



**HAL**  
open science

# Détection fluorimétrique en circuit microfluidique des ions $Pb^{2+}$ , $Hg^{2+}$ et $Cd^{2+}$ en milieu aqueux

Djibril Faye

► **To cite this version:**

Djibril Faye. Détection fluorimétrique en circuit microfluidique des ions  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  en milieu aqueux. Autre. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2011. Français. NNT : 2011DENS0044 . tel-00745124

**HAL Id: tel-00745124**

**<https://theses.hal.science/tel-00745124>**

Submitted on 24 Oct 2012

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

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



N° ENSC 149999

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

Présentée par

**Djibril FAYE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN**

Domaine :

**SCIENCES PHYSIQUES et CHIMIQUES**

---

**Détection fluorimétrique en circuit microfluidique des ions  $Pb^{2+}$ ,  
 $Hg^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  en milieu aqueux**

---

Thèse présentée publiquement le 03 Novembre 2011 devant le jury composé de :

Olivier Soppera, Chargé de recherches  
Stéphanie Legoupy, Chargée de recherches  
Isabelle Ledoux, Professeur des universités  
Sabine Brunklaus, Chargée de recherches  
Isabelle LERAY, Directrice de Recherches  
Jacques DELAIRE, Professeur des universités

Rapporteur  
Rapporteuse  
Présidente du jury  
Examinatrice  
Directrice de thèse  
Membre du jury

Laboratoire de Photophysique et de Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires  
(ENS CACHAN/CNRS/UMR 8531)

61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)



# Remerciements



# Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le projet européen « Microfluid » et le centre nationale de la recherche scientifique de France (CNRS) d'avoir financés ces trois années de thèse.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires à l'École Normale Supérieure de Cachan (PPSM). Je remercie tout d'abord le professeur *Jacques Delaire* et le professeur *Keitaro Nakatani* de m'avoir accueilli dans ce laboratoire.

Je tiens à remercier vivement Mme *Legoupy Stephanie* et M. *Soppera Olivier* pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je suis également très reconnaissant à Mme *Branklaus Sabine* et Mme *Ledoux Isabelle* pour leur participation à mon jury de thèse.

Je vais exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse Mme *Leray Isabelle* de m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse si riche et diverse au sein de son équipe. Je tiens très sincèrement à la remercier d'avoir toujours trouvé du temps pour discuter de l'évolution des manip (malgré ses congés de maternité). Je tiens aussi à la remercier pour ses grandes qualités scientifiques mais aussi humaines. Travailler à ses côtés fût pour moi un enrichissement personnel et un grand bonheur.

Je tiens également à témoigner une reconnaissance particulière au Professeur *Jacques Delaire* qui a étroitement suivi ces travaux. Malgré sa retraite, il m'a consacré beaucoup de temps pour que cette thèse se déroule dans de très bonnes conditions. Je le remercie aussi des conseils et la rigueur qu'il m'a prodigués pendant la rédaction. A travers les voyages que j'ai effectués avec lui dans le cadre projet Européen microfluid, j'ai appris beaucoup de choses sur l'histoire de la France, merci encore Jacques.

Je tiens également à remercier *Jean-Pierre Lefèvre* de m'avoir initié à la microfluidique, qui fût pour moi une science toute nouvelle. Je tiens à le remercier pour sa grande disponibilité pendant ses trois années de thèse, des conseils qu'il m'a prodigués, mes aussi pour son franc parler.

Je vais également remercier nos collègues physiciens (*Isabelle Ledoux, Joseph Zyss, Mélanie Lebental, Joseph Lautru, Sergey Lozenko*) pour leur collaboration pour la détection par microlaser. Ma gratitude va aussi à l'égard nos collaborateurs de l'école polytechnique de Milan (*POLIMI*) et du laser Zentrum Room de Hanovre (*LZH*), pour la fabrication des microcavités laser par polymérisation à deux photons (2PP).

Pendant ces trois années de thèse grâce au monitorat, j'ai eu la chance de découvrir l'enseignement universitaire ; je tiens donc énormément à remercier toute la direction du département chimie de l'ENS de Cachan (*Fabien, Rachel, Joanne*). Je tiens également à remercier tous les enseignants que j'ai côtoyés durant ces trois années (*Cécile, Valérie, Eléna, Nicolas* etc), mais également les techniciens (*Sandrine, Catherine, Hélène, Franck, Raveen et Caroline*).

Je tiens aussi à remercier le personnel administratif du laboratoire, *Andrée* par sa grande gentillesse et sa joie de vivre, *Christian* alias Papy toujours prêt à rendre service (tu vas me manquer mon papy adoré) et *Jacky* l'informaticien du laboratoire toujours disponible.

Un grand merci à *Arnaud* pour son aide à la réalisation des images AFM et pour le réglage des spectrofluorimètres, sa gentillesse et sa grande disponibilité sont incontestables.

Sans une bonne ambiance, des conseils dans les couloirs du labo et pendant les repas, cette thèse n'aurait pas pu se réaliser dans de très bonnes conditions ; je tiens aussi à remercier *Pierre Audebert, Robert et Clémence*. Un grand merci à mon facteur *Laurent* pour les services qu'il m'a rendus, sa rigueur, sa bonne humeur, merci à *Gilles*, très gentil, serviable (j'adore ses blagues). Je tiens aussi à remercier *Remi* ; quelqu'un de très intéressant toujours de bonne humeur. Merci à *Valérie Alain* pour ces deux années inoubliables passées dans le même labo, *Valérie Génot*, très serviable toujours prête à rendre service. Un grand merci à *Karine* pour ses conseils et discussions très intéressantes sur la science et la religion.

Ces trois courtes années de thèse se sont aussi déroulées dans une très bonne ambiance de jeunes. Je voudrais évidemment remercier mes amis *Jérémy Bell* alias Jérémy queue de cheval, merci pour ces trois années dans le même labo, les bons moments et les souvenirs inoubliables. *Jérémy Malinge* l'angevin supporter inconditionnel du PSG, j'espère que tu garderas toujours l'écharpe de l'OM devant ton bureau. *Stéphane*, le rat du laboratoire merci pour les idées de cadeaux, le rétroviseur et le camembert dédié à Laura, *Jef* Mr laser, je n'ai toujours pas vu la blonde qui te fait courir. *Olivier Galangou* Alias Brad Pitt le toulonnais qui force sont accent (j'attends toujours ta déclaration). *Cassandra* alias Angéline Jolie toujours de bonne humeur très serviable. *Eva*, très sympa, adorable, *Sandrine* fervent défenseur du matériel de son labo. *Nicolas* alias Bocoli Bocali pour les intéressantes discussions pendant les TP. *Than*, très sympa, serviable, merci pour les photos prises à Ferrara (souvenirs souvenirs). *Arnaud*, la force tranquille du PPSM, maintenant que je suis parti, tu ne vas plus raser les murs du labo. *Chloé*, le bruit de tes talons dans le couloir va me manquer, *Jacky*, vive les batailles de neige; je vais garder le rétroviseur en souvenir de toi et Stéphane. *Johan Saba* alias Mc Gloire fan de l'OM, dommage tu ne nous as pas encore présenté Mc Gloire. *Jonathan* supporter indéfectible de l'OM, évitez de le croiser dans le noir en salle spectro, merci ton idée du maillot OM floqué djiby XX. *Olivier Noel* petit futé, enfin tu vas souffler comme tu l'as dit, la concurrence était rude mdr... Un grand merci à *Béatrice* pour mes premiers pas dans le labo. J'ai une pensée particulière à *Cylia* qui travaille sur la continuité du projet, ce fût un grand plaisir de travailler avec toi. *Cheng* pour sa bonne humeur matinale pas il ne faut pas

trop l'embêter, *Yibin* pour ses cours de chinois et de nettoyage de tubes mdr . *Yuan Yuan* très calme j'espère que tu vas te souvenir de mon cours de français, *Sophie* toujours devant sa paillasse, *Jia* « ne changes pas, restes comme ça » mdr. Une pensée particulière à mes deux amoureuses du laboratoire Aurélie toujours là pour me remonter le morale, Laura ma chérie adorée, n'est-ce pas Olivier !!!!

Je tiens également remercier tous les assistants ingénieurs et stagiaires (*Sophie, Josselin et Sylvain*) qui ont travaillé avec moi sur ce projet. Je souhaiterais aussi remercier tous les stagiaires, Postdoc et ATER qui sont passés que furtivement au laboratoire (*Thomas, Marie, Antoine, Benjamin, Kasia*).

Je tiens également à remercier mes parents, mon oncle (*Djibril senior*), ainsi que toute ma famille de Thies, de Dakar, des Landes (*Sergio, Pilou, Nanou, ma sœur Laurie, Marion, Mouss*) et ma famille Angevine (*Isabelle, Yannick, Audrey (la roots), Elise (la star) et Camille*). Je tiens aussi à remercier *Lulu* (alias *Brigitte, Luck*) pour son soutien indéfectible pendant toute cette période, je sais que ce n'était pas facile pour toi mais tu as su gérer. Je tiens aussi à remercier tous mes amis qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse, ma cousine *Anne marie* pour son soutien indéfectible.







# Abréviations



# Abréviations

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>AAS :</b>     | Atomic Absorption Spectroscopy                                    |
| <b>Abs :</b>     | Absorption  |
| <b>Ac :</b>      | Acétyle   |
| <b>ADN :</b>     | Acide désoxyribonucléique   |
| <b>AFM :</b>     | Microscopie de Force Atomique                                     |
| <b>AIBN :</b>    | Azobisisobutyronitrile  |
| <b>APTES :</b>   | Aminopropyle triéthoxysilane                                      |
| <b>ASE :</b>     | Amplified spontaneous Emission                                    |
| <b>Ar :</b>      | Aryle   |
| <b>BAPTA :</b>   | 1,2-Bis(2-AminoPhenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -Tetraacetic Acid |
| <b>Boc :</b>     | <i>t</i> -Butyloxycabonyle  |
| <b>BODIPY :</b>  | DIPYromethene BOron Difluoride                                    |
| <b>Bu :</b>      | Butyle  |
| <b>Cbz :</b>     | Benzyloxycabonyle   |
| <b>CCM :</b>     | Chromatographie sur Couche Mince                                  |
| <b>Cl-HOBt :</b> | 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole                                   |
| <b>C.M.A. :</b>  | Concentrations maximales admissibles                              |
| <b>DANS :</b>    | Dansyle amide   |
| <b>DCM :</b>     | 4-dicyanomethylene-2-methyl-6-p-dimethylaminostyryl-4H-pyrene     |
| <b>DO :</b>      | Densité optique   |
| <b>DMF :</b>     | <i>N,N'</i> -diméthylformamide                                    |
| <b>DMSO :</b>    | diméthylsulfoxyde   |
| <b>DPPE :</b>    | bis-(diphénylthiophosphino)éthane                                 |
| <b>E-AAS :</b>   | Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy                     |
| <b>EDC :</b>     | Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide                     |
| <b>EDTA :</b>    | Ethylène diamine tétracétique acide                               |
| <b>em :</b>      | Emission  |
| <b>Et :</b>      | Ethyle  |
| <b>éq. :</b>     | Equivalent  |
| <b>exc :</b>     | Excitation  |
| <b>ESI :</b>     | ElectroSpray Ionization   |
| <b>F :</b>       | Température de fusion   |
| <b>F-AAS :</b>   | Flame Atomic Absorption Spectroscopy                              |
| <b>FRET :</b>    | Fluorescence Resonance energy transfer                            |
| <b>GF-AAS :</b>  | Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy                   |
| <b>HSAB :</b>    | Hard and Soft Acids and Bases                                     |
| <b>Hz :</b>      | Hertz   |
| <b>5-IAF :</b>   | 5-Iodoacetamidofluoresceine                                       |
| <b>ICP :</b>     | Inductively Coupled Plasma  |
| <b>IR :</b>      | Infrarouge  |

## Abréviations

---

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>LED :</b>           | Diode électroluminescente                              |
| <b>LUMO :</b>          | Orbitale moléculaire la plus basse vacante             |
| <b>HOMO :</b>          | Orbitale moléculaire la plus haute occupée             |
| <b>M :</b>             | Masse molaire  |
| <b>MAPTMS :</b>        | (3-(methacryloxy)propyltrimethoxysilane)               |
| <b>Me :</b>            | Méthyle  |
| <b>MOPS :</b>          | 3-morpholinopropanesulfonic acid                       |
| <b>NMR :</b>           | Résonance Magnétique Nucléaire                         |
| <b>OMS :</b>           | Organisation Mondiale de la Santé                      |
| <b>ppb :</b>           | Parties par Milliard                                   |
| <b>ppm :</b>           | Parties par Million                                    |
| <b>PCT :</b>           | Transfert de charge photoinduit                        |
| <b>PDMS :</b>          | Poly(diméthylsiloxane)                                 |
| <b>MAPTMS</b>          | 3-(methacryloxy)propyltrimethoxysilane                 |
| <b>PEG :</b>           | Poly(éthylèneglycol)                                   |
| <b>PET :</b>           | Transfert d'électron photoinduit                       |
| <b>Ph :</b>            | Phényle  |
| <b>PHEMA :</b>         | Poly(hydroxyéthylméthacrylate)                         |
| <b>PMMA :</b>          | Poly(méthacrylate de méthyle)                          |
| <b>PS-b-PAA :</b>      | Poly(styrene-b-acide acrylique)                        |
| <b>Rdt :</b>           | Rendement  |
| <b>s-SDTB :</b>        | Sulfo-succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrate) |
| <b>MS :</b>            | Spectroscopie de Masse                                 |
| <b>TA :</b>            | Température ambiante                                   |
| <b>TC :</b>            | Transfert de charge                                    |
| <b>TE :</b>            | Transfert d'électron                                   |
| <b>TBS :</b>           | <i>t</i> -butyldiméthylsilyle                          |
| <b>TFA :</b>           | Acide trifluoroacétique                                |
| <b>THF :</b>           | Tétrahydrofurane                                       |
| <b>Tol. :</b>          | Toluène  |
| <b>Ts :</b>            | Tosyle   |
| <b>UV :</b>            | Ultraviolet  |
| <b>R<sub>f</sub> :</b> | Rapport frontal  |
| <b>MOPS :</b>          | 3-morpholinoethanesulfonic acid                        |
| <b>MES :</b>           | 2-morpholinoethanesulfonic acid                        |
| <b>WHO :</b>           | World Health Organisation                              |



# Sommaire Général



# Sommaire

|  |          |
|--|----------|
| <b>Introduction Générale.....</b>  | <b>1</b> |
| <b>Chapitre I : Détection du plomb, du mercure et du cadmium .....</b>                                   | <b>7</b> |
| Sommaire .....   | 7        |
| I. Cations toxiques .....  | 9        |
| I.1. Toxicité des métaux lourds : $Hg^{2+}$ , $Pb^{2+}$ et $Cd^{2+}$ .....                               | 9        |
| I.1.a. Le mercure .....  | 9        |
| I.1.b. Le plomb .....  | 10       |
| I.1.c. Le cadmium .....  | 12       |
| I.2. Spéciation du plomb, du mercure et du cadmium en fonction du pH .....                               | 13       |
| I.2.a. Spéciation du plomb.....  | 13       |
| I.2.b. Spéciation du mercure.....  | 13       |
| I.2.c. Spéciation du cadmium .....   | 14       |
| I.3. Valeurs officielles dans l'eau .....  | 15       |
| I.4. Les méthodes de détection des métaux lourds .....   | 16       |
| I.4.a. Voltampérométrie .....  | 16       |
| I.4.b. Potentiométrie .....  | 17       |
| I.4.c. Chromatographie ionique.....  | 18       |
| I.4.d. Spectroscopie de masse (ICP-MS).....  | 18       |
| I.4.e. Spectrométries d'absorption et d'émission atomiques.....  | 19       |
| I.4.f. Détection par fluorescence.....   | 20       |
| I.5. La détection des métaux lourds par fluorescence en microfluidique .....                             | 21       |
| II. Les sondes fluorescentes .....   | 24       |
| II.1. Principe de la fluorescence .....  | 24       |
| II.2. Les fluoroionophores .....   | 27       |
| II.2.a. Les entités complexantes : l'ionophore.....  | 28       |
| II.2.b. Les entités fluorescentes : fluorophores.....  | 30       |
| II.3. Les phénomènes photoinduits.....   | 31       |
| II.3.a. Transfert d'électron photoinduit .....   | 31       |
| II.3.b. Transfert de charge photoinduit .....  | 33       |
| II.3.c. Transfert d'énergie d'excitation.....  | 35       |
| II.3.d. Formation ou disparition d'excimères. ....   | 36       |
| II.4. Les fluoroionophores pour la détection des métaux lourds : $Pb^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Cd^{2+}$ ..... | 37       |
| II.4.a. Classification de Pearson .....  | 38       |
| II.4.b. Fluoroionophores pour la détection du Plomb .....  | 39       |
| II.4.c. Fluoroionophores pour la détection du mercure .....  | 41       |
| II.4.d. Fluoroionophores pour la détection du cadmium.....   | 44       |
| Conclusion .....   | 48       |
| Références Bibliographiques .....  | 50       |



**Chapitre II : Détection du cadmium par le Rhod-5N dans un dispositif microfluidique..... 57**

|   |    |
|---|----|
| Sommaire .....  | 57 |
| Introduction.....   | 58 |
| I. Présentation de la sonde Rhod-5N .....   | 58 |
| II. Etudes spectroscopiques de Rhod-5N en solution .....  | 60 |
| II.1. Complexation du cadmium par Rhod-5N .....   | 60 |
| II.2. Sélectivité du ligand Rhod-5N.....  | 62 |
| III. Complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique.....                          | 63 |
| III.1. Dosage du cadmium en fonction de la longueur du circuit.....                                 | 64 |
| III.1.a. Dosage du cadmium en circuit court.....  | 65 |
| III.1.b. Dosage du cadmium en circuit long.....   | 66 |
| III.1.c. Courbe de calibration du Rhod-5N en circuit microfluidique.....                            | 67 |
| III.1.d. Interférence du plomb en circuit microfluidique .....                                      | 68 |
| III.1.e. Complexation du Cd <sup>2+</sup> et du Pb <sup>2+</sup> en mélange interne et externe..... | 69 |
| III.2. Méthodes de discrimination du cadmium avec les cations interférents.....                     | 71 |
| III.2.a. Discrimination par des mesures ratiométriques .....  | 71 |
| III.2.b. Utilisation d'un préconcentrateur de cations.....  | 72 |
| III.2.c. Isotherme d'adsorption du cadmium.....   | 74 |
| III.2.d. Efficacité d'adsorption du plomb et du cadmium.....  | 75 |
| Conclusion .....  | 78 |
| Références bibliographiques.....  | 79 |

**Chapitre III : Ligand bidentate à base de sulfure de phosphine pour la détection du mercure en milieu microfluidique ..... 81**

|  |    |
|--|----|
| Sommaire .....   | 81 |
| Introduction.....  | 82 |
| I. Présentation de la sonde .....  | 82 |
| II. Synthèse et propriétés photophysiques des composés modèles .....                       | 84 |
| II.1. Le composé modèle PS-3PEG .....  | 84 |
| II.1.a. Synthèse de la phosphine PS-3PEG.....  | 84 |
| II.1.b. Propriétés photophysiques du PS-3PEG .....   | 87 |
| II.2. Le composé modèle PS-PEG .....   | 88 |
| II.2.a. Synthèse de la phosphine PS-PEG.....   | 88 |
| II.2.b. Propriétés photophysiques du PS-PEG .....  | 89 |
| III. Synthèse et propriétés photophysiques du DPPS-PEG .....                               | 91 |
| III.1. Analyse rétrosynthétique.....   | 91 |
| III.2. Synthèse du DPPS-PEG.....   | 91 |
| III.2.a. Préparation du sulfure de bis(diphénylacétylène phosphino)-éthane <b>72</b> ..... | 91 |

|   |    |
|---|----|
| III.2.b. Accès au DPPS-PEG par couplage de Sonogashira.....   | 92 |
| III.3. Complexation des ions mercuriques par le DPPS-PEG..... | 93 |
| IV. Complexation du mercure en circuit microfluidique.....    | 95 |
| Conclusion.....   | 97 |
| Références Bibliographiques.....                              | 99 |

