin Kind and Christof Wöll. Organic surfaces exposed by self-assembled organothioliol monolayers : Preparation, characterization, and application. *Progress in Surface Science*, 84(7-8) :230 – 278, 2009.
- [129] E Shapir, JY Yi, H Cohen, AB Kotlyar, G Cuniberti, and D Porath. The puzzle of contrast inversion in DNA STM imaging. *J. of Phys. Chem. B*, 109(30) :14270–14274, AUG 4 2005.
- [130] Errez Shapir, Lior Sagiv, Natalia Borovok, Tatiana Molotski, Alexander B. Kotlyar, and Danny Porath. High-resolution STM imaging of novel single G4-DNA molecules. *J. of Phys. Chem. B*, 112(31) :9267–9269, AUG 7 2008.

- [131] H. Sellers, A. Ulman, Y. Shnidman, and JE. Eilers. Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces -implications for self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 115(21) :9389–9401, OCT 20 1993.
- [132] JC Love, LA Estroff, JK Kriebel, RG Nuzzo, and GM Whitesides. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105(4) :1103–1169, APR 2005.
- [133] Piot L. *Croissance et structure d’auto-assemblages supramoléculaires de molécules conjuguées sur surfaces atomiquement planes*. PhD thesis, Université Paris VI, 2006.

Table des figures

1	L'ADN : la molécule du vivant.	13
2	Bases présentes dans l'ADN et structure d'un nucléotide.	14
3	Structure en double hélice de l'ADN et formules chimiques des bases de l'ADN. . .	14
4	Polymorphisme des doubles hélices d'ADN [10] et la position du petit et du grand sillon.	15
5	Nombre de publications référencées par année par le moteur de recherche "Web of Science", ayant pour citation l'article de Denk <i>&al.</i> [14].	16
6	Molécules TP-2Py et TP-3Py mises au point lors de la thèse de Clémence Allain. .	17
7	Diagramme de Perrin-Jablonski. État fondamental singulet S_0 , États excités singulet S_1 et S_2 , l'État excité triplet T_1 , cis : conversion inter-système, ci : conversion interne.	20
8	Spectres d'excitation et d'émission de la Fluorescéine dans l'eau à pH 11, $\Delta\lambda$ est la déplacement de Stokes.	21
9	Schéma simplifié du diagramme de Perrin-Jablonski représentant les niveaux excités S_1 et fondamental S_0 d'un fluorophore, ainsi que les transitions entre ces niveaux. .	22
10	Principe de la fluorescence impulsionnelle.	24
11	Diagramme montrant les processus d'absorption pour une molécule représentés par un système à trois niveaux, (a) absorption monophotonique, (b) absorption biphotonique.	26
12	Montage utilisé pour les mesures de section efficace d'absorption à deux photons. Les solutions de fluorescéine et celles étudiées sont disposées dans des cuves en quartz poli (1cm de long et 2mm de large). La source laser est un laser Ti :saphir ($P_{moyenne} = 1.3 W$, $f=80Mhz$ et $f_{\tau}=100fs$), accordable de 730 à 930nm.	28
13	A : Spectres de transmission des filtres utilisés pour couper toute contribution pouvant provenir de la diffusion du faisceau incident (passe-bas CVI800, en violet ; le filtre BG-40, en noir). B : Spectre global du CVI800 et des deux BG40 (en violet). La gamme de longueur d'onde produite par le laser est hachurée. Spectres de transmission de la molécule TP-2Py sans filtres dans une solution d'ADN [40 équivalents] (en rouge, trait continu) et avec filtres dans une solution d'ADN [40 équivalents] (en rouge, en trait pointillés).	29
14	représentation schématique des différents facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence [32].	31
15	Principe du microscope en épifluorescence.	36
16	Tâche de diffraction de deux points rapprochés, les deux points sont discernables si $\Delta_x > d_{xy}$	37
17	Principe de la microscopie confocale.	38
18	Absorption des différents éléments du vivant [40].	39

19	Comparaison de la localisation de la fluorescence en excitation à un photon (en bas) et à deux photons (en haut) [41].	40
20	(A) Vues axiale et longitudinale de la fonction d'étalement du point d'illumination [43] (IPSF) et IPSF ² . (B) Profil longitudinal en (0, 0,z) de la IPSF (courbe en pointillées rouges) et de la IPSF ² (courbe en trait continu) et en noir l'ajustement par une gaussienne.	41
21	Représentation simplifiée du montage de microscopie de fluorescence à deux photons. Le banc est séparé en trois grandes parties qui seront détaillées dans la suite : Partie excitation, Partie émission, Partie couplage via le statif de microscope.	43
22	Photographie du montage en amont du statif de microscope, En rouge le trajet du faisceau laser. 1-9, lames $\lambda/2$; 2-10-12, polariseurs; 3, filtre rouge permettant d'éliminer la fluorescence parasite du barreau de Ti-Saph; 4-5-6, miroirs diélectriques; 11, afocal permettant de remplir la pupille d'entrée de l'objectif du microscope. (1) et (2) servent à la modulation de la puissance du laser, de même que (9) et (10) (avec un pilotage externe); (12) est une lame $\lambda/2$ qui permet d'ajuster la polarisation incidente du faisceau.	44
23	Microscope inversé Olympus IX-71 équipé d'une camera 35mm sur le port gauche, d'une lampe blanche Hg-100W (située au-dessus) d'une platine de déplacement nanométrique MADCITY et une binoculaire. En rouge, le trajet du faisceau laser qui est renvoyé vers l'objectif de microscope à l'aide du filtre dichroïque Semrock FF670 et en vert, le trajet du faisceau de fluorescence, émis par l'échantillon, qui est renvoyé (filtre dichroïque Semrock FF735) vers les détecteurs.	46
24	A : spectre de transmission du Semrock FF735 (possédant une densité optique de 6.5 entre 320 et 1120nm) et du Semrock FF670 (avec une densité optique de 6.5 entre 320 et 1120nm). B : Cube à filtres utilisés respectivement pour l'envoi du signal vers le détecteur (FF735) ou l'envoi du faisceau laser excitateur sur l'échantillon (FF670).	47
25	Fonction d'excitation $I(x,y)$ mesurée un objectif X100 pour une excitation biphotonique ($\lambda_{exc} = 780\text{nm}$).	48
26	Spectre de transmission des filtres passe-bande 808E et 785E de Semrock (avec une DO de 6.5 entre 750 et 850nm).	49
27	Photographie du montage réalisé pour la détection du signal via la sortie arrière du statif de microscope.	50
28	Structure et photographie d'un détecteur de type MCP-PMTs [Hamamatsu].	51
29	Principe de fonctionnement d'un tube de microcanaux [Hamamatsu].	51
30	Illustration schématique du principe du comptage de photons corrélés en temps [49].	53
31	Composition du système de mesure de photons corrélés en temps. TAC : Times-Amplitude Converter, CFD : Constant Fraction Discriminator	54
32	Interface du logiciel développé par Fabrice Charra. Différents onglets permettent de piloter la polarisation et la puissance incidente.	55
33	Fonction de réponse de l'appareil.	56

34	Structure chimique de la Rhodamine 6G et des formes cationiques de la Fluorescéine et de la Rhodamine B.	57
35	Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine dans l'eau (pH 11), $C = 4.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.	57
36	Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine 6G dans l'éthanol, $C = 3.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.	58
37	Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine B, $C = 3.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, dans l'eau (pH 11). Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.	58
38	Spectres d'absorption et d'émission d'une solution d'eau (pH11) contenant la même quantité de Fluorescéine [$2.25 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] et de Rhodamine B [$2.03 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$]. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.	59
39	Spectre d'absorption et d'émission d'une solution d'eau (pH11) contenant 83% Fluorescéine [$49.1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$] et 17% Rhodamine B [$7.42 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$]. Les mesures d'intensité de fluorescence corrélées en temps sont représentées sur la partie droite.	60
40	Rapport des coefficients A_1/A_2 en fonction du rapport des concentrations C_1/C_2	61
41	Spectre d'absorption de la Rhodamine B (en vert) dans l'eau (pH 11) et le spectre d'émission de la Fluorescéine (en bleu) dans l'eau (pH 11).	61
42	Photoselection [52].	63
43	Système de coordonnées caractérisant l'orientation du moment de transition d'émission $\vec{\mu}_{0 \rightarrow i}$	64
44	Distribution de l'orientation de la population de l'état excité par un, deux et trois photons [23].	65
45	Modification de la dynamique d'anisotropie de fluorescence en fonction du mouvement de la molécule [52].	66
46	(A) Anisotropie en L; (B) Anisotropie en T.	66
47	Schéma simplifié de la mesure de l'anisotropie de fluorescence (en rouge faisceau laser incident et en vert le faisceau de fluorescence.	67
48	Variation du coefficient de diffusion rotationnel (D_r , \star) et de la durée de vie de fluorescence (τ_f , Δ) du Hoechst 33258 en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT.	68
49	Composés utilisés par Marder & al. [54].	71
50	Sélection d'exemples de composés à symétrie quadrupolaire présentant de fortes sections efficaces à 2 photons [57, 59, 61, 63–65]. Résultats tous obtenus avec une excitation femtoseconde.	72
51	Géométrie de symétrie C_3 de type octupolaire.	73
52	Composés servant de support à l'étude menée par Trétiak et Blanchard-Desce [71].	74