## **Chapitre IV : Nouvelle sonde fluorescente dérivée du calixarène pour le dosage sélectif du plomb en milieu microfluidique..... 101**

|   |     |
|---|-----|
| Sommaire.....   | 101 |
| Introduction.....   | 103 |
| I. Présentation du fluoroionophore.....                                     | 104 |
| I.1. Le fluorophore: Dansylamide.....                                       | 105 |
| I.2. L'ionophore: Calixarène.....   | 105 |
| II. Synthèse.....   | 107 |
| II.1. Synthèse du composé modèle DANS-1-OH.....                             | 107 |
| II.2. Synthèse du calixDANS-3-OH.....                                       | 108 |
| II.2.a. Monosubstitution du calixarène.....                                 | 109 |
| II.2.b. Tri-substitution et saponification du calixarène.....               | 110 |
| II.2.c. Sulfamidation du triacide <b>93</b> .....                           | 111 |
| II.2.d. Réduction de la fonction alcène <b>94</b> .....                     | 112 |
| III. Etudes photophysiques du CalixDANS-3-OH en solution.....               | 112 |
| III.1. Les composés modèles DANS-1 et DANS-1-OH.....                        | 112 |
| III.1.a. Le cas du composé modèle DANS-1.....                               | 112 |
| III.1.b. Composé modèle DANS-1-OH.....                                      | 114 |
| III.2. Complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH.....                     | 115 |
| III.2.a. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à pH = 3.....                | 116 |
| III.2.b. Sélectivité du CalixDans-3-OH en solution.....                     | 119 |
| III.2.c. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à pH=5.....                  | 120 |
| IV. Vers une utilisation du CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique.....   | 123 |
| IV.1. Le composé modèle DANS-1-OH greffé sur le PDMS.....                   | 124 |
| IV.1.a. Greffage du composé modèle DANS-1-OH sur les parois du circuit..... | 126 |
| IV.1.b. Etudes spectroscopiques en circuit microfluidique.....              | 126 |
| IV.2. Le CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique.....                      | 128 |
| IV.2.a. Greffage du CalixDANS-3-OH sur les parois du circuit.....           | 128 |
| IV.2.b. Complexation du plomb en circuit microfluidique.....                | 129 |
| IV.2.c. Les cations interférents en circuit microfluidique.....             | 132 |
| Conclusion.....   | 133 |
| Références Bibliographiques.....  | 135 |

**Chapitre V : Ligands greffés sur un polymère bloc en vue d'une détection par microcavités laser ..... 139**

|  |     |
|--|-----|
| Sommaire .....   | 139 |
| Introduction.....  | 141 |
| I. Le principe de la détection par microcavité laser.....  | 143 |
| I.1. Les microcavités lasers .....   | 143 |
| I.2. La détection par microcavité laser .....  | 145 |
| II. Synthèse des ligands pour la détection du mercure.....   | 147 |
| II.1. Analyse rétrosynthétique.....  | 147 |
| II.2. Synthèse du ligand spécifique de Hg <sup>2+</sup> .....  | 148 |
| II.2.a. Préparation du précurseur <b>102</b> .....   | 148 |
| II.2.b. Sulfuration de l'intermédiaire <b>102</b> .....  | 149 |
| II.2.c. Fonctionnalisation du composé <b>101</b> .....   | 150 |
| III. Synthèse du ligand pour la détection du plomb .....   | 153 |
| III.1. Analyse rétrosynthétique.....   | 154 |
| III.2. Synthèse du ligand spécifique du Pb <sup>2+</sup> .....   | 155 |
| III.2.a. Synthèse des précurseurs <b>110</b> .....   | 155 |
| III.2.b. Synthèse du sulfonamide protégé <b>111</b> .....  | 155 |
| III.2.c. Accès au ligand <b>109</b> .....  | 156 |
| IV. Greffage des ligands <b>100c</b> et <b>109</b> sur le copolymère PS-b-PAA.....                               | 157 |
| IV.1. Le choix du polymère .....   | 157 |
| IV.2. Quantification des amines greffées sur le PS-b-PAA .....   | 159 |
| IV.2.a. Amines greffées dans la masse .....  | 159 |
| IV.2.b. Amines greffées à la surface du film PS-b-PAA .....  | 162 |
| IV.3. Fonctionnalisation des ligands sur le PS-b-PAA .....   | 164 |
| IV.3.a. Fonctionnalisation du ligand Hg <sup>2+</sup> dans la masse .....  | 164 |
| IV.3.b. Fonctionnalisation du ligand spécifique de Pb <sup>2+</sup> dans la masse .....                          | 165 |
| V. Etude des propriétés optiques des films .....   | 166 |
| V.1. Les films de copolymère PS-b-PAA.....   | 166 |
| V.1.a. Le choix du colorant laser .....  | 166 |
| V.1.b. La stabilité des colorants dans la matrice PMMA .....   | 167 |
| V.1.c. Stabilité des colorants laser dans la matrice du PS-b-PAA.....  | 168 |
| V.1.d. Preuve de principe de sensibilité de la microcavité laser.....  | 169 |
| V.2. Les films de copolymères blocs pour la détection du mercure et du plomb .....                               | 170 |
| V.2.a. Solubilité du copolymère bloc élaboré pour la détection du mercure.....                                   | 170 |
| V.2.b. Solubilité du copolymère pour la détection du plomb .....   | 172 |
| V.2.c. Ligand spécifique <b>100c</b> greffé à la surface du film de polymère.....                                | 174 |
| Conclusion .....   | 175 |
| VI. Fonctionnalisation des ligands Hg <sup>2+</sup> et Pb <sup>2+</sup> à la surface des microcavités laser..... | 176 |
| VI.1. Détection du mercure en surface par les groupements thiols.....  | 177 |
| VI.2. Fonctionnalisation de la surface du PMMA.....  | 178 |
| VI.3. Fonctionnalisation de la surface du PHEMA-b-PMMA .....   | 180 |

## Sommaire

---

|  |     |
|--|-----|
| VI.4. Fonctionnalisation des groupements thiols à la surface du PHEMA-b-PMMA ..... | 181 |
| Conclusion .....   | 184 |
| VII. Fabrication des microcavités par polymérisation à deux photons (2PP).....     | 185 |
| VII.1. Microcavités réalisées à partir d'un acrylate.....                          | 186 |
| VII.2. Microcavités réalisées à partir d'un ormosil .....                          | 187 |
| Conclusion et perspectives.....  | 190 |
| Références bibliographiques.....   | 193 |

## Conclusion Générale et Perspectives ..... 197

## Partie expérimentale ..... 201

|   |     |
|---|-----|
| Sommaire .....  | 201 |
| I. General procedures.....  | 202 |
| II. Chapitre III: Synthesis of mercury ligand.....  | 202 |
| II.1. Model compound for mercury detection: PS-3PEG .....   | 202 |
| II.2. Model compound for mercury detection: PS-PEG .....  | 208 |
| II.3. Mercury ligand DPPS-PEG .....   | 211 |
| III. Chapitre IV: Ligand for lead ion detection CalixDans3-OH.....  | 214 |
| III.1. Model compound for lead ion detection: DANS-1-OH.....  | 214 |
| III.2. Synthesis of lead ion ligand: Calix-DANS-3-OH.....   | 216 |
| IV. Chapter V: Ligands for Hg <sup>2+</sup> and Pb <sup>2+</sup> detection by microlaser.....                   | 221 |
| IV.1. Synthesis of mercury ligand.....  | 221 |
| IV.2. Synthesis of lead ion ligand .....  | 225 |
| V. Chapter V: Porous material for mercury and lead detection.....   | 230 |
| V.1. Synthesis of the bodipy derivatives .....  | 230 |
| V.2. Modification of poly(styrene-b-acrylic acid).....  | 231 |
| V.3. Porous material for mercury detection <b>131</b> .....   | 234 |
| V.4. Porous material for lead detection <b>132</b> .....  | 235 |
| VI. Protocol for the determination of stability constants of the complex of fluoroionophore and metal ion ..... | 236 |
| VII. Protocol for the fabrication of microchips for lead, mercury and cadmium detection.....                    | 239 |
| VII.1. Materials and equipments .....   | 237 |
| VII.2. Fabrication of bilayered microchannel mold .....   | 237 |
| VII.3. Replica of PDMS chip and embedded optical fiber .....  | 239 |
| VII.4. Amplified spontaneous emission (ASE).....  | 240 |



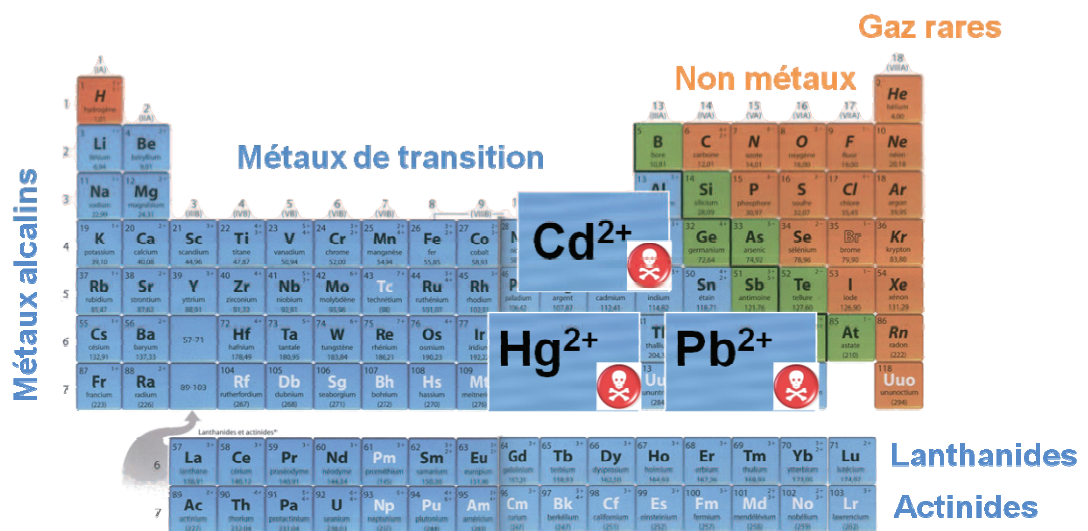


# Introduction Générale



# Introduction générale

La révolution industrielle a entraîné une utilisation massive des métaux lourds. Pendant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, le plomb est utilisé dans l'industrie, principalement dans l'imprimerie et la fabrication des peintures. Dans la deuxième moitié du siècle son utilisation est très liée à l'industrie automobile (batteries, essence au plomb). L'utilisation du cadmium est principalement due à ses caractéristiques physico-chimiques dans les batteries<sup>1</sup> mais aussi pour la protection de l'acier. Le mercure était employé pour ses propriétés biologiques en médecine pour traiter la syphilis,<sup>2</sup> mais aussi pour la fabrication des batteries et des lampes. Malgré des applications de plus en plus nombreuses du mercure, du plomb et du cadmium, il faut admettre que la plupart de ces métaux lourds sont toxiques voir très toxiques. Ils ont un fort impact sur les végétaux, les produits de consommation et sur l'homme. Ces éléments assimilés dans l'organisme peuvent entraîner des dysfonctionnements au niveau du système nerveux, causer des maladies respiratoires, dermatologiques parfois irréversibles et des cancers.<sup>3,4</sup> Il y a donc une réelle nécessité de contrôler ces éléments présents dans notre environnement dont les rejets industriels constituent la principale source de pollution. L'impact du plomb, du mercure et du cadmium sur la santé humaine incite à une maîtrise de la qualité de l'eau de consommation au niveau mondial<sup>5</sup> et en Europe.<sup>6,7</sup>



**Tableau 1 :** Les éléments d'intérêt (le plomb, le mercure et le cadmium) influant sur la qualité des eaux de consommation en Europe.

Afin de contrôler la qualité de l'eau que nous consommons, des directives européennes imposent une concentration maximale de ces éléments. Ces dispositions ont mobilisé la communauté scientifique qui a développé des techniques d'analyse permettant de déterminer la présence de ces éléments à l'état de traces voire d'ultra traces. Parmi les techniques actuelles les plus performantes, on peut citer les méthodes basées sur l'électrochimie,<sup>8</sup> la spectroscopie de masse (ICP)<sup>9</sup> et la fluorescence.<sup>10</sup> Cependant, en ce qui concerne la spectroscopie de masse et la



fluorescence, les analyses ne se font qu'au laboratoire, ce qui ne permet pas des mesures in-situ, d'autre part ces mesures peuvent s'avérer coûteuses. Il y a donc une réelle nécessité de développer des dispositifs portables moins onéreux pour amortir le coût et le temps d'analyse de ces polluants. De nos jours les seuls dispositifs portables utilisés sont basés sur l'électrochimie,<sup>11,12</sup> mais cette technique présente ses limites. Une calibration préalable de l'appareil reste nécessaire, un risque d'interférence de l'électrode de référence avec l'analyte est à prendre en compte et des variations du champ magnétique sont susceptibles de perturber la réponse de l'électrode. L'utilisation de sondes fluorescentes pour la détection de métaux lourds présente de nombreux avantages.<sup>13,14,15</sup> Même si cette technique souffre parfois du manque de stabilité photochimique de certaines sondes fluorescentes, elle est peu onéreuse comparée à la plupart des techniques de détection des métaux lourds existantes.

L'utilisation de la fluorescence en circuit microfluidique<sup>16</sup> est une voie très prometteuse vers la conception de dispositifs portables pour la détection des métaux lourds en milieu aqueux. C'est ainsi qu'est né notre projet de détection du mercure, du plomb, et du cadmium en incorporant une sonde spécifique en circuit microfluidique. Ce projet soutenu par l'Europe<sup>17</sup> est nommé «Microfluid». Celui-ci vise principalement la réalisation de systèmes portables pour la détection des mycotoxines, des bactéries, ainsi que le plomb, le mercure et le cadmium dans l'eau. Notre participation porte principalement sur l'aspect de la détection des métaux lourds en milieu aqueux. Pour répondre à ces attentes, nous avons développé pour deux stratégies :

**La détection par fluorescence** : Notre première approche consiste à concevoir des sondes fluorescentes et à les incorporer en circuit microfluidique dans le but d'en faire des capteurs portables. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la détection du cadmium en circuit microfluidique à partir du composé commercial, le Rhod-5N. Nous avons ensuite synthétisé un ligand hydrosoluble à base de sulfure de phosphine pour la détection du mercure. Après une étude détaillée en cuve de ses propriétés complexantes vis-à-vis mercure, cette sonde a été incorporée dans un dispositif microfluidique.

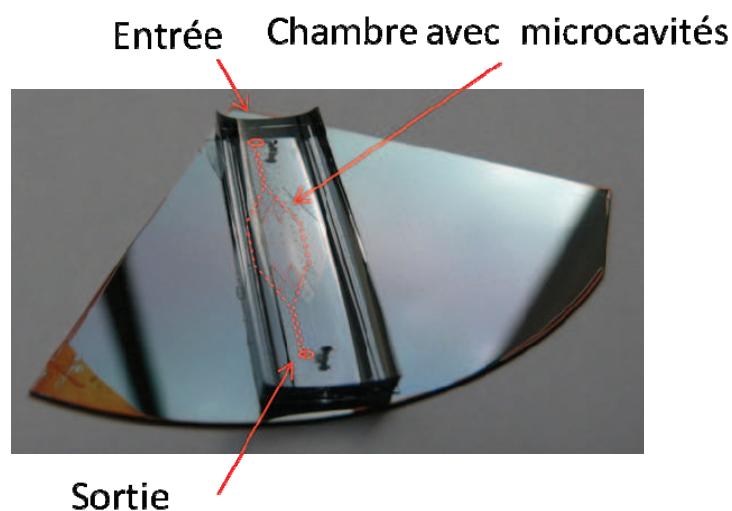


**Figure 1** : Principe de la détection des métaux lourds par fluorescence en circuit microfluidique

Une première sonde à base Calixarène (Calix-Dans4) a été synthétisée pour la détection des ions  $Pb^{2+}$  et a été incorporée dans un circuit microfluidique (Figure 1).<sup>18</sup> Une limite de

détection de 5  $\mu\text{g/L}$  a été obtenue, cette valeur est inférieure aux normes imposées par l'Union Européenne (7,2  $\mu\text{g/L}$  prévu en 2015). Afin d'améliorer les performances du système, nous nous sommes intéressés à la conception d'une nouvelle sonde pouvant être greffée à la surface du microsystème. Une première partie du travail a consisté d'abord à synthétiser le calixarène substitué par trois fluorophores du type dansyle amide et d'un groupement fonctionnel du type hydroxy (CalixDANS-3-OH) qui peut être greffé sur les parois du circuit. La complexation du plomb par cette sonde est ensuite étudiée en milieu partiellement aqueux. Pour finir, ce composé est greffé sur les parois du circuit microfluidique. La sensibilité ainsi que la sélectivité sont également étudiées en conditions microfluidiques.

**La détection par microcavités laser :** Notre deuxième approche est basée sur des microcavités laser organiques. Les microcavités présentent des spectres d'émission laser bien structurés.<sup>19</sup> Ces spectres sont très sensibles à la variation d'indice du milieu. Ce phénomène physique peut être utilisé pour réaliser un nouveau type de capteur basé sur le déplacement même minime des raies d'émission de ce laser suite à la fixation de l'analyte à doser dans la matrice de la microcavité. En insérant dans un canal microfluidique un microlaser organique réalisé avec une matrice nanoporeuse (Figure 2), il devrait être possible, en mesurant le décalage des bandes d'émission laser de détecter la présence de traces de métaux lourds dans l'eau. Une première partie du travail a consisté à synthétiser des ligands spécifiques pour la détection du plomb et du mercure. Après un choix judicieux de la matrice poreuse adaptée à la détection des métaux lourds en milieu aqueux, les ligands sont greffés sur celle-ci. L'étape suivante a consisté à étudier la stabilité du colorant laser (DCM, DCM-OH, rhodamine, pyrrométhène) dans la matrice poreuse. La dernière étape consiste à incorporer la microcavité laser préparée par lithographie à partir du polymère dopé du colorant laser, et fonctionnalisée par le ligand spécifique dans le circuit microfluidique. La sensibilité ainsi que la sélectivité du système seront étudiées.



**Figure 2 :** Microcavités incorporées dans le circuit microfluidique pour la détection par microlaser.

## Références Bibliographiques

- 1 M.D. Taylor "Accumulation of cadmium derived from fertilisers in New Zealand soils. *Sci*", Sci. Total Environ. **1997** (208), 123-126.
- 2 D. Wallach; G. Tilles "Histoire du traitement de la syphilis par le mercure : 5 siècles d'incertitudes et de toxicité » Rev. hist. pharm. **1996**, (84), 347-351.
- 3 S.D. Richardson; T.A. Ternes, "Water Analysis : Emerging Contaminants and Current Issues", Anal. Chem. **2005** (77), 3807-3838.
- 4 M.P. Waalkes "Cadmium carcinogenesis in review", J. Inorg. Biochem. **2000** (79), 241-244.
- 5 WHO (World Health Organization) IPCS. "Guidelines for Drinking-water Quality", Geneva: <http://www.inchem.org> **2004**.
- 6 Directive 2008/105/CE du parlement européens et du Conseil du 16 Décembre 2008, "Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants", Journal Officiel de l'union Européenne L 348/92, **2008**.
- 7 J.-L. Godet, D. Marchand; D. Tricard. "Direction Générale de la Santé. Qualité des eaux d'alimentation 1993-1994-1995", **1998**, Paris.
- 8 H. Karami; M.F. Mousavi, M. Shamsipur "Flow injection potentiometry by a new coated graphite ion-selective electrode for the determination of  $Pb^{2+}$ ", Talanta **2003** (60), 775-786.
- 9 F. Ubillús, R. Barberá, R. Farré, M.J. Lagarda, A. Alegria "Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry." Food Chem. **2000** (71), 529-533.
- 10 B. Valeur. "Molecular Fluorescence. Principles and Applications", **2002** Wiley-VCH: Weinheim.
- 11 "Analyse portable des métaux lourds" [www.sens-innov.com](http://www.sens-innov.com)
- 12 J. Zhou, K. Ren, Y. Zheng, J. Su, Y. Zhao, D. Ryan, H. Wu, "Fabrication of a microfluidic Ag/AgCl reference electrode and its application for portable and disposable electrochemical microchips." Electrophoresis **2010** (31), 3083-3089.
- 13 R.D. Hancock, A.E. Martell "Ligand Design for Selective Complexation of Metal-Ions in Aqueous-Solution." Chem. Rev. **1989** (89), 1875-1914.
- 14 E.M. Nolan, S.J. Lippard "Tools and Tactics for the Optical Detection of Mercuric Ion." Chem. Rev. **2008** (108), 3443-3480.
- 15 B. Valeur, I. Leray "Ion-responsive supramolecular fluorescent systems based on multichromophoric calixarenes: A review." Inorg. Chim. Acta **2007** (360), 765-774.
- 16 E. Destandau; J.-P. Lefevre, A.C.F Eddine, S. Desportes, M.C Jullien, R. Hierle, I. Leray, B. Valeur, J.A. Delaire "A novel microfluidic flow-injection analysis device with fluorescence detection for cation sensing. Application to potassium", Anal. Bioanal. Chem. **2007** (387), 2627-2632.
- 17 <http://www.ifn.cnr.it/microfluid/index.html>

- 18 L. Zhao, T. Wu, J.-P. Lefèvre, I. Leray, J.A. Delaire, "*Fluorimetric lead detection in a microfluidic device*" Lab Chip **2009** (9), 2818–2823.
- 19 M. Lebental; J.S. Lauret; J. Zyss; C. Schmit; E. Bogomolny, "*Directional emission of stadium-shaped microlasers*", Phys. Rev. A **2007** (75), 033806.