53	Exemples de composés octupolaires à quatre branches [66, 80].	74
54	Structure de quelques marqueurs commerciaux fluorescents d'ADN.	76
55	Composés triphenylamines étudiés lors de la thèse de Clémence Allain [15].	76
56	Mesures des sections efficaces dans le dichloromethane des mono-, bis-, trisphenylamine.	77
57	Composés trinaphtylamines dont on a varié le groupement accepteur [85].	78
58	Molécules TP-2Py et TP-3Py chargées.	79
59	Exaltation de fluorescence de la TP-2Py en présence d'ADN (à gauche). A droite, Titration des TP-Py à une concentration de $1\mu M$ dans un tampon de cacodylate de sodium pH 7.2 10mM, 100mM NaCl par de l'ADN de testicule de hareng (l'exaltation de fluorescence relative correspond au rapport entre l'intensité de fluorescence du complexe marqueur/ADN à saturation et l'intensité de fluorescence du marqueur à l'état libre dans la solution tampon) [?].	79
60	Images de microscopie à deux photons sur des cellules fixées de fibroblastes pulmonaires d'embryons humains MRC-5 fixées par les TP-2Py ($2\mu M$, $\lambda_{exc} = 820nm$, $\lambda_{em} = 520 - 750nm$), couleurs définies selon la longueur d'onde d'émission.	80
61	Images de microscopie confocale ($\lambda_{ex} = 488nm$ et $\lambda_{em} \sim 520 - 750nm$, $2\mu M$).	80
62	(A) : Exaltation de fluorescence (F/F_0) des TP-Py à saturation en présence de différentes séquences d'ADN (B) : Exaltation de fluorescence (F/F_0) des TP-Py à saturation en présence d'ADN et d'ARN de veau par rapport à leurs fluorescence libre, tampon de cacodylate de sodium pH 7.2 10mM, 100mM NaCl.	81
63	Modélisation de l'insertion des TP-Py dans l'ADN [16].	82
64	Modes d'interactions des ligands d'ADN et structures de conjugués ligand-ADN : A, Intercalant (ellipticine); B, Ligand de petits sillons (Dystamicine 2) [89].	82
65	Optimisation des structures et leurs rendements quantiques de fluorescence, leurs longueurs d'onde d'émission dans l'ADN.	84
66	Image de gauche obtenue par microscopie à deux photons sur des cellules MRC-5 fixées ($2\mu M$ en fluorophore, $\lambda_{ex} = 780nm$, $\lambda_{em} \sim 520 - 750nm$), image codée en fausses couleurs. Cellule metaphasiques obtenue par microscopie confocale (30mW Ar/Ne Laser (458nm, 477nm, 488nm, 514nm, 543nm), 5mW 543nm laser, 5mW 633nm laser) et sous lampe blanche (50W Hg).	86
67	Photostabilité sous microscope confocal, TO-PRO3 ($2\mu M$, $\lambda_{exc} = 633nm$, $\lambda_{em} = 650 - 750nm$), Puissance incidente $2\mu M$ ($\lambda_{exc} = 561nm$, $\lambda_{em} = 580 - 750nm$), TPs ($2\mu M$, $\lambda_{exc} = 488nm$, $\lambda_{em} = 520 - 750nm$).	87
68	Titration des analogues de TP-Py [$1\mu M$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim) par l'oligonucléotide ds26 (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2) [86]. Le ds26 est un double brin de 26 paires de bases aléatoires, dont les propriétés sont comparables à celle de l'ADN naturel. Il s'agit de mesure de fluorescence suite a une excitation monophotonique.	90