**Chapitre I : Détection du plomb,  
du mercure et du cadmium**



# Chapitre I : Détection du plomb, du mercure et du cadmium

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Sommaire.....   | 7  |
| I. Cations toxiques .....   | 9  |
| I.1. Toxicité des métaux lourds : Hg <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> et Cd <sup>2+</sup> ..... | 9  |
| I.1.a. Le mercure .....   | 9  |
| I.1.b. Le plomb .....   | 10 |
| I.1.c. Le cadmium .....   | 12 |
| I.2. Spéciation du plomb, du mercure et du cadmium en fonction du pH.....                       | 13 |
| I.2.a. Spéciation du plomb .....  | 13 |
| I.2.b. Spéciation du mercure .....  | 13 |
| I.2.c. Spéciation du cadmium .....  | 14 |
| I.3. Valeurs officielles dans l'eau.....  | 15 |
| I.4. Les méthodes de détection des métaux lourds .....  | 16 |
| I.4.a. Voltampérométrie .....   | 16 |
| I.4.b. Potentiométrie.....  | 17 |
| I.4.c. Chromatographie ionique .....  | 18 |
| I.4.d. Spectroscopie de masse (ICP-MS) .....  | 18 |
| I.4.e. Spectrométries d'absorption et d'émission atomiques .....                                | 19 |
| I.4.f. Détection par fluorescence .....   | 20 |
| I.5. La détection des métaux lourds par fluorescence en microfluidique.....                     | 21 |
| II. Les sondes fluorescentes .....  | 24 |
| II.1. Principe de la fluorescence .....   | 24 |
| II.2. Les fluoroionophores .....  | 27 |
| II.2.a. Les entités complexantes : l'ionophore .....  | 28 |
| II.2.b. Les entités fluorescentes : fluorophores .....  | 30 |
| II.3. Les phénomènes photoinduits.....  | 31 |
| II.3.a. Transfert d'électron photoinduit.....   | 31 |
| II.3.b. Transfert de charge photoinduit.....  | 33 |
| II.3.c. Transfert d'énergie d'excitation .....  | 35 |
| II.3.d. Formation ou disparition d'excimères.....   | 36 |



---

|   |    |
|---|----|
| II.4. Les fluoroionophores pour la détection des métaux lourds : $Pb^{2+}$ , $Hg^{2+}$ et $Cd^{2+}$ ..... | 37 |
| II.4.a. Classification de Pearson.....  | 38 |
| II.4.b. Fluoroionophores pour la détection du Plomb .....   | 39 |
| II.4.c. Fluoroionophores pour la détection du mercure.....  | 41 |
| II.4.d. Fluoroionophores pour la détection du cadmium.....  | 44 |
| Conclusion.....   | 48 |
| Références Bibliographiques .....   | 50 |

# I. Cations toxiques

## I.1. Toxicité des métaux lourds : $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ et $\text{Cd}^{2+}$

Le plomb, le cadmium et le mercure sont classés parmi les métaux lourds toxiques. Certaines publications anciennes parlent de «métaux pesants», en raison d'une masse volumique importante : un litre de mercure par exemple pèse 13,6 kg. La notion de « métaux lourds » est apparue lorsque les premiers biologistes ont cherché à caractériser les protéines qui contenaient du soufre. Les sels de plomb, de mercure et de cadmium, solubles dans l'eau, ajoutés à une solution aqueuse de protéine conduisent à la formation de précipités volumineux et très denses dus à une combinaison solide entre les fonctions soufrées de ces protéines et ces ions métalliques. Ces trois éléments présentent deux autres caractéristiques très importantes vis-à-vis des organismes vivants : ils sont considérés comme très toxiques et ont la capacité de s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

### *I.1.a. Le mercure*

**Provenance :** Les rejets de mercure dans la nature proviennent des sources naturelles (les volcans, l'évaporation du sol et des surfaces d'eau, la dégradation de minéraux et les feux de forêts), à partir des impuretés de mercure contenues dans les matières premières telles que les combustibles fossiles. Le mercure est notamment extrait du cinabre (sulfure de mercure). Il existe différentes mines à travers le monde, notamment une en Espagne (mine d'Almaden). Ses capacités à s'associer à d'autres métaux ont été mises à profit pour l'extraction de l'or et de l'argent.<sup>1</sup> Au XIX<sup>ème</sup> siècle, le mercure a été utilisé en tannerie, dans les amalgames dentaires pour le traitement des caries et en médecine pour traiter la syphilis. Comme le cadmium, le mercure est aujourd'hui utilisé pour ses propriétés physico-chimiques : c'est un excellent conducteur d'électricité. Il est utilisé dans le procédé chlore-soude (électrolyse du chlorure de sodium pour la production du chlore), il entre dans la fabrication des thermomètres jusqu'à récemment. Actuellement, il entre dans la production des lampes fluorescentes et dans la production des batteries pour l'automobile.<sup>2</sup>

**Les caractéristiques du mercure :** Le mercure est le seul métal liquide à température ambiante. Il se divise par agitation en fines gouttelettes. C'est aussi le seul métal dont la température d'ébullition est inférieure à 650 °C (357 °C) ; il se caractérise par une forte volatilité, mais aussi par sa facilité à se combiner avec d'autres molécules, que ce soient des métaux (sous forme d'amalgames), des molécules inorganiques (sous forme de sels) ou organiques.<sup>3</sup> La toxicité du mercure vient de cette forte volatilité (puisque'il peut être facilement inhalé), de sa relative solubilité dans l'eau et dans les graisses (il peut être facilement transporté dans le corps).

**Toxicité et réglementation :** Le mercure est à l'origine de maladies professionnelles. Il a longtemps été utilisé dans l'industrie du feutre et a constitué un élément entrant dans la fabrication

des piles, des thermomètres, des lampes fluorescentes et des amorces de cartouches foraines. Ces activités ont généré des maladies professionnelles aisément identifiables. L'intoxication par le mercure appelée l'hydrargie ou hydrargyrisme, conduit à des lésions des centres nerveux se traduisant par des tremblements, des difficultés d'élocution et des troubles psychiques.<sup>2</sup> Une intoxication mortelle d'origine professionnelle a encore été rapportée en 1997. Elle concerne une chimiste américaine qui étudiait les interactions entre des métaux lourds et les protéines. Au cours d'une manipulation, elle a laissé tomber quelques gouttes de diméthyle mercure sur ses gants en latex. Le diméthyle mercure a traversé les gants et a atteint le flux sanguin à travers la peau. Trois mois plus tard, les premiers symptômes sont apparus (nausée, vomissements, *etc...*) conduisant quelques semaines plus tard à la mort. En dehors du milieu professionnel, on peut avoir une intoxication au mercure comme ce fut le cas au Japon. Dans les années 50, une épidémie mystérieuse s'est déclenchée dans la baie de Minamata (au sud du Japon). Les troubles affectaient plus particulièrement les familles de pêcheurs (malformation de nouveau-nés, dysfonctionnement du système nerveux) et les animaux domestiques (chats atteints de convulsions se jetant dans la mer du haut des falaises), tous deux gros consommateurs de poissons. Les analyses ont montré qu'une usine de produits chimiques utilisait le mercure comme catalyseur et le rejetait en mer après usage. Chez l'homme, l'apport de mercure par l'alimentation est majoritairement (au moins 90 %) sous forme de cation méthyle mercurique ( $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ ), fourni pour l'essentiel par la consommation de poissons ou crustacés. Dans ces conditions, il paraît raisonnable de limiter notre consommation de poissons de mer à un repas par semaine (une portion de poisson de 185 g apporte en moyenne 1,3 mg de mercure organique).

La concentration normale de mercure dans l'urine est de 5  $\mu\text{g/g}$  de créatinine chez un sujet sans amalgame. Elle augmente de 1  $\mu\text{g/g}$  par surface d'obturation d'une dent cariée traitée à l'amalgame dentaire. Les risques de toxicité apparaissent à 50  $\mu\text{g/g}$ . La concentration du mercure dans le sang est en général inférieure à 5  $\mu\text{g/litre}$ . Les risques commenceraient à partir de 10 ou 20  $\mu\text{g/litre}$ . L'apport alimentaire journalier de 1  $\mu\text{g}$  de méthyle mercure correspond à une variation de mercurémie de 1  $\mu\text{g/litre}$ . La dose hebdomadaire tolérable est de 200  $\mu\text{g}$  de méthyle mercure<sup>4</sup> (soit 0,5  $\mu\text{g/kg/jour}$ ).

### *1.1.b. Le plomb*

**Provenance :** Le plomb est issu d'un minerai, la galène. L'utilisation du plomb est directement liée à la métallurgie. Le plomb était utilisé pour la production de monnaies, de canalisations, de vaisselle, *etc...* La révolution industrielle a entraîné de nouvelles utilisations massives pendant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle : le plomb a été utilisé dans l'industrie (matière active des accumulateurs, tubes de télévision), dans l'imprimerie et dans la fabrication de peintures anticorrosion. Dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles ; le plomb est ajouté à l'essence comme antidétonant. De nos jours, le

plomb est encore présent dans les vieilles canalisations d'eau, dans les vieilles peintures, mais aussi sur les sites industriels pollués.

**Les caractéristiques du plomb :** Le plomb peut se présenter sous de nombreuses espèces chimiques, soit minérale comme le plomb élémentaire ( $Pb^0$ ) soit sous forme ionisée cationique, l'espèce la plus courante étant le cation divalent ( $Pb^{2+}$ ). D'autres états d'oxydation moins fréquents peuvent se rencontrer dans divers composés, en particulier le cation trivalent ( $Pb^{3+}$ ) et le cation tétravalent ( $Pb^{4+}$ ). Beaucoup de composés organométalliques du plomb dérivent du cation tétravalent comme le plomb tétraméthyle et le plomb tétraéthyle, utilisés autrefois comme antidétonants dans l'essence automobile. Ces composés liquides sont extrêmement volatils et peuvent pénétrer facilement<sup>3</sup> dans l'organisme par la voie respiratoire mais aussi par la peau.

**Toxicité et réglementation :** Pour le plomb, les données sont beaucoup moins précises concernant ses espèces chimiques absorbées avec la nourriture. Néanmoins, il semble que l'apport majoritaire de plomb s'effectue sous forme de cation divalent ( $Pb^{2+}$ ). Une petite quantité en provenance des aliments riches en lipides (poissons gras...) serait sous forme de composés organoplombiques. En France, l'apport alimentaire en plomb se répartit entre les boissons (plus de 30 %), les légumes et les fruits (22 %), les céréales (14 %) et les autres aliments comme les viandes, les poissons et les produits laitiers (15 %). Parmi les aliments qui peuvent être riches en plomb, citons les champignons de Paris (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). L'eau du robinet peut aussi, dans certaines régions constituer un apport important en plomb, surtout pour les bébés pour lesquels on confectionne leur biberon avec l'eau du robinet. Il faut savoir que les nourrissons absorbent huit fois plus de plomb que les adultes en consommant une eau contaminée identique. Le plomb est un toxique cumulatif dont l'intoxication à long terme est le saturnisme. Le plomb agit préférentiellement sur le système nerveux (central et périphérique), le rein et la moelle osseuse.<sup>5,6,7</sup> Son action neurotoxique se traduit par une encéphalopathie convulsivante (maux de tête violents, hallucinations, crises convulsives...) pouvant aboutir à un coma mortel. En cas d'intoxication sévère, on peut observer des troubles neuro-comportementaux et une détérioration intellectuelle. Le système nerveux des enfants est particulièrement exposé à l'action du plomb (consommation de peinture à base de céruse dans les bâtiments anciens). On peut aussi observer une atteinte vasculaire provoquée par une hypertension artérielle. L'atteinte de la moelle osseuse et du sang entraîne une diminution du nombre de globules rouges, ceci peut conduire à une anémie chez l'homme. Le plomb est toxique pour les testicules ; il peut entraîner une diminution du taux de spermatozoïdes. Chez la femme enceinte, le plomb traverse facilement la barrière placentaire et va s'accumuler dans les os du fœtus, mais ne semble pas tératogène. Des études récentes chez les rats, ont mis en évidence une activité cancérogène du plomb, en particulier au niveau des reins.

L'individu a couramment 50  $\mu\text{g}$  de plomb par gramme de créatinine dans l'urine et dans le sang. Les premiers effets de la toxicité du plomb commenceraient à 100  $\mu\text{g}$  de plomb par litre de sang chez l'enfant et 150  $\mu\text{g}$  de plomb par litre de sang chez l'adulte. La dose hebdomadaire

tolérable a été fixée à 25 µg de plomb par kilo de poids corporel. Cette dose correspond à un apport alimentaire de 250 mg/jour et une plombémie (taux de plomb dans le sang) de 10 µg/litre.

### *1.1.c. Le cadmium*

**Provenance :** Le cadmium est un élément naturel, présent dans certains minerais sous forme d'impuretés lors de l'élaboration du zinc, du plomb et du cuivre. Ce métal était inconnu jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, jusqu'à ce que ses caractéristiques physico-chimiques soient mises en évidence et utilisées notamment dans les piles. Le cadmium a été abondamment utilisé pour protéger l'acier contre la corrosion (cadmiage), ou comme stabilisant pour les plastiques et les pigments. Le cadmium est utilisé pour la commande des réacteurs nucléaires, mais aussi pour le blindage des appareils de mesure. Les sels de cadmium sont utilisés dans le domaine de la photographie et de la fabrication des feux d'artifices. Les oxydes de cadmium sont utilisés dans l'industrie chimique, dans les accumulateurs électriques et comme stabilisant pour les matières plastiques.

**Les caractéristiques du cadmium :** La spéciation du cadmium est plus simple que celle du mercure et du plomb car il ne possède qu'une seule forme ionique : le cation divalent Cd<sup>2+</sup>. Le cadmium à l'état élémentaire n'est pas toxique pour les organismes vivants. Mais à l'état ionisé,<sup>8</sup> le cadmium peut pénétrer dans l'organisme par les voies respiratoires, notamment au niveau de la cavité nasale ainsi que dans le tractus pulmonaire (bronches, alvéoles pulmonaires).

**Toxicité et réglementation :** Les divers sels du cadmium présentent des effets toxiques variables selon leur solubilité, qui se corrént avec leur facilité d'assimilation par l'organisme. Ainsi, le chlorure de cadmium, soluble, apparaît plus toxique que le sulfure de cadmium très insoluble. Les principales causes d'exposition au cadmium sont l'alimentation et le tabagisme. L'essentiel du cadmium ingéré provient de végétaux à feuillage vert (salades, choux, épinards, etc...) et dans une moindre mesure des céréales. L'accumulation du cadmium s'effectue principalement dans les reins, cet organe constitue l'organe « cible ». Plusieurs enquêtes épidémiologiques en milieu professionnel révèlent des indications d'un possible excès de cancers du poumon.<sup>9,10</sup> Cependant, la communauté européenne a décidé de classer le sulfate et l'oxyde de cadmium comme cancérogènes « probables » par inhalation pour l'homme et le sulfure de cadmium comme cancérogène « possible » pour l'homme.

La concentration de cadmium dans l'urine est inférieure à 2 µg/g de créatinine. Le risque de toxicité rénale apparaît à partir de 4 µg/g. La concentration normale de cadmium dans le sang est de 5 µg/litre. Cette valeur doit être surveillée. La dose hebdomadaire tolérable est de 7 µg/kg/semaine.

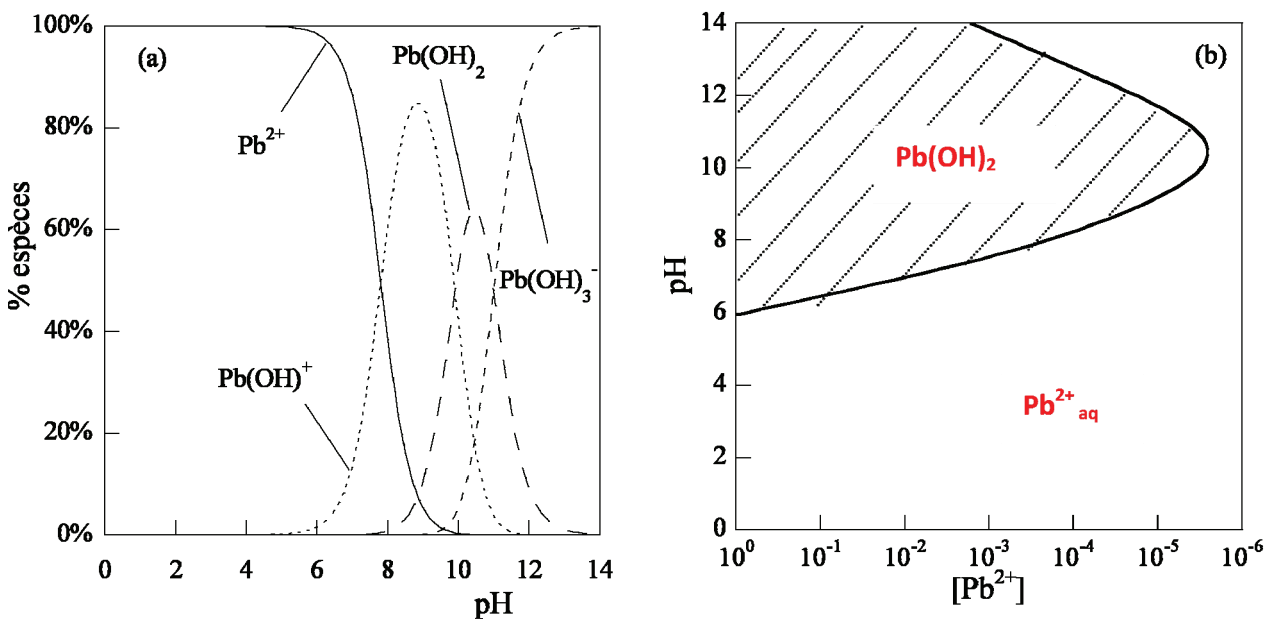
On observe que les indicateurs varient selon les métaux, rendant les appréciations particulièrement complexes.

## I.2. Spéciation du plomb, du mercure et du cadmium en fonction du pH

### I.2.a. Spéciation du plomb

Le plomb comme la plupart des métaux lourds est très utilisé dans l'industrie. Les rejets industriels peuvent atteindre la nappe phréatique, ce qui contamine l'eau de consommation. Durant ces 25 dernières années, plusieurs études ont été menées<sup>11,12,13</sup> pour spécifier le plomb afin de pouvoir le quantifier dans le sol et l'eau de boisson.

Selon la valeur du pH ou de la concentration en plomb dans le milieu, il peut y avoir la formation des complexes suivants :  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_3^-$ . Les diagrammes de la Figure I-1 ci-dessous décrivent les domaines de prédominance et précipitation des différentes formes du plomb en fonction du pH. Pour une concentration de plomb de  $10^{-5}$  M, celui-ci est sous sa forme libre  $\text{Pb}^{2+}$  jusqu'à  $\text{pH} = 6$ . A partir de cette valeur, les formes hydroxylées du plomb commencent à apparaître. Pour un  $\text{pH} > 8$ , le plomb commence à précipiter à partir d'une concentration  $C > 3 \times 10^{-6}$  M.