69	Variation des durées de vie de fluorescence des composés en fonction du nombre d'équivalents d'ADN de hareng (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim)	92
70	Titration des analogues de TP-Py [$1\mu\text{M}$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en vert : la TP-2Bzim et en noir la TP-3Bzim) dans le DrewAT (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2).	94
71	Variation des durées de vie de fluorescence des composés à deux branches (en rouge : TP-2Py, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim) en fonction du nombre d'équivalents d'ADN de hareng ou de DrewAT. En pointillés, les durées de vie dans le DrewAT ; en traits continus, les durées de vie dans l'ADN de hareng.	96
72	Mesure des facteurs d'exaltation de fluorescence des composés à deux branches (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en vert : la TP-2Bzim) en excitation biphotonique (Δ) et en excitation mono-photonique (\star).	98
73	Variation du rapport sections efficace d'absorption à deux photons ($\frac{\sigma_n}{\sigma_0}$) des composés à deux branches [$1\mu\text{M}$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO et en vert : la TP-2Bzim) en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT.	99
74	Modèle de la pointe selon Tersoff et Hamann.	104
75	Principe de fonctionnement du STM.	105
76	Images MEB des pointes obtenues par sectionnement d'un fil de Platine-Iridium [109].	106
77	Dispositif expérimental du STM fonctionnant à l'interface solide/liquide [110].	107
78	Représentation du STM sous ultra vide.	108
79	Topographie d'une surface d'Au(111) observée au microscope à effet tunnel (interface liquide/solide). Profils de la ligne sélectionnée avec une hauteur de marche $\sim 2.4 \text{ \AA}$	109
80	Structure cristalline du mica, (A) : projection [110], (B) : surface clivée [113].	110
81	Image STM d'un substrat d'Au observé en sortie du bâti par un mauvais processus de dépôt ($I_t=10 \text{ nA}$ et $V_t=-518 \text{ mV}$ et 446 nm^2 , STM Liquide/solide).	111
82	Image STM d'un substrat d'Au en sortie du bâti ($I_t=10 \text{ nA}$ et $V_t=-370 \text{ mV}$ et 500 nm^2 , STM Liquide/solide).	112
83	Image STM d'un substrat d'Au en sortie du bâti ($I_t=24.16 \text{ nA}$ et $V_t=-10 \text{ mV}$ et 147 nm^2 , STM UHV).	113
84	Photographie et schéma de la vanne pulsée.	115
85	Illustration de l'angle entre l'échantillon et l'axe de dépôt de la vanne pulsée.	116
86	Images STM (68 nm^2 ($I_t=9.5 \text{ pA}$, $V_t=-2540 \text{ mV}$) de l'ADN de hareng [87.1 nM] (5 pulses de 1.5 ms , $\theta \sim 45^\circ$, STM UHV).	118
87	A gauche, image STM ($248 \times 240 \text{ nm}$, $I_t=51 \text{ pA}$, $V_t=-2800 \text{ mV}$) de l'ADN de hareng [74.4 nM] (50 pulses de 1.5 ms $T_{\text{solution}}=91^\circ$, STM UHV). A droite, image STM (80 nm^2 , $I_t=30 \text{ pA}$, $V_t=-2068 \text{ mV}$) de l'ADN de hareng [7.61 nM] (5 pulses de 1.5 ms , $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV)	119

88	Images STM (100×110 nm ($I_t=32$ pA, $V_t=-2538$ mV) de l'ADN de hareng [87.1 nM] auquel on a ajouté le fluorophore TP-2Py [0.2 mM] (12 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV).	120
89	Deux Images STM successives(Images STM (175×160 nm ($I_t=9.5$ pA, $V_t=-2540$ mV) de l'ADN de hareng [87.1 nM] auquel on a ajouté le fluorophore TP-2Py [0.2 mM] (12 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -45^\circ$, STM UHV).	121
90	Images STM (200 nm ² ($I_t=20$ pA, $V_t=-2538$ mV) de l'ADN de hareng [87.1 nM] (15 pulses de 1.5 ms, $\theta \sim -15^\circ$, STM UHV).	122
91	Schéma des fonctionnalités des fluorophores utilisés et structures chimiques des Bis-phenylamine thiol et thiolane mis en œuvre.	123
92	A : Durée de vie de fluorescence des TP-2Py thiolanes dans une solution tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM. B : Durée de vie de fluorescence des TP-2Py thiolanes dans une solution d'ADN naturel([40 equ](tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM).	124
93	A : Durée de vie de fluorescence des TP-2py thiols dans une solution tampon (pH 7.2) de cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM. B : Durée de vie de fluorescence des TP-2py thiols dans une solution d'ADN naturel (40 equ)et de la solution tampon.124	124
94	Images STM (156×115 nm ($I_t=21$ pA, $V_t=-2784$ mV) de l'ADN de hareng marqué par des TP-2Py thiolanes (solution d'ADN de hareng [87.1 nM] avec une concentration de TP-2Py thiolane qui est de 0.2 mM, 10 pulses de 1.5 ms $\theta \sim -15^\circ$, STM UHV).	126
95	Schéma de la méthode de dépôt par polarisation de l'échantillon [130] ($V_s=2.8$ V et $I_t=20$ pA).	127
96	Images STM d'une molécule d'ADN G4 sur un substrat d'Au (111) [130] ($V_s=2.8$ V et $I_t=20$ pA).	127
97	(a) Structure schématique d'un organothiol (structure général en HS-R-X). (b) Structure de la mono-couche auto-organisée après immersion d'un substrat d'Au dans une solution d'organothiol [128].	128
98	Recouvrement hexagonal de l'Au(111) composé de sites fantômes alternatifs [131].	129
99	Image STM d'une mono-couche auto-organisée de dodecanethiols ($C_{10}H_{21}SH$) et schéma représentant la structure de surface des dodecanethiols [128].	130
100	Images STM (115 nm ² ($I_t=40$ pA, $V_t=-1889$ mV) du TP-2Py thiolane (15 jours d'incubation de l'échantillon d'or dans une solution [1 mM]).	131
101	Spectres infra-rouge de la poudre de TP-2Py thiolane et de la TP-2Py thiolane chimisorbée sur une surface d'Au(111).	131
102	Schéma de co-adsorption des mercaptohexanols et de la TP-2Py thiolane sur Au. .	132
103	Images STM (100 nm ² ($I_t=21$ pA, $V_t=+2072$ mV) du TP-2Py thiol (24 heures d'incubation de l'échantillon d'Au dans une solution de TP-2Py thiol[1 mM]/éthanol).133	133

104	Images STM (100 nm^2 ($I_t=21 \text{ pA}$, $V_t=-2726 \text{ mV}$) d'ADN de hareng [87.1 nM] déposé par polarisation de la surface d'Au (5 minutes à $V=250 \text{ mV}$), sur laquelle une monocouche de TP-2Py thiol avait été déposée (24 heures dans solution à [1 mM] dans l'éthanol).	134
105	Structure chimique du hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol et son contre-ion (HCl).	134
106	Organisation des thiols hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol sur une surface d'or ($91 \times 50 \text{ nm}$ et $4 \times 2 \text{ nm}$ ($I_t=18 \text{ pA}$, $V_t=1680 \text{ mV}$).	135
107	Images STM 110 nm^2 ($I_t=17 \text{ pA}$, $V_t=-2356 \text{ mV}$) d'ADN de hareng [87.1 nM] déposé par polarisation de la surface d'Au (1 minute à $V=180 \text{ mV}$), sur laquelle une monocouche d'hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol avait été déposée (5 minutes dans solution ethanol/hypochlorure de 11-amino-1-undecanethiol [1 mM]).	136
108	Schéma de montage électrique de la photodiode rapide.	143
109	Deux facteurs limitatifs de la résolution temporelle [Hamamatsu].	143
110	Interface du logiciel de régression exponentielle décroissante.	145
111	Spectres de transmission des différents filtres sur la passage de la fluorescence et le spectre de filtration vus par la fluorescence avant le CPM-PMTs.	147
112	Spectre de fluorescence de la fluorescéine sans filtre et le spectre de fluorescence de la fluorescéine atténué par les filtres placés entre la solution et le détecteur.	148
113	Section efficace d'absorption à deux photons des composés dans le dichloromethane.	149
114	Section efficace d'absorption à deux photons des composés dans l'ADN de hareng à 40 équivalents en paires de bases [$1 \mu\text{M}$] (en rouge : la TP-2Py, en orange : la TP-2PyO, en bleu foncé : la TP-3Py, en bleu ciel : la TP-3PyO, en vert : la TP-2Bzim ; en noir : la TP-3Bzim, en jaune : la CBZ-3PyO et en rose la CBZ-2Py) (tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2).	150
115	Spectres d'émission normalisés de fluorescence des dérivés triphenylamines [$100 \mu\text{M}$] en présence d'ADN [40 équivalents], (en rouge : TP-2Py, en bleu : TP-3Py, en bleu ciel : TP-3PyO, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim, en noir : TP-3Bzim, en violet : Hoechst 33258). Spectre d'émission de fluorescence de la Fluorescéine [$50 \mu\text{M}$] dans l'eau (pH11) (en magenta : Fluorescéine). Spectre d'émission de fluorescence de la Rhodamine 6G [$50 \mu\text{M}$] dans l'éthanol (en gris : Rhodamine 6G).	151
116	Spectres d'absorption normalisés des dérivés triphenylamines [$100 \mu\text{M}$] en présence d'ADN [40 équivalents], (en rouge : TP-2Py, en bleu : TP-3Py, en bleu ciel : TP-3PyO, en orange : TP-2PyO, en vert : TP-2Bzim, en noir : TP-3Bzim, en violet : Hoechst 33258). Spectre d'absorption de la Fluorescéine [$50 \mu\text{M}$] dans l'eau (pH11) (en magenta : Fluorescéine). Spectre d'absorption de la Rhodamine 6G [$50 \mu\text{M}$] dans l'éthanol (en gris : Rhodamine 6G).	151
117	Spectres d'absorption normalisés des TPs (pointillé) et TNs (continu)[$100 \mu\text{M}$] dans le dichloromethane (en bleu : Py, en bleu ciel : Bzo, en orange : Bzt).	152