**Figure I-1** : Diagramme de prédominance (figure a) du plomb à  $C = 10^{-5}$  M en fonction du pH, et de précipitation (figure b) du plomb en fonction de la concentration dans l'eau.

### I.2.b. Spéciation du mercure

Le mercure en solution aqueuse peut exister sous plusieurs formes hydroxylées ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ) en fonction du pH du milieu. La Figure I-2-a ci-dessous permet de tirer quelques informations sur le comportement chimique du mercure à une concentration de  $10^{-5}$  M en milieu aqueux. Le mercure est majoritairement présent en milieu aqueux au degré d'oxydation (II). Il faut également signaler que celui-ci se présente aisément sous ses formes hydroxylées à

partir d'un  $\text{pH} > 2$ . Le mercure précipite à partir d'un  $\text{pH} = 4$  pour une concentration supérieure à  $10^{-4} \text{ M}$  (Figure I-2-b) alors que le plomb précipite à  $\text{pH} = 8$  pour une concentration  $C_{\text{Pb}} > 3 \times 10^{-6} \text{ M}$ . A partir des ces informations, pour éviter toute réprécipitation du mercure, il est préférable de travailler à  $\text{pH} \leq 4$  et à une concentration de mercure  $C_{\text{Hg}} \leq 10^{-4} \text{ M}$ .

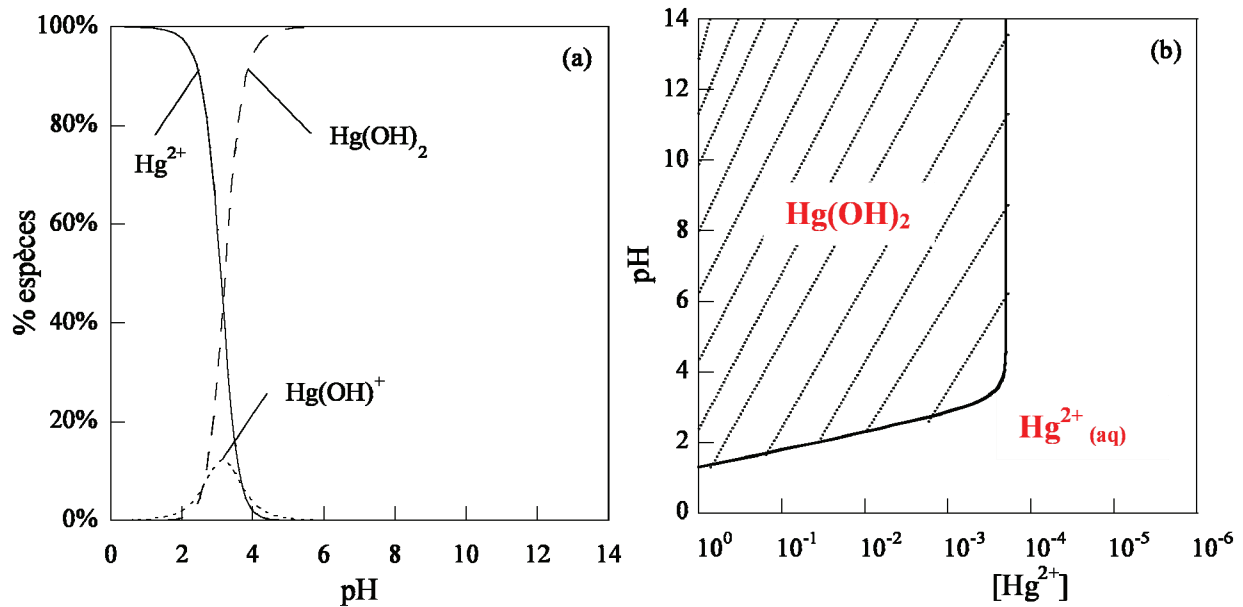


Figure I-2 : Diagramme de prédominance (a) du mercure à  $C = 10^{-5} \text{ M}$  en fonction du pH, et de précipitation (b) en fonction de la concentration dans l'eau.

### I.2.c. Spéciation du cadmium

Comme tous les cations métalliques, le comportement du cadmium en milieu aqueux est fortement lié au pH du milieu. Pour un  $\text{pH} < 6$ , le cadmium est très soluble. Dans des conditions acides, la solubilité du cadmium augmente à faibles concentrations avec un produit de solubilité de  $K_S (\text{Cd(OH)}_2) = 4,5 \cdot 10^{-15}$ . La spéciation du cadmium en milieu aqueux est gouvernée par les espèces présentes dans le milieu ; il peut précipiter avec un ion carbonate ( $\text{CdCO}_3$ )<sub>s</sub> ou sulfate ( $\text{CdSO}_4$ )<sub>s</sub>. A un  $\text{pH} > 5,5$  (Figure I-3), le cadmium peut précipiter avec les ions hydroxydes pour donner le précipité  $\text{Cd(OH)}_2$ . La figure ci-dessous décrit le comportement chimique du cadmium en milieu aqueux en fonction du pH.

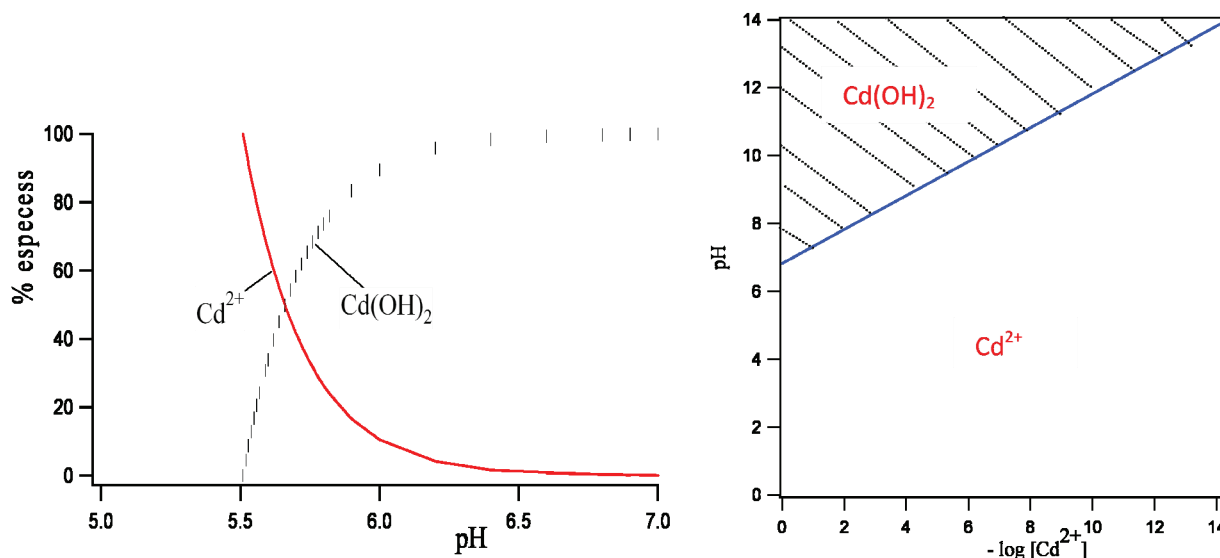


Figure I-3 : Diagramme de précipitation du cadmium en fonction du cadmium.

### I.3. Valeurs officielles dans l'eau

Quelles sont les doses susceptibles de provoquer des troubles neurologiques chez l'adulte ? Il n'existe pas de réponse claire à cette question. La seule certitude est qu'il n'est connu, à ce jour, aucun rôle biologique utile à l'homme pour aucun des trois métaux. Vu les effets irréversibles de ces métaux dans l'organisme, une limitation de la quantité maximale admissible est nécessaire. A l'exception du plomb, qui est le métal le plus étudié en raison des plombémies et également le mercure dans les amalgames dentaires, il n'y a pas consensus sur les doses à risques. Afin de contrôler la qualité de l'eau, deux types de valeurs sont à distinguer : les valeurs-guides émises par l'O.M.S.<sup>14</sup> et les normes réglementaires en vigueur dans l'Union Européenne<sup>15</sup> et par conséquent en France<sup>16</sup> (Tableau I-1). Les valeurs-guides de l'O.M.S diffèrent parfois des valeurs fixées par l'Union Européenne. Ceci s'explique par le fait que les C.M.A (concentrations maximales admissibles) européennes ne sont pas forcément des normes de santé publique, contrairement aux valeurs-guides de l'O.M.S. qui sont toujours élaborées sur la base de considérations sanitaires.<sup>17</sup>



| Elément          | Provenance  | Organes cibles  | C.M.A   |
|------------------|---|---|---|
| Pb <sup>2+</sup> | Canalisations et peintures au plomb, pollution automobile, rejets industriels   | Reins, fœtus, foie, squelette, sang, système nerveux central. | 25 µg.L <sup>-1</sup> depuis 2003<br>7,2 µg.L <sup>-1</sup> pour 2015 |
| Hg <sup>2+</sup> | Sources naturelles (volcans, dégazage de l'écorce terrestre), et anthropiques (raffineries, mines, fabrication des batteries, des engrais). | Reins, poumons, squelette système nerveux central.            | 0,05 µg.L <sup>-1</sup>   |
| Cd <sup>2+</sup> | Sources naturelles (volcans, dégazage de l'écorce terrestre), et anthropiques (raffineries, mines, fabrication des batteries, des engrais). | Reins, poumons, squelette, système nerveux central.           | 0,2 µg.L <sup>-1</sup>  |

C.M.A : Concentration maximale admissible dans les eaux d'alimentation fixées par les directives européennes du 16 Déc. 2008.

*Tableau I-1 : Résumé des effets et valeurs officielles sanitaires pour le plomb, le mercure et le cadmium.*

## I.4. Les méthodes de détection des métaux lourds

Comme nous venons de le voir, les réglementations Européenne<sup>15</sup> et Française<sup>16</sup> imposent le respect d'un certain nombre de normes en matière de rejets de métaux lourds. Ainsi, la diminution des valeurs officielles sanitaires et environnementales des concentrations admissibles en plomb, cadmium et mercure s'est accompagnée ces dix dernières années d'une augmentation du nombre d'analyses. Cependant, la quantification de ces éléments traces et ultra-traces, à des concentrations de l'ordre du µg.L<sup>-1</sup> pour les eaux d'alimentation, ou du µg/kg pour les denrées alimentaires, demeure complexe. De plus, la plupart des techniques d'analyse de routine sont des techniques d'analyse élémentaire et ne concernent pas la détermination des espèces chimiques inorganiques et organiques de l'élément (spéciation).

### I.4.a. Voltampérométrie

La voltampérométrie présente de nombreux avantages dans l'identification et l'analyse d'oligo-éléments métalliques. Les recherches propres aux degrés d'oxydation des métaux et à la redissolution des métaux lourds sont impensables sans les méthodes voltampérométriques.<sup>18,19</sup> C'est une méthode de mesure fondée sur l'interprétation d'une courbe intensité/potentiel sur l'électrode à goutte de mercure pendante. La réponse obtenue est un courant dû à l'oxydation ou à la réduction des composés présents dans le milieu ou dans la goutte de mercure. Cette courbe détermine deux grandeurs pour chaque espèce dosée : un potentiel identifiant la nature du métal

lourd et un courant donnant la concentration de métaux lourds. L'électrode à goutte de mercure pendante n'est pas applicable au dosage du mercure : dans ce dernier cas, on peut utiliser une anode en graphite poreux.

**Avantages des méthodes voltampérométriques :** Ces méthodes ne nécessitent qu'une faible quantité d'échantillon. Elles sont très largement utilisées par les chimistes pour des études fondamentales d'oxydoréduction, d'adsorption et de mécanismes de transferts électroniques. Depuis les années soixante, des progrès significatifs ont été réalisés en ce qui concerne la sensibilité et la sélectivité de cette méthode.

**Inconvénient de ces méthodes :** Les microélectrodes sont assez fragiles et nécessitent un maniement attentif. Par ailleurs, les interférences entre les divers ions sont nombreuses, ce qui diminue la sélectivité du dosage. Les microgouttes de mercure sont les plus efficaces, mais celles-ci sont incompatibles avec une utilisation dans l'environnement.

#### *1.4.b. Potentiométrie*

Les méthodes potentiométriques sont fondées sur la mesure d'un potentiel électrochimique d'une solution en l'absence de courant électrique. La concentration en ions est alors obtenue en fonction du potentiel mesuré à une électrode à membrane spécifique de chaque ion. L'équipement nécessaire à la mise en place de ces méthodes est simple, mais requiert une électrode de référence, une électrode de mesure et un système de mesure des potentiels électrochimiques. Le potentiel de l'électrode de référence doit être connu et ne doit pas dépendre de la composition de la solution. Il doit aussi rester constant. Les électrodes de référence idéales doivent être réversibles, obéir à l'équation de Nernst, donner un potentiel constant au cours du temps et revenir au potentiel d'origine après avoir été utilisées. Mais de telles électrodes sont difficiles à obtenir, les électrodes les plus utilisées sont les électrodes au calomel ou au chlorure d'argent. Les électrodes de mesure utilisées pour l'analyse des métaux lourds sont des électrodes à membrane liquide ou plastique.<sup>20</sup>

**Avantages des méthodes potentiométriques :** Les méthodes potentiométriques ont de nombreux avantages : elles sont simples donc peu coûteuses. De plus, les appareils de mesure utilisant de telles méthodes sont en général portables.<sup>21</sup> Ces méthodes sont également rapides et peuvent donc être utilisées pour des mesures en ligne : une mesure demande en général quelques minutes pour être réalisée.

**Inconvénients des méthodes potentiométriques :** L'utilisation d'électrodes nécessite la réalisation d'un étalonnage. Il faut donc utiliser des solutions de concentrations connues. De plus, pour détecter la présence d'un métal lourd, il faut utiliser une électrode spécifique à chaque ion. Il faut donc connaître au préalable quels sont les ions susceptibles d'être présents dans la solution. Il y a aussi un problème de spéciation : les méthodes potentiométriques ne permettent de doser que les métaux sous forme d'ions. Enfin, les performances de cette technique sont parfois limitées par des interférences ; comme pour la voltampérométrie. Celles-ci peuvent être provoquées par des

variations de pH ou de température par exemple, mais ces interférences sont en général peu importantes.

#### *1.4.c. Chromatographie ionique*

Cette technique, découverte par trois scientifiques américains (Small, Stevens et Bauman), est apparue en 1975. Aujourd'hui, cette désignation regroupe toutes les méthodes de dosage d'ions par chromatographie en phase liquide,<sup>22</sup> et ce quel que soit le mode de séparation et de détection. En fonction de la séparation envisagée, il existe différentes résines :

- *La résine échangeuse de cations*, le plus souvent constituée d'un polymère organique ayant des sites benzéniques sur lesquels sont greffés des groupements fonctionnels d'acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>).

- *La résine chélatrice échangeuse de cations* : Cette résine est souvent à base de polymère poreux de types poly(méthacrylate), poly(styrène-divinylbenzène) ou de silice fonctionnalisée. Ce type de résine permet d'obtenir une très bonne sélectivité pour certains métaux.<sup>23</sup>

Il existe maintenant de nombreux détecteurs à la sortie de la colonne de chromatographie ionique :

- *Le spectrophotomètre UV-visible* qui repose sur la loi de Beer-Lambert reliant l'absorbance à la concentration. Il est possible de faire des mesures directes, indirectes ou par détection d'un complexe coloré.

- *Les détecteurs électrochimiques* qui regroupent les détecteurs ampérométriques, coulométriques et polarographiques. Ces détecteurs sont très sensibles et permettent des mesures dans une gamme très étendue. Par contre, ils sont sensibles au pH, au débit et à l'oxygène dissous.

Les **avantages** de ces méthodes sont leur application à la détection de divers cations, leur fiabilité et leur simplicité d'utilisation.

Par contre, elles ont quelques **inconvénients** : il n'est possible de détecter qu'un nombre limité d'ions avec une configuration de colonne donnée. De plus, la concentration d'ions à doser ne doit être ni excessive (saturation de la résine) ni être trop faible car l'ion pourrait être masqué par d'autres.

#### *1.4.d. Spectroscopie de masse (ICP-MS)*

Durant les deux dernières décennies, à cause des impératifs de rapidité, de sensibilité et de précision, la spectrométrie d'émission par ICP (Inductively Coupled Plasma) est une technique qui s'est progressivement implantée et imposée.<sup>24,25</sup> L'intensité des pics émis par l'échantillon étant proportionnelle à la concentration des éléments qu'il contient, cela permet donc d'en faire une analyse quantitative.

Les **avantages de l'ICP** : A l'heure actuelle, la méthode ICP permet d'analyser des échantillons aussi divers que l'eau, l'huile, le sang, les sols, les métaux, les aliments, les végétaux, les poussières, *etc...* Cette nouvelle méthode présente des atouts majeurs : analyse rapide et éventuellement simultanée permettant avec un seul instrument de réaliser plusieurs milliers de déterminations élémentaires par jour. Elle présente une très grande sensibilité. Pour la majorité des métaux, les limites de détection sont inférieures à 10 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ).<sup>26</sup>

**Inconvénients de l'ICP** : L'atomisation par torche à plasma (ICP) est aujourd'hui une technique qui nécessite un équipement lourd et coûteux (300000-500000 €). De plus, l'utilisation de l'appareil est limitée au laboratoire d'analyses.

#### *I.4.e. Spectrométries d'absorption et d'émission atomiques*

Dans la spectrométrie par absorption atomique (AAS),<sup>27</sup> l'échantillon à analyser est chauffé soit par une flamme (F-AAS), soit dans un four en graphite (GF-AAS) jusqu'à provoquer l'atomisation de l'échantillon. A l'état fondamental, les atomes vaporisés absorbent la lumière émise par une lampe à des longueurs d'onde caractéristiques de l'élément à analyser. L'intensité de la lumière transmise est mesurée par un détecteur et permet de remonter à la concentration du métal initialement présent dans l'échantillon. Une autre méthode, aussi appelée spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique (E-AAS) permet une atomisation optimale, des limites de détection faibles et peut être compatible avec des échantillons solides. Cette technique permet de doser une soixantaine d'éléments à l'état de traces (quelques ppm).<sup>28</sup>

**Avantages** de l'absorption atomique : C'est une méthode très sélective, c'est à dire qu'il n'y a pas d'interférences spectrales ou alors elles sont connues. La technique est simple si on sait préparer les solutions initiales.

**Limites** : Les concentrations doivent être à l'échelle de traces pour rester dans le domaine de Beer-Lambert, l'aspect non qualitatif de la technique impose la connaissance des éléments en solution afin de choisir une source adaptée et enfin les réglages préliminaires se fondent sur des paramètres pas toujours indépendants.

La spectrométrie par émission<sup>29</sup> consiste à mesurer l'intensité du rayonnement émis par un élément à une longueur d'onde caractéristique après atomisation de l'échantillon. Généralement, l'étape d'atomisation est réalisée au sein d'un plasma d'argon ; on parle alors d'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy). L'ICP-AES présente deux avantages majeurs face à l'absorption atomique : Certains éléments peuvent être analysés avec une plus grande sensibilité et avec moins d'interférences chimiques. En effet, c'est l'échantillon lui-même qui est la source de lumière dans la spectrométrie d'émission. Ainsi, plusieurs éléments peuvent être dosés en même temps. On peut donc rapidement gagner en temps et en argent avec cette méthode, même si au départ, un spectromètre d'émission coûte plus cher qu'un spectromètre d'absorption atomique. Toutefois, l'ICP-AAS et l'ICP-AES restent des techniques de laboratoire, non disponibles pour des mesures sur le terrain.

#### *I.4.f. Détection par fluorescence*

La détection des métaux lourds par fluorescence est actuellement peu répandue. Cependant, l'utilisation de senseurs basés sur la fluorescence moléculaire pour la détection de cations toxiques offre également de nombreux avantages<sup>30,31</sup> : une haute sensibilité de détection, une sélectivité et une réponse du système adaptable via un travail d'ingénierie moléculaire,<sup>32</sup> une mesure multi longueurs d'onde pour la détection simultanée de plusieurs analytes et l'autocalibration. La spectroscopie par fluorescence est une technique peu onéreuse. Elle présente un faible investissement financier au niveau de l'appareillage contrairement aux autres méthodes. La fluorescence combinée avec un travail d'ingénierie moléculaire permet aussi d'atteindre des limites de détection de l'ordre du nM en présence d'autres espèces chimiques de manière sélective. A l'inverse des méthodes atomiques et de spectrométrie de masse précédemment décrites, la fluorescence permet de réaliser des systèmes portatifs de type optode<sup>33</sup> (système utilisant une fibre optique pour le transport de l'information lumineuse) permettant la réalisation de mesures directes sur le lieu de prélèvement des échantillons. Cette technique se présente en bonne place pour relever les défis posés par la détection de métaux lourds dans l'environnement : elle est simple, rapide à mettre en œuvre et rallie sélectivité et haute sensibilité tout en permettant des mesures délocalisées avec des appareils portables.

Le tableau ci-dessous est un résumé des différentes méthodes de détection des métaux lourds les plus utilisées.

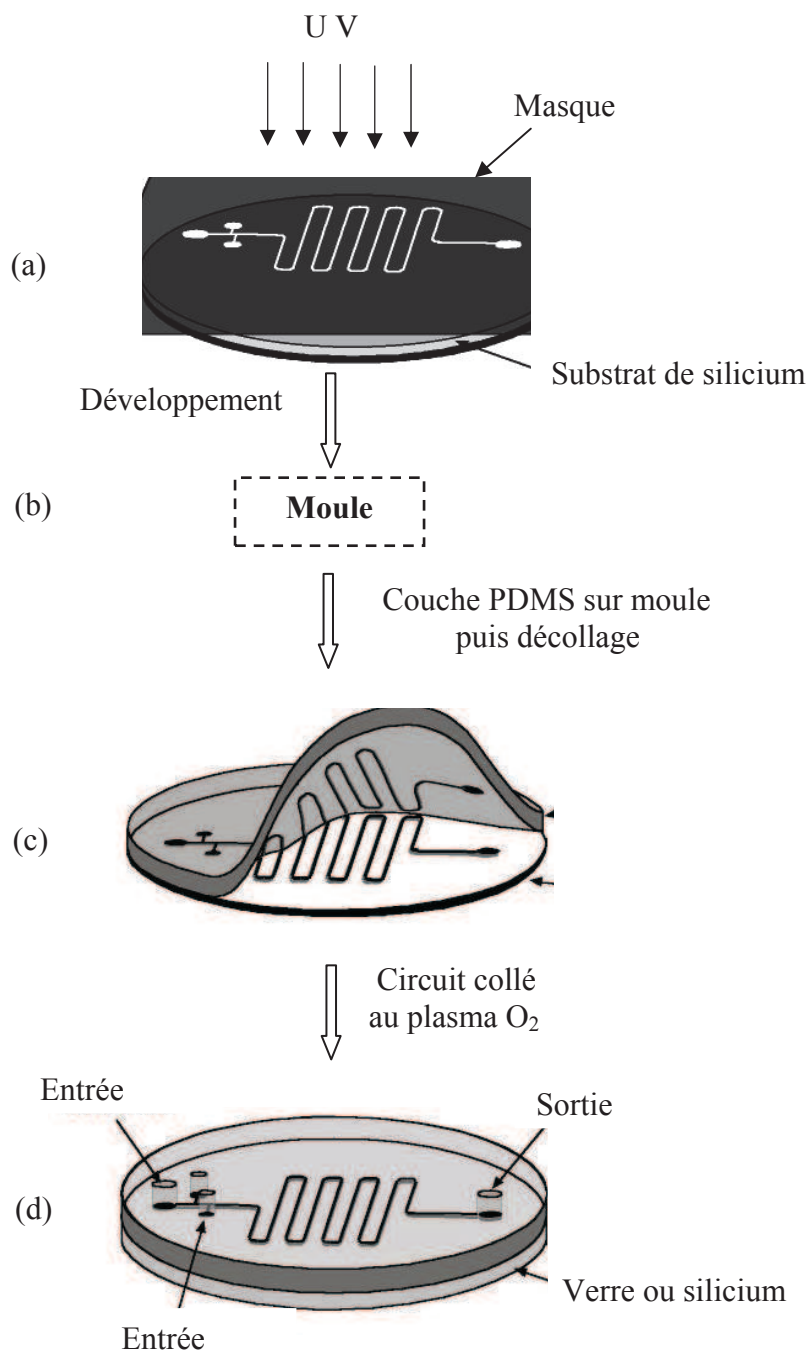
| Méthodes                                      | Avantages  | Limites                                      | Coût       | Portabilité | Détection limite   |
|---|--|--|------------|-------------|--|
| Voltamétrie                                   | Faible quantité d'échantillon                            | Electrodes fragile et adapté à l'ion cherché | 8-11 k€    | oui         | Pb <sup>2+</sup> = 0,3-0,5 µg/L <sup>34,35</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 0,2 µg/L <sup>36</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 0,1-0,2 µg/L <sup>34,35</sup>  |
| Chromatographie                               | Détection simultanée de plusieurs ions, simple et fiable | Risque saturation résine,                    | 18-25 k€   | non         | Pb <sup>2+</sup> = 2-4 ng/L <sup>37,38</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 2-3 ng/L <sup>37</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 1,5-3 ng/L <sup>37</sup>           |
| Potentiométrie                                | Mesures simples et peu coûteuses                         | Nécessité étalonnage, électrode spécifique   | 8-11 k€    | oui         | Pb <sup>2+</sup> = 0,15-10 µg/L <sup>39,40</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 0,05-10 µg/L <sup>41</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 3,5-9,8 µg/L <sup>41</sup> |
| Spectroscopie de masse : ICP-MS               | Rapide, très sensible et précise                         |  | 300-500 k€ | non         | Pb <sup>2+</sup> = 0,3 ng/L <sup>42</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 0,08-0,17 µg/L <sup>43</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 0,2 ng/L <sup>42</sup>          |
| Spectroscopie absorption et émission atomique | Très sélective et simple                                 | Connaitre l'élément à doser                  | 14-18 k€   | non         | Pb <sup>2+</sup> = 3 µg/L <sup>44</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 4,3-5, 1 ng/L <sup>45</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 0,3 µg/L <sup>44</sup>             |
| Spectroscopie par fluorescence                | Grande sensibilité, peu interférence                     | Photostabilité                               | 30-35 k€   | oui         | Pb <sup>2+</sup> = 4 µg/L <sup>46</sup><br>Hg <sup>2+</sup> = 0,75-2 µg/L <sup>47-48</sup><br>Cd <sup>2+</sup> = 0,6-2,1 µg/L <sup>49-50</sup>     |

**Tableau I-2 :** Tableau récapitulatif des caractéristiques des différentes techniques de détection des métaux lourds.

## I.5. La détection des métaux lourds par fluorescence en circuit microfluidique

G. M. Whitesides a défini la microfluidique comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de très petits volume de fluides de l'ordre de 10<sup>-9</sup> litres en utilisant des canaux de quelques dizaines de micromètres ». <sup>51</sup> Comme le témoigne une étude de la production scientifique mondiale, <sup>52</sup> le dynamisme de cette science est principalement lié à quatre thèmes: la chimie analytique, la biodéfense, la biologie moléculaire et la micro-électronique. Dans le but de répondre au risque des armes chimiques et biologiques, le développement de la microfluidique a également été abondamment subventionné par les agences militaires. Les circuits microfluidiques peuvent être fabriqués par ablation laser à partir d'un substrat de verre ou de PMMA, <sup>53</sup> par polymérisation à deux photons des ormosils <sup>54</sup> ou par lithographie. <sup>55</sup> Les techniques de moulage par injection ou à froid de polymères permettent de multiplier les dispositifs très facilement. L'utilisation du polymère poly(diméthylsiloxane) (PDMS) pour la fabrication d'un circuit

microfluidique présente de nombreux avantages : le PDMS est peu coûteux, facile à mettre en œuvre, et par sa biocompatibilité peut être utilisé pour des applications médicales. La fabrication des circuits microfluidiques à partir du PDMS se fait avec les techniques de photolithographie douce. La Figure I-4 ci-dessous décrit les différentes étapes de fabrication d'un circuit microfluidique pour la technologie PDMS / Verre ou PDMS / Silicium. A partir d'une couche de résine photosensible déposée sur un substrat de verre ou de silicium, la structure des canaux du circuit microfluidique est obtenue par un masque au travers duquel on insole la résine époxyde photosensible à la longueur d'onde de 365 nm (Figure I-4-a). Après développement (Figure I-4-b), le moule est prêt à être utilisé. On prépare une solution de PDMS / MAPTMS (10 : 1) agitée 5 mn et dégazée pendant 30 mn. Le MAPTMS (3-(methacryloxy)propyltriméthoxysilane) est utilisé pour faciliter la réticulation du polymère PDMS. Ensuite on coule ce mélange PDMS sur le moule et on fait réticuler le PDMS pendant 2 heures à 75 °C. Le film de PDMS ainsi obtenu est décollé (Figure I-4-c), dimensionné à l'aide d'un scalpel, puis les entrées et sorties du circuit sont obtenues en perçant le PDMS à l'aide d'une aiguille. Le circuit microfluidique ainsi obtenu est collé sur un support de verre après traitement sous un plasma oxygène (Figure I-4-d). Le collage réalisé est de nature chimique : des ponts Si-O-Si sont créés entre le verre et le PDMS.

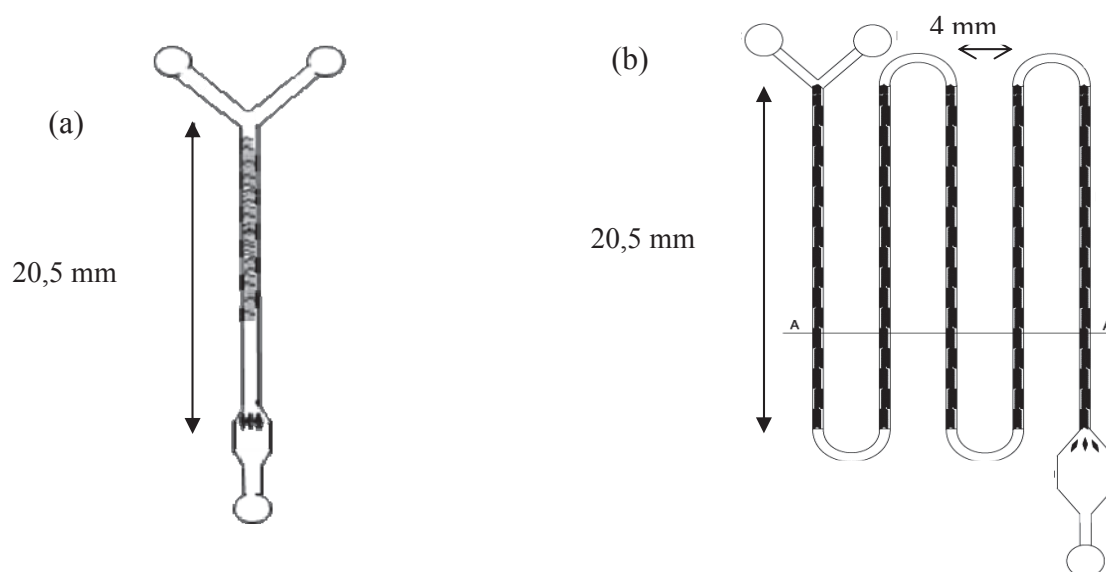


**Figure I-4 :** Principe de fabrication d'un circuit microfluidique à partir d'un substrat de PDMS.

Suivant les applications désirées, il existe différentes formes de circuits microfluidiques ; longs, courts, avec chambre de mélange, *etc...* Pour la détection des métaux lourds, nous avons besoin d'un mélangeur des deux réactifs ; ceci se fait dans le canal microfluidique par un mélangeur passif. Ce mélangeur est constitué de chevrons, la longueur de ce mélangeur est ajustée en fonction de la cinétique de réaction ou analyte / sonde. Dans le cas d'une réaction de complexation, l'efficacité du système peut aussi être obtenue en optimisant la taille ou la forme du circuit microfluidique. La Figure I-5 ci-dessous présente quelques exemples des circuits microfluidiques utilisés pour le dosage des cations toxiques. Le circuit court (Figure I-5-a) a été



utilisé pour la première fois au laboratoire pour la détection du potassium par voie microfluidique<sup>56</sup> ainsi que le circuit (Figure I-5-b) pour la détection du plomb.<sup>57</sup>



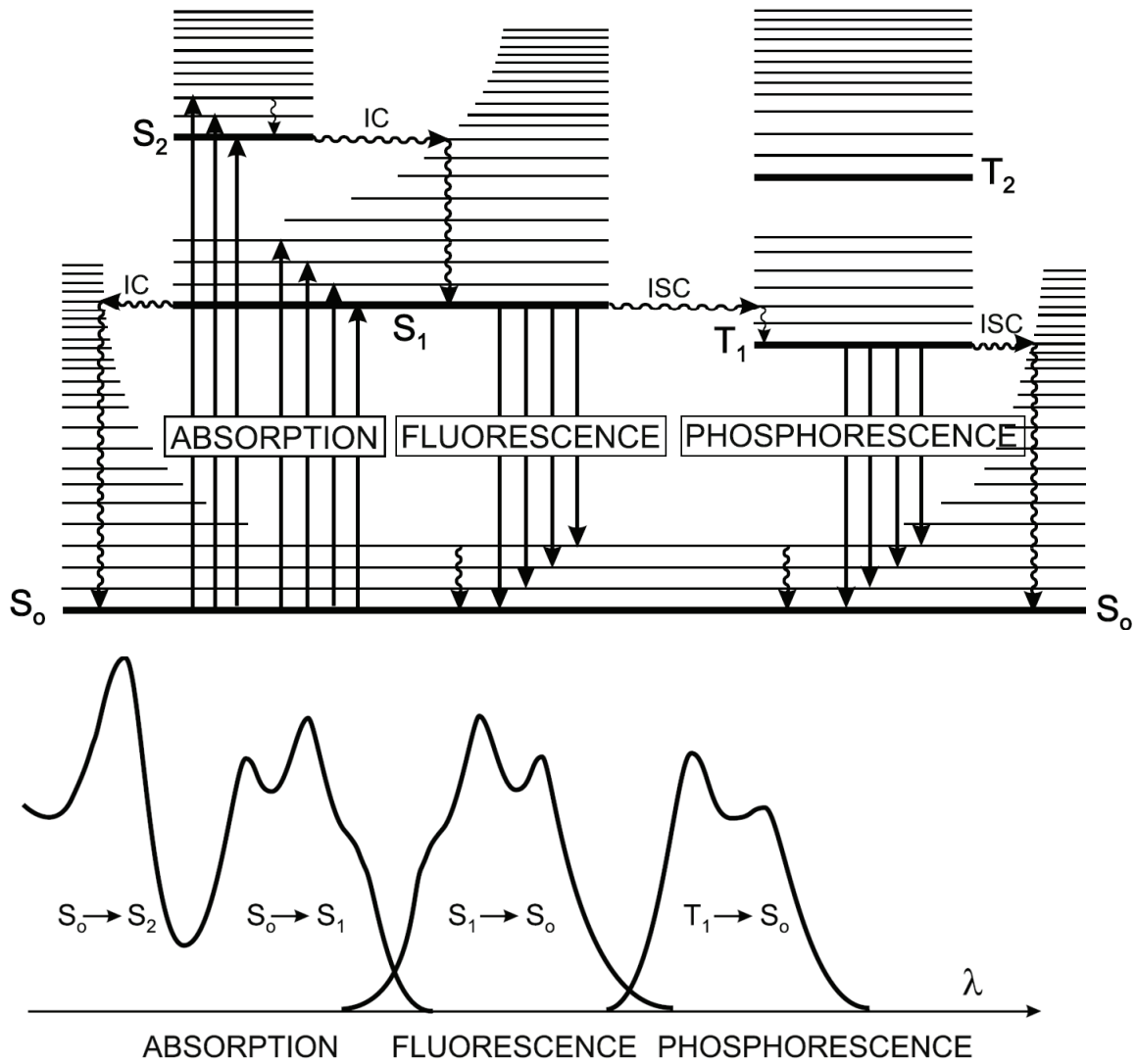
*Figure I-5 : Quelques exemples de circuit microfluidiques utilisés pour la détection des métaux lourds.*

La microfluidique a largement profité des techniques de fabrication développées à l'origine pour la micro-électronique et les microsystèmes. Malgré ces facteurs, cette technique n'est pas encore très présente dans la vie quotidienne, même s'il existe des dispositifs jetables pour un test de grossesse.<sup>58</sup> Donc il existe une réelle demande de conception de dispositifs portables basés sur la microfluidique.

## II. Les sondes fluorescentes

### II.1. Principe de la fluorescence

Le diagramme de Perrin-Jablonski de la Figure I-6 ci-dessous permet de visualiser l'ensemble des phénomènes possibles lors de l'excitation d'une molécule isolée. Les phénomènes observés suite à l'absorption d'un photon sont la relaxation vibrationnelle, la conversion interne, la fluorescence stationnaire, la conversion intersystème et la phosphorescence.



| Temps caractéristiques                               |   |
|--|---|
| Absorption :   | 10 <sup>-15</sup> s                                   |
| Relaxation vibrationnelle :                          | 10 <sup>-12</sup> - 10 <sup>-10</sup> s               |
| Durée de vie l'état singulet excité S <sub>1</sub> : | 10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-7</sup> s → fluorescence |
| Conversion intersystème (ISC) :                      | 10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-8</sup> s                |
| Conversion interne (CI) :                            | 10 <sup>-11</sup> - 10 <sup>-9</sup> s                |
| Durée de vie l'état excité T <sub>1</sub> :          | 10 <sup>-6</sup> - 1s → phosphorescence               |

Figure I-6 : Diagramme de Perrin-Jablonski (issus de la référence)<sup>59</sup>.

**L'absorption** : Le processus d'absorption d'un photon est très rapide (environ 10<sup>-15</sup> s) par rapport aux autres phénomènes. Le principe de Franck-Condon stipule que, pendant ce laps de temps où les électrons sont redistribués, aucun déplacement des noyaux n'est observé. En solution, l'absorption de la lumière se traduit part une décroissance exponentielle du faisceau incident selon la loi de Beer-Lambert suivante :

$$A(\lambda) = \text{Log} \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon(\lambda).l.C \quad \text{éq I-1}$$

Où,

$A(\lambda)$  est l'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$

$I_0$  est l'intensité du faisceau incident

$I_t$  est l'intensité du faisceau transmis

$l$  est le chemin optique

$\varepsilon(\lambda)$  est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda$

$C$  est la concentration en chromophore

**La fluorescence** est un processus de désactivation radiative, en compétition avec les processus de désactivation non radiative. Ces phénomènes de désactivation non radiative se produisent par conversion interne et relaxation vibrationnelle, qui interviennent à partir du premier état excité singulet  $S_1$  ou d'un état excité  $S_n$  supérieur de la molécule ou par conversion inter-système vers l'état triplet  $T_1$ . Les caractéristiques des spectres d'émission ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation sauf si plusieurs espèces sont excitées simultanément. Le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus grandes que celles du spectre d'absorption. Ceci est dû à une perte d'énergie par relaxation vibrationnelle de l'état excité. Si l'écart entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum de fluorescence est appelé déplacement de Stokes. L'intensité de fluorescence est définie comme la quantité de photons émis par unité de temps (s) et par unité de volume, elle peut s'écrire selon l'équation suivante :

$$I_F(t) = k_r^S [M^*] = k_r^S [M_0^*] \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad \text{éq I-2}$$

Où,

$I_F$  est l'intensité de fluorescence

$k_r^S$  est la constante de vitesse pour la  $S_1 \rightarrow S_0$  désexcitation avec l'émission de fluorescence,

$\tau_s$  est la durée de vie de l'état excité  $S_1$ .

$[M^*]$  est la concentration instantanée de la molécule à l'état excité

$[M_0]$  est la concentration instantanée de la molécule à l'état initial

La durée de vie des populations homogènes d'un fluorophore est indépendante de la longueur d'onde d'excitation. La mesure de durée de vie  $\tau_s$  est l'une des caractéristiques les plus importantes d'une molécule fluorescente, car elle définit la fenêtre d'observation des phénomènes dynamiques de la molécule étudiée.