118 Spectres d'émission de fluorescence normalisés des TPs (pointillé) et TNs (continu)[100 μ M] dans le dichloromethane (en bleu : Py, en bleu ciel : Bzo, en orange : Bzt).	152
---	-----

Liste des tableaux

1	Tableau des valeurs des sections efficaces d'absorption à deux photons de la fluorescéine (eau, pH 11) et de la rhodamine 6G (éthanol) [28]	30
2	Comparaison de la microscopie confocale et à deux photons.	42
3	Coefficients A_1 et A_2 lors d'ajustement par une fonction biexponentielle des déclin de fluorescence des mélanges Fluorescéine/Rhodamine B.	60
4	Propriétés photophysiques des TN et TP dans le dichlorométhane, l'ensemble des mesures est détaillé en annexe A.5.1.	78
5	Propriétés optiques des composées ioniques dans l'ADN.	85
6	Propriétés de fluorescence des dérivés TP à deux branches dans différentes solutions.	90
7	Propriétés de fluorescence des dérivés TP à trois branches dans différentes solutions.	91
8	Propriétés de fluorescence des dérivés TP à deux branches dans l'ADN de hareng à différentes concentrations.	93
9	Propriétés de fluorescence des dérivés TP à deux branches à saturation, dans le DrewAT.	95
10	Propriétés photophysique des dérivés TP à deux branches dans l'ADN, à saturation (40 équivalents).	100
11	Taux de collection évalués pour les principaux fluorophores testés sur le microscope (dans l'ADN et le DrewAT).	148
12	Taux de collection des fluorophores principaux (dans l'ADN et le DrewAT).	149
13	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py ($100 \mu M$) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	153
14	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py ($100 \mu M$) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	154
15	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Py ($100 \mu M$) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	154
16	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Py ($100 \mu M$) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	155
17	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-PyO ($100 \mu M$) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	155
18	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-PyO ($100 \mu M$) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à pH 7,2.	156

19	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-PyO (100 μM) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	156
20	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-PyO (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	157
21	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	157
22	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	158
23	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations d'ADN de hareng dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	159
24	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP3-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 100mM NaCl à ph 7,2.	159
25	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 200mM NaCl à ph 7,2.	160
26	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Py (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à ph 7,2.	160
27	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 200mM NaCl à ph 7,2.	161
28	Mesures des durées de vie de fluorescence de la TP2-Bzim (100 μM) pour différentes concentrations de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à ph 7,2.	161
29	Variation du coefficient de diffusion rotationnel et de la durée de vie de fluorescence du Hoechst 33258 (100 μM) en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT dans une solution tampon 10mM cacodylate de sodium, 400mM NaCl à ph 7,2.	162