Le rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F$  est défini comme étant la fraction de molécules excitées à l'état  $S_n$  qui retournent à l'état fondamental  $S_0$  avec émission de photons de fluorescence. En d'autres termes, le rendement quantique  $\Phi_F$  est le rapport du nombre de photons émis pendant la durée de la fluorescence sur le nombre de photon absorbés. Expérimentalement, le rendement quantique de fluorescence d'un composé est déterminé par rapport à une référence dont

le rendement quantique  $\Phi_F^{\text{Ref}}$  est connu. Et d'une manière générale, le rendement quantique peut être donné par les équations suivantes.

$$\phi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = k_r^s \tau_s \quad \text{éq I-3} \quad \text{avec} \quad k_{nr}^s = k_{IC} + k_{cis} \quad \text{éq I-4}$$

Où,

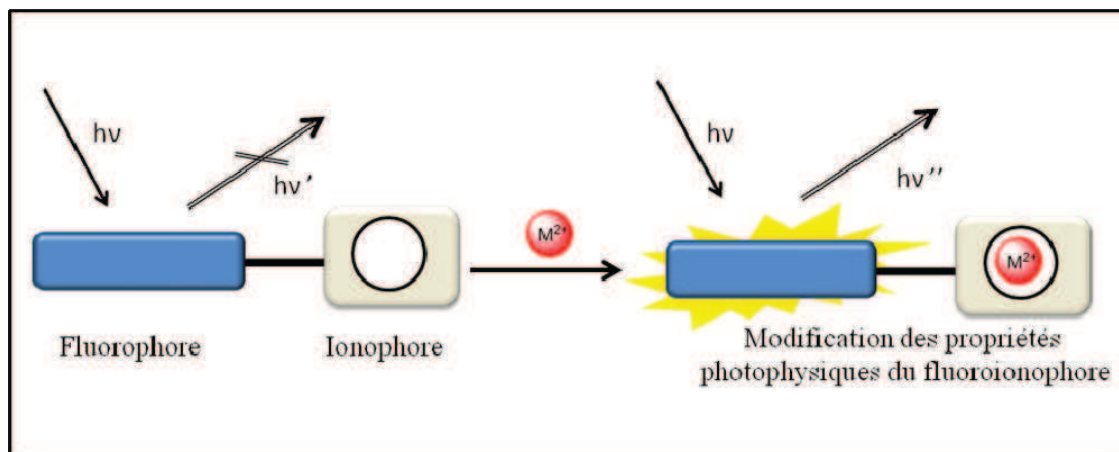
$k_{IC}$  est la constante de vitesse pour la conversion interne  $S_1 \rightarrow S_0$

$k_{cis}$  est la constante de vitesse pour le passage intersystème

$k_{nr}^s$  est la constante de vitesse de déxcitation radiative  $S_1 \rightarrow S_0$  avec émission de fluorescence

## II.2. Les fluoroionophores

La détection des métaux lourds par fluorescence nécessite une approche d'ingénierie moléculaire : la sonde doit être capable de reconnaître spécifiquement le cation et pouvoir transmettre l'information. La sonde fluorescente, appelée également fluoroionophore est constituée de deux entités, une entité complexante appelée l'ionophore et une entité fluorescente appelée fluorophore. Il existe plusieurs types de sondes fluorescentes pour lesquelles la présence d'analytes peut entraîner une extinction ou une exaltation de la fluorescence. Dans certains cas, une variation de l'absorption, de la position des spectres et du rendement quantique de fluorescence est observée. Le fluorophore peut également se coordonner de façon réversible avec certains analytes et peut être lié ou pas à l'entité complexante par un espaceur.<sup>59</sup> En présence d'analyte, une modification des propriétés photophysiques peut être observée au niveau de l'entité fluorescente. Ces effets sont dus à un processus photoinduit qui peut être de quatre natures différentes :<sup>60</sup> le transfert d'électron photoinduit (PET), le transfert de charge photoinduit (PCT), le transfert d'énergie ou la formation d'excimères. Le schéma ci-dessous représente le principe de fonctionnement d'une sonde fluorescente en présence de cation dans le cas où la fluorescence est exaltée par complexation de l'analyte.

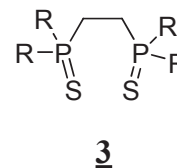
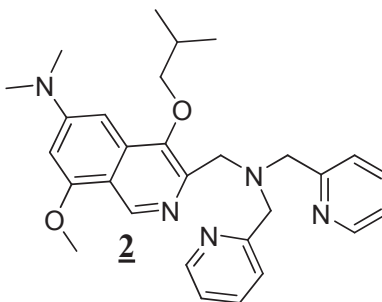
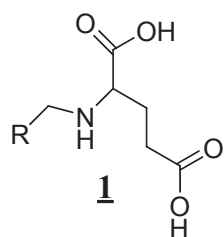


**Figure I-7 :** Principe de reconnaissance du cation et de la détection par fluorescence : d'un fluorionophore.

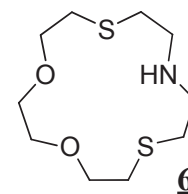
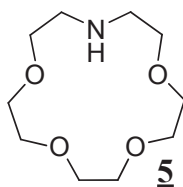
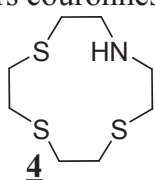
### II.2.a. Les entités complexantes : l'ionophore

L'ionophore est la partie responsable de la complexation du cation. Plusieurs types de ligands sélectifs du plomb, du mercure et du cadmium sont décrits dans la littérature. Le Tableau I-3 ci-dessous présente quelques exemples d'entités complexantes, parmi les plus utilisées, on peut citer les composés du type cryptants<sup>61</sup> (1-3), éthers couronne<sup>62,63</sup> (3-6), chélatants (macrocycliques)<sup>64</sup> (7-9), et récemment des systèmes à base de calixarène<sup>65</sup> (10-12). Le schéma ci-dessous montre quelques exemples d'entités complexantes utilisées pour la détection des métaux lourds.

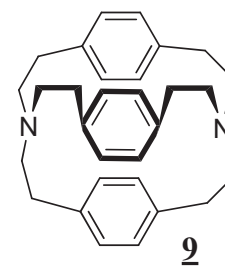
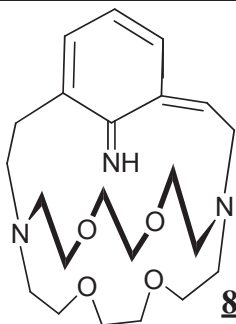
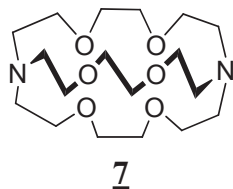
## Ligands cryptands



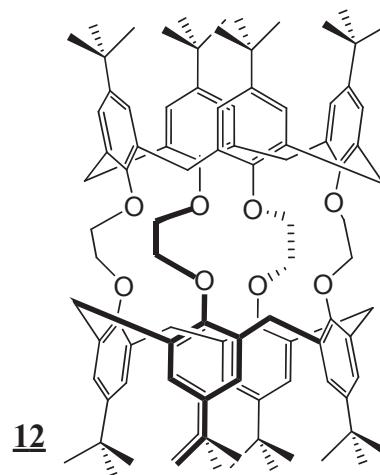
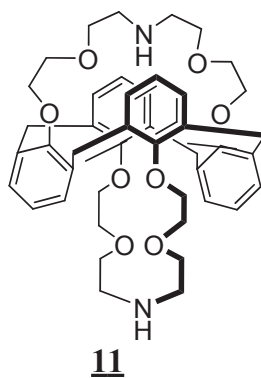
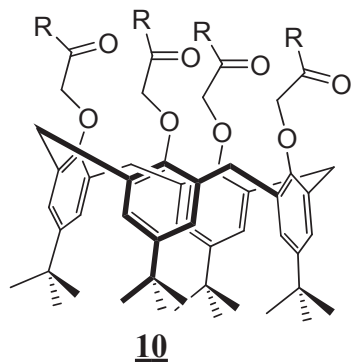
## Ethers couronnes



## Ligands chélatants

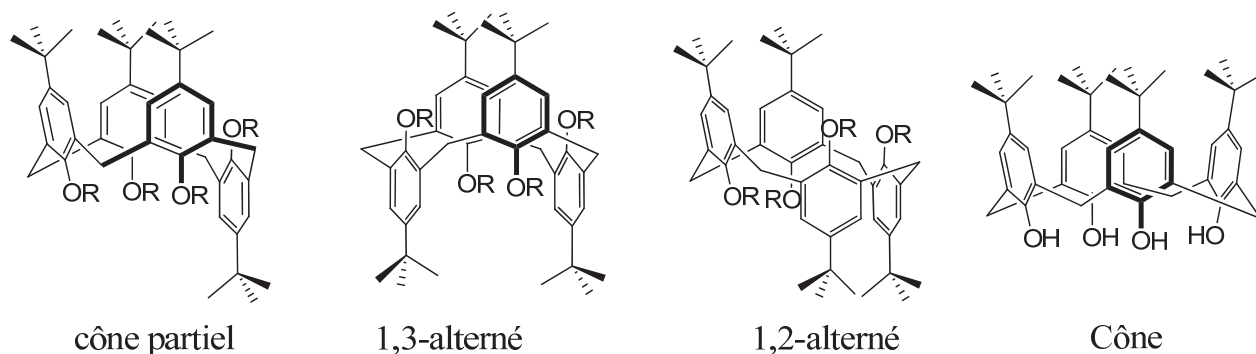


## Calixarènes



**Tableau I-3 :** Quelques exemples d'entités complexantes des métaux lourds.

Les structures à base de calixarène sont très largement utilisées pour la complexation des métaux lourds.<sup>66,60</sup> Le calixarène présente plusieurs conformations possibles<sup>67</sup> issues de la rotation des groupements phénoliques (voir le Schéma I-1 ci-dessous).

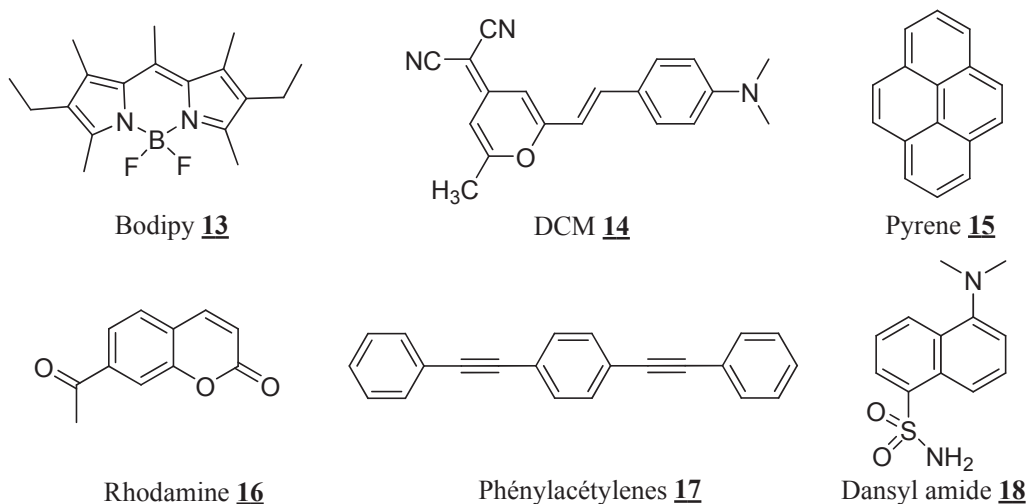


*Schéma I-1 : Les différentes formes du calixarène.*

Pour des raisons enthalpiques, la conformation en cône est souvent la plus stable. Même si les solvants polaires<sup>68,69</sup> favorisent la conformation en cône, cette dernière peut aussi être favorisée en substituant les phénols par des groupements encombrants.

### *II.2.b. Les entités fluorescentes : fluorophores*

Comme son nom l'indique, le fluorophore est l'entité responsable de la fluorescence de la molécule. La plupart des composés fluorescents ont des structures aromatiques,<sup>70</sup> il existe quelques composés aliphatiques fluorescents, comme certaines structures à base de terpènes (exemple l'acide cis-parinarique). Une extension du système conjugué  $\pi$  dans une molécule s'accompagne du déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers le rouge : c'est l'effet bathochrome. L'effet du substituant sur la fluorescence des composés aromatiques est complexe : sa nature ainsi que sa position sont à prendre en compte. A titre d'exemple, la présence d'atomes lourds (exemple Br, I, *etc...*) en tant que substituant peut entraîner une inhibition de la fluorescence de la molécule (effet d'atome lourd interne). En général, la substitution avec des groupements électrodonneurs provoque une augmentation du coefficient d'extinction molaire et un déplacement bathochrome<sup>71</sup> des spectres d'absorption et de fluorescence. Les paires d'électron sur les atomes d'azote ou d'oxygène participent au caractère  $\pi$ - $\pi^*$  de la transition de la molécule contrairement aux paires des groupements carbonyles ou des atomes d'azote hétérocycliques. La fluorescence de composés possédant des groupements électroattracteurs est difficile à prévoir ; celle-ci dépend fortement de la polarité du solvant utilisé. La fluorescence des composés possédant un atome d'azote hétérocyclique dépend fortement de la nature du solvant<sup>72</sup> utilisé, donc de l'aptitude à former des liaisons hydrogènes. Il faut également signaler que de nombreux fluorophores d'intérêt pratique sont des hétérocycles (coumarine, rhodamine, fluorescéine, *etc...*). Dans des solvants protiques comme l'alcool, ils peuvent former des liaisons hydrogènes, ce qui entraîne un déplacement spectral vers le rouge, d'où leur utilisation comme sondes de pH. Quelques exemples de fluorophores utilisés pour la détection de cations<sup>65,73,74</sup> sont présentés sur le Schéma I-2 ci-dessous.



*Schéma I-2 : Quelques exemples de fluorophores.*

Le choix du fluorophore pour la détection des cations métalliques doit être effectué de façon à ce que d'importantes modifications photophysiques soient observées. Les phénomènes photoinduits impliqués faisant intervenir un ou plusieurs fluorophores sont divisés en quatre catégories: le transfert d'électron photoinduit, le transfert de charge, le transfert d'énergie et la formation ou la disparition d'excimères.

## II.3. Les phénomènes photoinduits

### II.3.a. Transfert d'électron photoinduit

Le transfert d'électron entre un fluorophore excité et un ionophore est un processus qui entraîne généralement une extinction de la fluorescence. Ce phénomène est observé dans la plupart des cas lorsque le fluorophore et l'ionophore sont séparés par un espaceur : leurs propriétés redox sont mises en jeu. En effet, lorsque le fluorophore est excité, un saut d'électron de sa HOMO vers sa LUMO modifie ses propriétés oxydo-réductrices (Figure I-8), il peut alors se comporter comme un groupement donneur ou accepteur d'électron. Dans le cas où le fluorophore se comporte comme un donneur d'électron, ce dernier est transféré de l'orbitale LUMO de haute énergie vers une orbitale vacante de basse énergie d'une espèce pauvre en électron: il s'agit d'un transfert d'électron oxydatif. En revanche dans le cas contraire, le fluorophore excité peut être réduit facilement en présence d'une espèce oxydable : on parle d'un processus de transfert réductif.

L'équation de Rhem-Weller décrit la variation d'enthalpie libre lors du transfert d'électron photoinduit, à partir des potentiels rédox  $E^\circ$  et de l'énergie d'excitation  $\Delta E_{00}$  (différence d'énergie entre le premier état excité et l'état fondamental).<sup>59</sup>



$$\Delta G^\circ = F[E^\circ(D^+/D) - E^\circ(A/A^-) - \Delta E_{00}(D)]$$

éq I-5

Où,

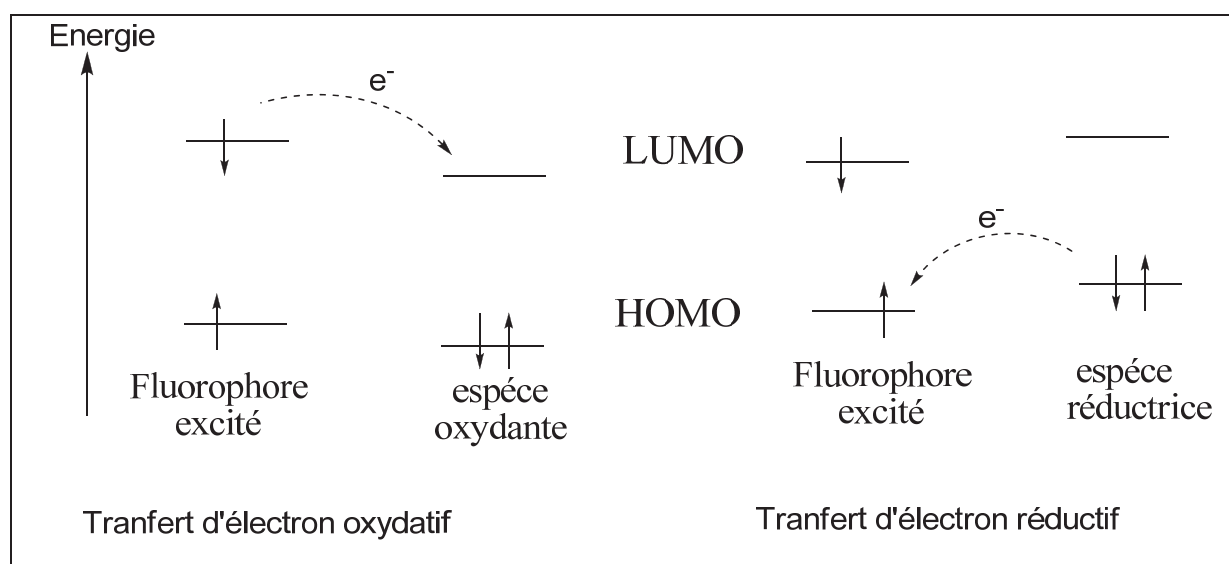
$\Delta E_{00}(D)$  est l'énergie de l'état excité fluorescent en eV,

D pour un transfert d'électron oxydatif,

A pour transfert d'électron réductif

F est la constante de Faraday,

$E^\circ(D^+/D)$  et  $E^\circ(A^-/A)$  sont les potentiels standards d'oxydation du donneur et de réduction de l'accepteur en volts.



**Figure I-8 :** Mécanisme d'inhibition de la fluorescence par un transfert d'électron photoinduit.

La détection de métaux utilisant des sondes à transfert d'électron (fluoroionophore de type TE) a fait l'objet de nombreuses études dans la littérature.<sup>63,75</sup> Deux phénomènes sont principalement observés lors de la complexation. Le premier implique la présence du cation métallique qui inhibe le processus de transfert d'électron (Figure I-9-a). Dans ce cas, une augmentation du rendement quantique de fluorescence est observé, ce qui entraîne une exaltation de la fluorescence : on parle de système « OFF-ON ». Le deuxième est le phénomène inverse appelé « ON-OFF » (Figure I-9-b). Ce second phénomène est observé dans le cas des sondes **19** et **20** utilisées pour la détection du mercure sur des systèmes à base d'éthers couronnes<sup>63</sup> ou de calixarène.<sup>46</sup> En effet, dans le cas du composé **19** le doublet non liant de l'amine tertiaire participe à la complexation du cation, donc le transfert d'électron de l'amine vers le fluorophore n'est plus assuré. Dans le cas du composé **20**, un processus de transfert d'électron oxydatif est mis en jeu entre le fluorophore excité et le cation mercurique. Les fluoroionophores de type transfert

d'électron ne subissent pas de déplacement spectral en absorption comme en fluorescence, ce qui exclut toute possibilité de mesures ratiométriques.

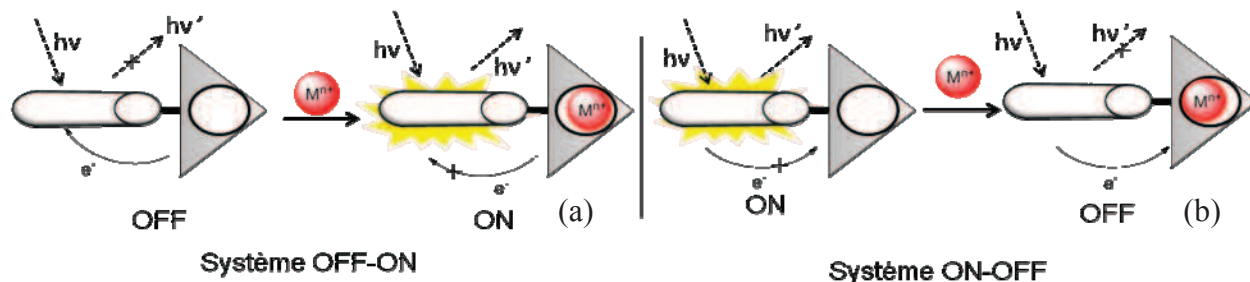


Figure I-9 : Exemples de fluorophores de types transfert d'électron (TE) OFF-ON (figure a) et ON-OFF (figure b).

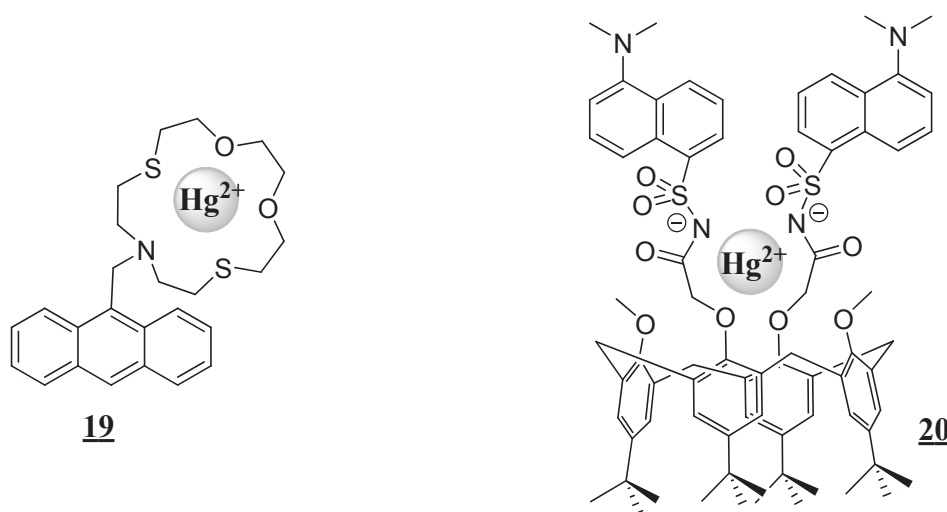


Schéma I-3 : Exemples de fluoroionophores de types transfert d'électron (TE) étudiés pour la détection du mercure.<sup>59,76</sup>

### II.3.b. Transfert de charge photoinduit

Le processus de transfert de charge est observé pour les fluorophores possédant un groupement électrodonneur ( $\text{NMe}_2$ ,  $\text{OMe}$ , *etc.*), conjugué à un groupement électroattracteur par des liaisons  $\pi$ . La molécule à l'état excité subit un transfert intramoléculaire d'électron du groupement donneur vers le groupement accepteur qui se traduit par une augmentation du moment dipolaire. Cette augmentation du moment dipolaire est à l'origine du solvatochromisme de tels fluoroionophores.<sup>77</sup> Les sondes fluorescentes à caractère transfert de charge (fluorophores de types TC) sont très étudiées pour la complexation des cations toxiques.<sup>76,78</sup> De la même manière, l'interaction entre le cation et le groupement électrodonneur ou attracteur peut également modifier le transfert de charge intramoléculaire et par conséquent les propriétés photophysiques.<sup>79</sup>

Dans le cas où le groupement électroattracteur interagit avec le cation, un accroissement du caractère accepteur de ce dernier est observé. Cet accroissement conduit à une augmentation de la

conjugaison et donc à une augmentation du coefficient d'extinction molaire. Nous observons également un déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers rouge (Figure I-10).

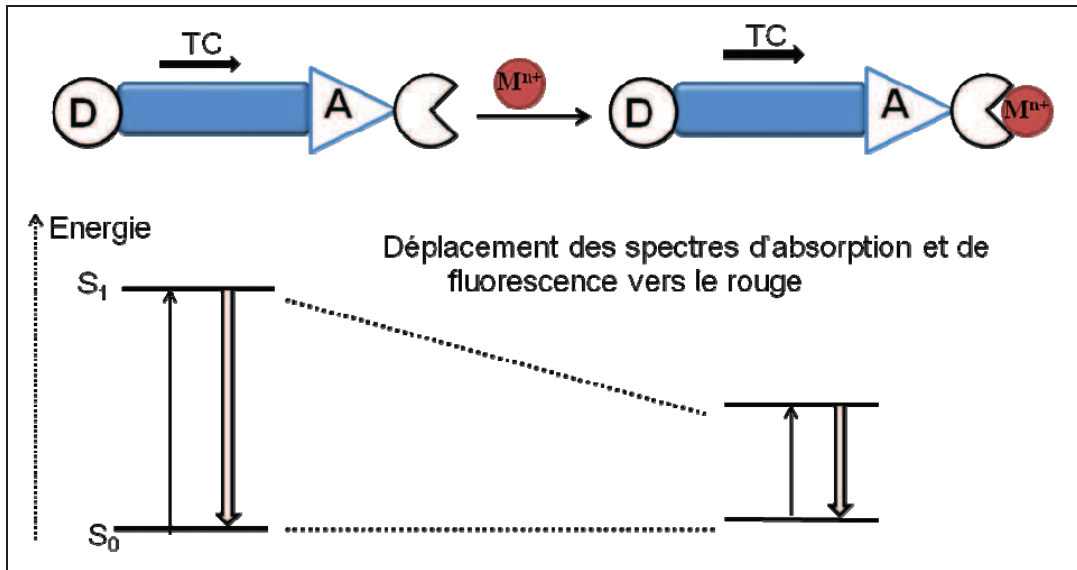
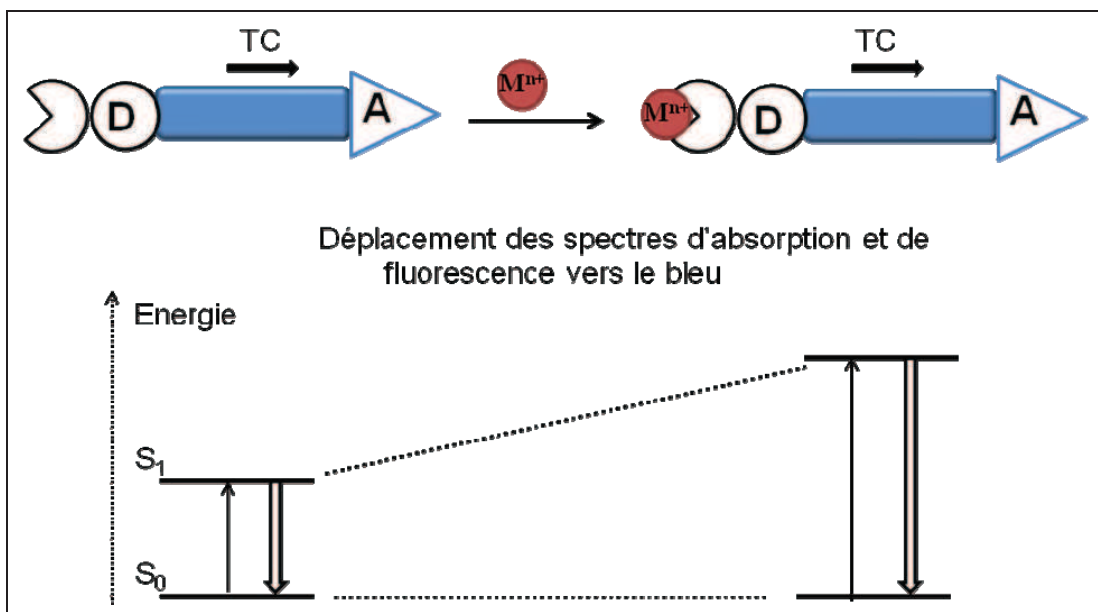


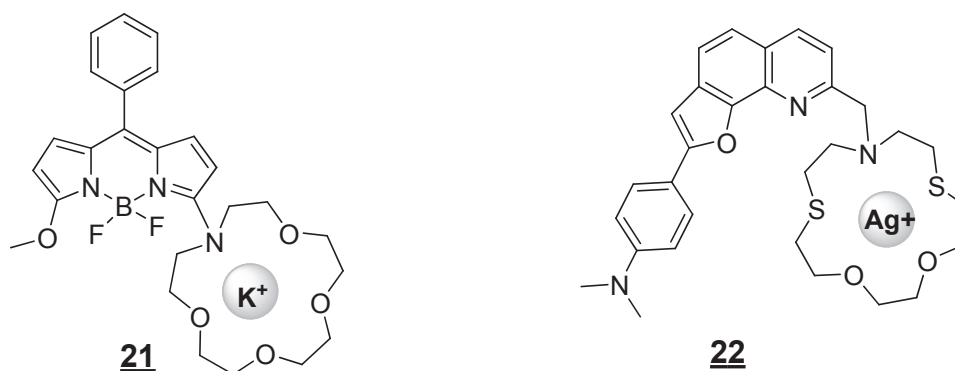
Figure I-10 : Interaction du cation avec le groupement attracteur.

En revanche, lorsque le cation est en interaction avec le groupement donneur, le caractère donneur de celui-ci est réduit, il en est de même pour le transfert de charge photoinduit. Autrement dit, l'état excité est plus déstabilisé par le cation que l'état fondamental, ce qui se traduit par un déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers les courtes longueurs d'ondes (Figure I-11). Une diminution du coefficient d'absorption molaire est également prévisible.



*Figure I-11 : Interaction du cation avec le groupement donneur.*

Ce processus est très utilisé pour la détection des cations alcalins et des métaux lourds. A titre d'exemples, on peut citer les ligands **21** et **22** à base d'éthers couronnes fonctionnalisés avec des chromophores de types Bodipy<sup>80</sup> ou furoquinoline<sup>81</sup> qui sont utilisés respectivement pour la détection des ions  $K^+$  et  $Ag^+$  (Schéma I-4). En présence de cations alcalins, l'atome d'azote du macrocycle participe à la complexation du cation, ce qui réduit le transfert d'électron vers le chromophore. On observe un déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers le bleu. Une photorupture de l'interaction cation ligand est parfois observée : les spectres sont moins sensibles à la présence du cation.<sup>82</sup>

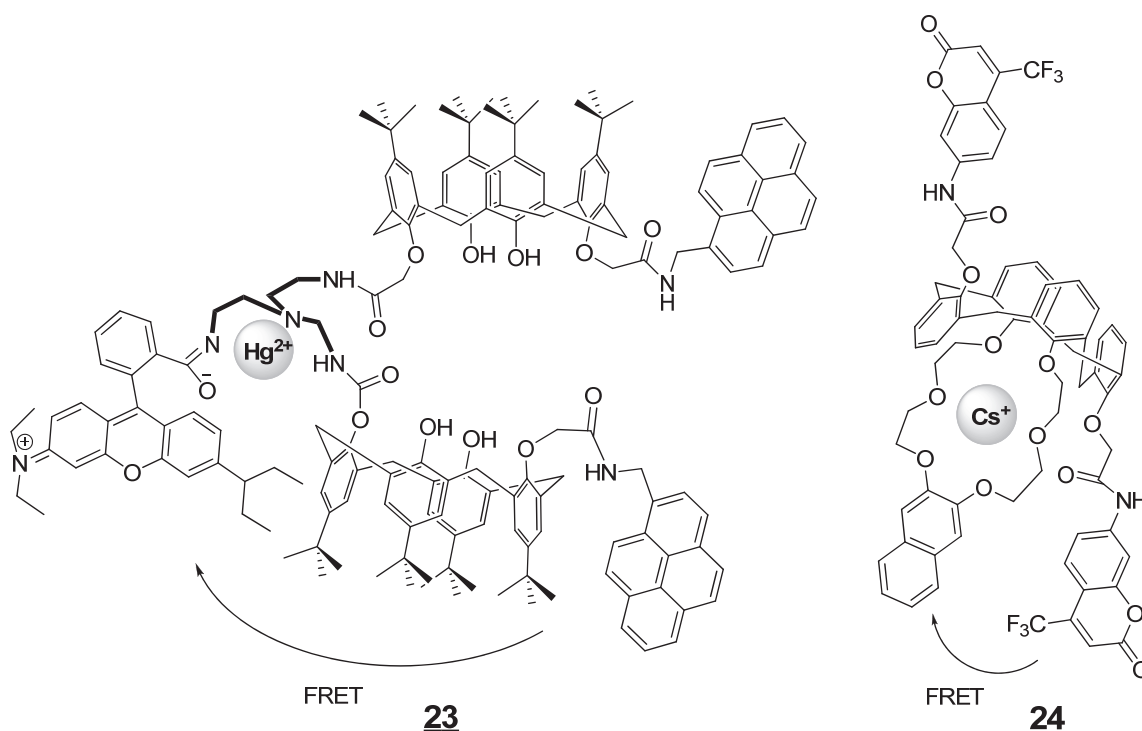


*Schéma I-4 : Exemples de fluoroionophores de types transfert de charge (TC) étudiés pour la détection des ions potassium et argent.<sup>78,79</sup>*

### II.3.c. Transfert d'énergie d'excitation

Le transfert d'énergie d'excitation est un processus entre deux fluorophores chimiquement différents ou identiques. Ce processus est possible à condition que le spectre d'émission du fluorophore donneur se recouvre partiellement avec le spectre d'absorption du fluorophore accepteur. Ceci permet d'avoir la même énergie des transitions vibroniques du donneur et de l'accepteur. Le transfert d'énergie d'excitation peut se faire de manière radiative, c'est-à-dire que le photon émis par le fluorophore donneur est réabsorbé par le fluorophore accepteur. Un tel transfert ne requiert aucune interaction entre les fluorophores mais il dépend du recouvrement spectral des espèces et de la concentration. Une des conséquences du transfert d'électron radiatif est une diminution de l'intensité de fluorescence dans la région de recouvrement spectral. Ce principe est aussi appelé transfert trivial en raison de la simplicité du phénomène. A l'inverse, il existe également un transfert non radiatif. Ce processus se produit sans émission de photon, il résulte de l'interaction à courte distance entre les fluorophores. En conséquence, ce processus peut être mis à profit pour déterminer des distances entre deux fluorophores allant jusqu'à quelques dizaines d'Angströms. Le transfert d'énergie non radiatif est plus probable dans le cas des solutions concentrées.

Le processus de transfert d'énergie est également mis à profit pour la détection des métaux lourds. Vicens *et al.* ont développé une sonde spécifique du mercure<sup>83</sup> (composé **23**) basée sur ce phénomène de transfert désigné par l'acronyme FRET. En effet, le calixarène est substitué par deux types de chromophores à bases de pyrène (donneur énergie) et de rhodamine (accepteur d'énergie). La coordination du mercure au niveau de la structure spyrolactame rapproche les deux chromophores ce qui facilite le transfert d'énergie observé. Ce même processus est mis à profit par Peng *et al.* pour la mise au point de la sonde **24** pour la détection du césium.<sup>84</sup>



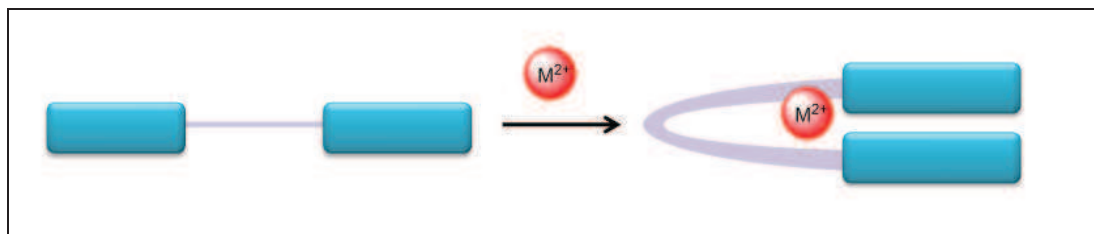
**Schéma I-5 :** Exemples de fluoroionophores de type transfert d'énergie d'excitation (TI) étudiés pour la détection du mercure et du césium.<sup>81,82</sup>

### II.3.d. Formation ou disparition d'excimères.

Un autre phénomène utilisé lors de la modification des propriétés photophysiques d'un fluorophore est la formation d'excimères. Les excimères sont des dimères à l'état excité. Ils résultent de la collision d'une molécule à l'état excité avec une molécule de la même espèce à l'état fondamental (Figure I-12). La formation d'excimères est un processus limité par la diffusion. Les phénomènes photophysiques liés à ce processus ne sont observés qu'à des concentrations élevées pour qu'un nombre suffisant de rencontres puisse avoir lieu pendant la durée de vie de l'état excité. Par conséquent, on peut dire que la distance entre les fluorophores, la température ainsi que la viscosité du milieu jouent évidemment un rôle primordial.

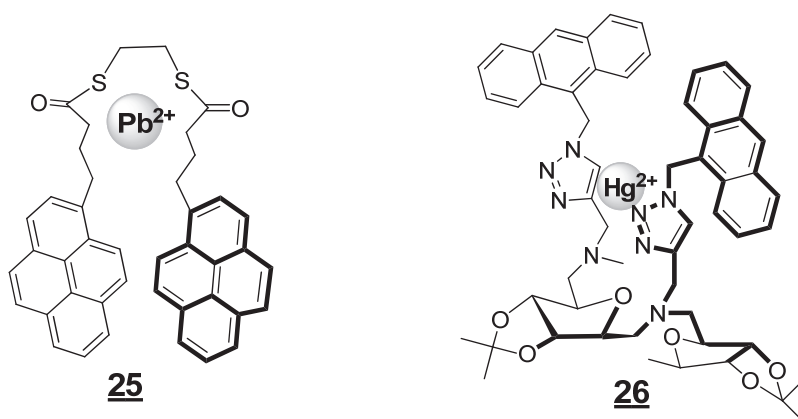
La plupart des fluoroionophores qui conduisent à la formation d'excimères sont des fluorophores à base hydrocarbures aromatiques par exemple le naphthalène ou le pyrène. Le spectre

de fluorescence d'un excimère se distingue de celui du monomère par un déplacement bathochrome et la disparition de la bande vibronique.



*Figure I-12: Principe de la formation d'excimères.*

Le fluoroionophore **25** à base de pyrène a été utilisé pour la détection du plomb en milieu aqueux.<sup>85</sup> En présence de l'analyte, l'interaction avec les groupements thioesters facilite le rapprochement des chromophores, d'où la formation d'excimères symbolisée par la disparition des bandes vibroniques caractéristiques du monomère pyrène. Le fluoroionophore **26** à base de sucre et de groupements naphthaléniques a été également utilisé pour la détection du mercure.<sup>86</sup> Comme pour le ligand **25**, la présence de mercure entraîne le rapprochement des chromophores, un « quenching » de la fluorescence et une disparition de la bande vibronique caractéristique du naphthalène sont observés. Il faut également signaler que les ligands **25** et **26** ne sont pas que spécifiques du plomb et du mercure, ils complexent aussi certains cations interférents comme le cuivre, le nickel, le cadmium et le sodium.



*Schéma I-6 : Exemples de fluoroionophores conduisant à la formation d'excimères pour la détection du plomb et du mercure.<sup>85,86</sup>*

## II.4. Les fluoroionophores pour la détection des métaux lourds : $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ et $\text{Cd}^{2+}$

L'élaboration de sondes fluorescentes macrocycliques ou non dans le but de détecter des traces de métaux lourds nécessite une connaissance particulière en chimie de coordination. En

effet, selon les caractéristiques de l'élément à quantifier : la sélectivité du ou des atomes participants à la complexation, la géométrie, l'architecture de l'entité complexante sont des éléments à prendre en compte.

#### II.4.a. Classification de Pearson

En 1958, Athrland *et al.* sont parmi les premiers à étudier l'affinité des acides (cations métalliques) avec les bases (ligands). Vers les années soixante, Pearson a proposé une étude plus détaillée en les classant en terme de dureté et de mollesse<sup>87</sup> sous l'acronyme HSAB (hard and soft acids and bases). Selon le principe de la classification de Pearson (Tableau I-4), les acides durs réagissent avec les bases dures et symétriquement les acides mous réagissent avec les bases molles. Les acides durs sont de petite taille, hautement chargés, ne possèdent pas d'électron de valence sur leur couche externe. Les acides mous quant à eux, sont de grande taille, faiblement électropositifs, possèdent un paire d'électron de valence, ils sont facilement polarisables et oxydables. Les bases dures sont de petite taille, chargées négativement, sont difficilement polarisables et oxydables. Les bases molles sont de grandes tailles, faiblement électronégatives, comme pour les acides mous, elles sont polarisables et oxydables. Quant aux espèces intermédiaires, comme leur nom l'indique, elles se distinguent par des propriétés intermédiaires des acides, bases durs ou mous.

| Acides durs   | Acides intermédiaires   | Acides mous  |
|---|---|--|
| H <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Be <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ,<br>Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Sc <sup>3+</sup> ,<br>Ga <sup>3+</sup> , In <sup>3+</sup> , La <sup>3+</sup> , Gd <sup>3+</sup> , Lu <sup>3+</sup> ,<br>Cr <sup>3+</sup> , Co <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , As <sup>3+</sup>              | Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ,<br>Pb <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> , Sb <sup>3+</sup> , Bi <sup>3+</sup>                           | Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Au <sup>+</sup> , Ti <sup>+</sup> , Hg <sup>+</sup> , Cs <sup>+</sup> ,<br>Pd <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pt <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ,<br>Hg, Pt <sup>4+</sup> , Te <sup>4+</sup>     |
| Bases dures   | Bases intermédiaires  | Bases molles   |
| H <sub>2</sub> O, OH <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ,<br>PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ,<br>ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ROH, RO <sup>-</sup> ,<br>R <sub>2</sub> O, NH <sub>3</sub> , RNH <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> , C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N,<br>N <sup>3-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | R <sub>2</sub> S, RSH, RS <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , SCN,<br>S <sup>2-</sup> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , R <sub>3</sub> P, R <sub>3</sub> As, (RO) <sub>3</sub> P,<br>CN <sup>-</sup> , RNC, CO, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , H <sup>-</sup> , R <sup>-</sup> |

Tableau I-4 : Classification des acides et des bases selon de principe de Pearson.<sup>87</sup>

Suivant la classification de Pearson détaillée ci-dessus, le plomb peut être considéré comme un cation intermédiaire, tandis que le mercure et le cadmium sont considérés comme des cations mous. Cette théorie est très importante pour la conception de ligands sélectifs pour le cation désiré.<sup>88</sup> Le Tableau I-5 ci-dessous représente les principales caractéristiques du plomb, du mercure, et du cadmium tous considérés toxiques. Ces cations font l'objet d'une investigation de nombreux chercheurs dans le cadre du projet d'élaboration de sondes spécifiques en milieu aqueux.

| Elément          | Diamètre (nm) | Masse volumique du métal (g/cm <sup>3</sup> ) | Coordinnances |
|------------------|---------------|---|---------------|
| Hg <sup>2+</sup> | 0,204         | 13,6  | 2 à 6         |
| Pb <sup>2+</sup> | 0,238         | 11,35   | 3 à 10        |
| Cd <sup>2+</sup> | 0,194         | 8,6   | 4 ou 6        |

*Tableau I-5 : Caractéristiques du plomb, du mercure et du cadmium.*

#### *II.4.b. Fluoroionophores pour la détection du Plomb*

D'après les données décrites dans la littérature, les atomes d'oxygène et d'azote favorisent la formation de complexes stables avec le plomb. Le pouvoir complexant de l'amine augmente dans le sens  $\text{NH}_3 < \text{RNH}_2 < \text{R}_2\text{NH} < \text{R}_3\text{N}$ , à condition que l'effet stérique ne perturbe pas la tendance. Quant à l'oxygène, les fonctions suivantes sont classées par le pouvoir complexant croissant : eau < hydroxy < éther < ester < aldéhyde < amide. Ces atomes donneurs ont été principalement utilisés pour la conception de ligands spécifiques pour la détection du plomb. L'architecture de l'entité complexante est très importante pour la sensibilité et la sélectivité du fluoroionophore. Parmi les plus utilisés pour la détection du plomb, on peut citer :

**Les ligands chélatants** : la complexation d'un métal par chélation augmente la stabilité thermodynamique des complexes formés. Le cycle de chélation formé par le métal et une portion bidentate du ligand dépend forcément de la taille du cation métallique. Un cycle de chélation à 6 atomes serait plutôt favorable pour les cations de petites tailles et un cycle à 5 atomes favoriserait la complexation sélective des gros cations.

De nombreux ligands chélatants spécifiques pour la détection du plomb ont été décrits dans la littérature. Le composé **27** à base de pyrène a été étudié pour la complexation du plomb en milieu aqueux.<sup>64</sup> Des études de complexation en présence de cations interférents montrent une très bonne sélectivité de la sonde vis-à-vis des cations alcalins, mais cette sonde complexe aussi le mercure pour une concentration supérieure à 66  $\mu\text{M}$ . Une limite de détection de l'ordre 1,5  $\mu\text{M}$  est obtenue. Yoon *et al.* ont aussi synthétisé<sup>89</sup> une nouvelle sonde à transfert de charge (TC) pour la détection du plomb **28**. Contrairement à la sonde **27**, le composé **28** (Schéma I-7) est très sélectif vis-à-vis des cations interférents, mais la limite de détection obtenue est au dessus des normes européennes.<sup>17</sup>



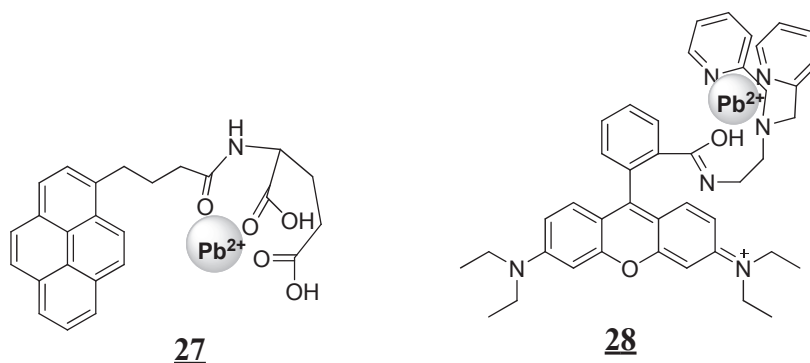


Schéma I-7 : Exemples de ligands chélatants pour la détection du plomb<sup>64,89</sup>

**Les ligands à base de calixarène** : l'utilisation des macrocycles pour la complexation du cation permet d'avoir une augmentation de la stabilité du complexe cation-ligand. Il existe une très grande variété de ligands macrocycliques en partant des éthers couronnes,<sup>63</sup> en passant par les cryptants<sup>61</sup>, sans oublier les structures à base de calixarène.<sup>65</sup> Les structures macrocycliques sont pré-organisées, adaptées à la complexation du cation ; elles ont donc un degré de liberté faible par rapport à la forme ouverte.

Un moyen d'augmenter la sélectivité d'un macrocycle consiste à augmenter son niveau de pré organisation. Les macrocycles ne sont sélectifs que si la taille de la cavité complexante est adaptée à la taille du cation visé ; malheureusement, de tels systèmes sont difficiles à obtenir. Par ailleurs, la stabilité des complexes formés est fortement dépendante de l'aptitude du ligand à exclure le solvant dans la cage de complexation.

Les structures à base de calixarène ont été largement étudiées par le groupe du professeur Barstsch<sup>90</sup> pour l'extraction des métaux lourds. Le composé **29** (Schéma I-8) à base de calixarène déterbutylé a été étudié pour la complexation du plomb.<sup>91</sup> Cette sonde s'est révélée sensible au plomb mais aussi sélective de potassium. En s'inspirant des travaux réalisés par Bartsch, notre équipe a étudié par fluorescence la complexation du plomb à partir du calixarène fonctionnalisé par quatre groupements dansylamides **30** (CalixDANS-4).<sup>46</sup> Des résultats très encourageants ont été obtenus pour la détection du plomb. Une très bonne complexation en milieu partiellement aqueux (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O 60 : 40 ), à pH = 5,2 est observée. Une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents ainsi qu'une limite de détection de 4 µg/L (1,92x10<sup>-2</sup> µM) ont été obtenues. Cette limite s'avère être inférieure à celle imposée par les directives européennes sur la qualité de l'eau. Il faut également signaler que parmi les fluoroionophores décrits dans la littérature pour la complexation du plomb en milieu aqueux ou partiellement, le CalixDANS-4 présente une des meilleures sélectivités et sensibilités.

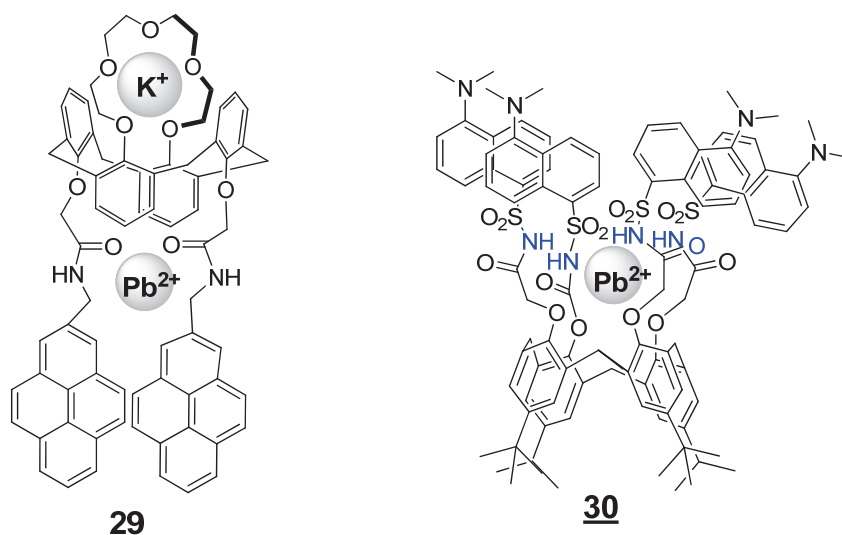


Schéma I-8 : Exemples de ligands à base de calixarène pour la détection du plomb.<sup>91,46</sup>

#### II.4.c. Fluoroionophores pour la détection du mercure

Le mercure, considéré comme un acide mou dans la classification de Pearson, possède une forte affinité avec les groupements sulfures, les amines tertiaire et l'oxygène des groupements carbonyles. De nombreux fluoroionophores dont l'entité complexante est basée sur ces atomes sont décrits pour la complexation du mercure.<sup>92</sup> Nombre de ces ligands sont du type à transfert de charge (TC). Parmi les plus performants (Schéma I-9), on peut citer les structures à base d'azo-hydroxyquinoléine (**31**).<sup>93</sup> En présence de mercure, on observe un déplacement hypsochrome des spectres d'émission, ceci est dû à l'interaction entre le mercure avec l'atome d'azote de la quinoléine et l'oxygène du groupement carbonyle. Le processus photoinduit mis en jeu est un transfert de charge intramoléculaire du type D- $\pi$ -D' en D- $\pi$ -A. Il faut également signaler que dans le cas du composé **31**, le groupement azo (-N=N-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) complexe les cations interférents Cu<sup>2+</sup>, ce qui a tendance à diminuer le processus de transfert de charge. La complexation du mercure en milieu réel par des ligands cryptands à base de dithioamine<sup>94</sup> (**32**) et de pipérazine<sup>95</sup> (**33**), a conduit à une bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents. Cependant, la limite de détection obtenue (de l'ordre de 2  $\mu$ g/L) reste supérieure aux normes imposées par les directives européennes sur la qualité des eaux de consommation.

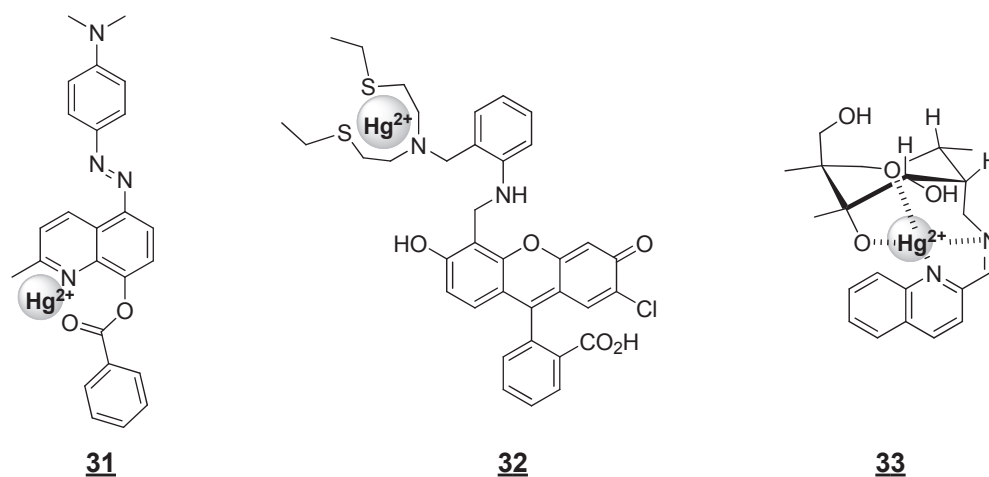


Schéma I-9 : Exemples de fluoroionophores étudiés pour la complexation du mercure.<sup>93,94,95</sup>

La détection du mercure à partir de macrocyclophore à base d'éther couronne (Schéma I-10) du type diathia-dioxa-monoaza (**34**) a été également étudiée par Rurack *et al.*<sup>96</sup> La coordination du mercure par l'entité complexante inhibe le transfert de charge entre l'amine tertiaire et le groupement carbonyle du chromophore phenoxazin-3-one. Cette sonde à base d'éther couronne présente une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents en milieu aqueux ; cependant, la limite de détection de l'ordre 20  $\mu\text{g/L}$  ( $9,97 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ) est supérieure au seuil imposé dans les eaux de consommation en Europe. Des structures à base de calixarène **35** ont également fait l'objet d'une étude pour des sondes spécifiques pour la détection du mercure.<sup>97</sup> Comme la plupart des ligands évoqués pour détecter le mercure, cette sonde est sélective du mercure mais la limite de détection est au dessus des normes imposées.

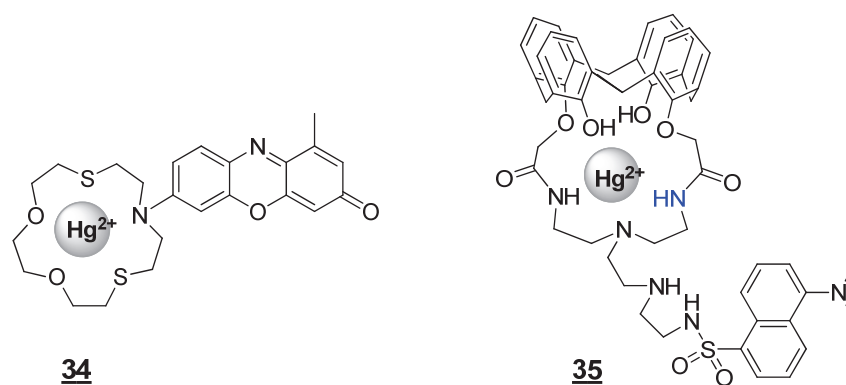
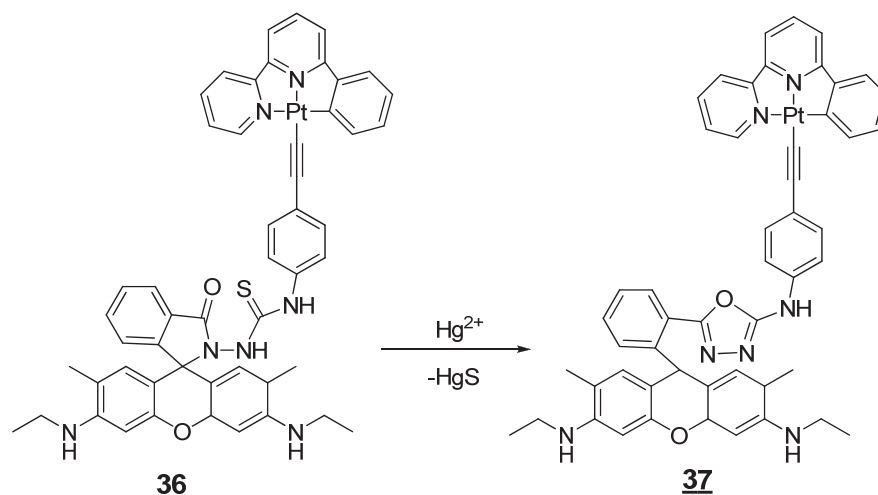


Schéma I-10 : Exemples de fluoroionophores pour la détection du mercure.<sup>96,97</sup>

Les composés à base de spirolactame sont aussi étudiés pour le dosage du mercure en milieu aqueux.<sup>98</sup> L'entité complexante thiosemicarbazide du composé **36** est très sensible au mercure ; en présence d'une quantité croissante de mercure, on observe une réaction de désulfuration (Schéma I-11). Cette réaction s'accompagne d'une fermeture de cycle pour conduire au dérivé oxadiazole **37**. Une exaltation de l'intensité de fluorescence est observée, aucune interférence des cations compétitifs n'est observée.<sup>99</sup> Cependant, la limite de détection obtenue (97

$\mu\text{g/L}$ ) est supérieure aux normes imposées dans les eaux de consommation en Europe. Il faut également signaler que la réversibilité du système n'est pas observée, ce composé peut être assimilé à un dosimètre.



*Schéma I-11 : Dosage du mercure par réaction de désulfuration du composé 36.<sup>99</sup>*

Du fait de la grande affinité entre le mercure et les groupements sulfures ou sélénure de phosphines, de nouvelles générations de capteurs fluorescents très sélectifs ont été étudiées au laboratoire. Les chromophores associés à ces types d'entités complexantes sont du type à transfert de charge intramoléculaire (TC) appelé également «push-pull». Le composé **38** à base de sulfure de phosphine substitué par quatre chromophores<sup>48</sup> du type (D- $\pi$ -A) a été étudié pour ses propriétés complexantes du mercure. Cette sonde s'est révélée très sélective du mercure avec une limite de détection de  $0,75 \mu\text{g/L}$  ( $3,7 \text{ nM}$ ) largement inférieure à celle de la plupart des ligands décrits dans la littérature. Par défaut de solubilité dans l'eau, les mesures ont été effectuées en milieu partiellement aqueux ( $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  80 : 20). Le composé **39** à base de sélénure de phosphane<sup>100</sup> **39** a aussi été au laboratoire pour la complexation du mercure. Une très bonne sélectivité ainsi qu'une limite de détection de  $0,18 \mu\text{g/L}$  ( $0,9 \text{ nM}$ ) sont obtenues en milieu aqueux. Dans le cas des composés **38** et **39** la réversibilité du système est obtenue par décomplexation du mercure en milieu acide.

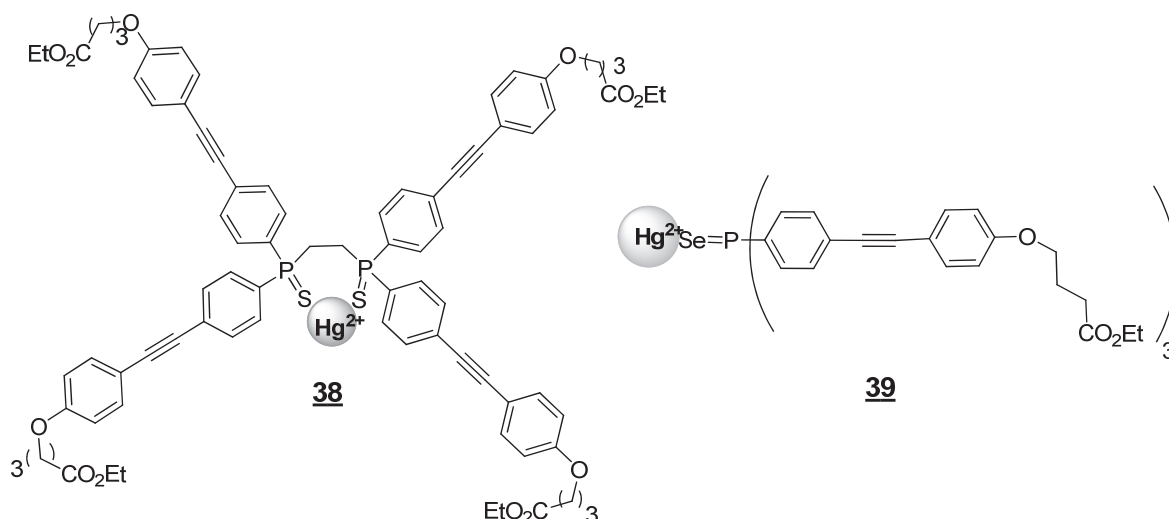
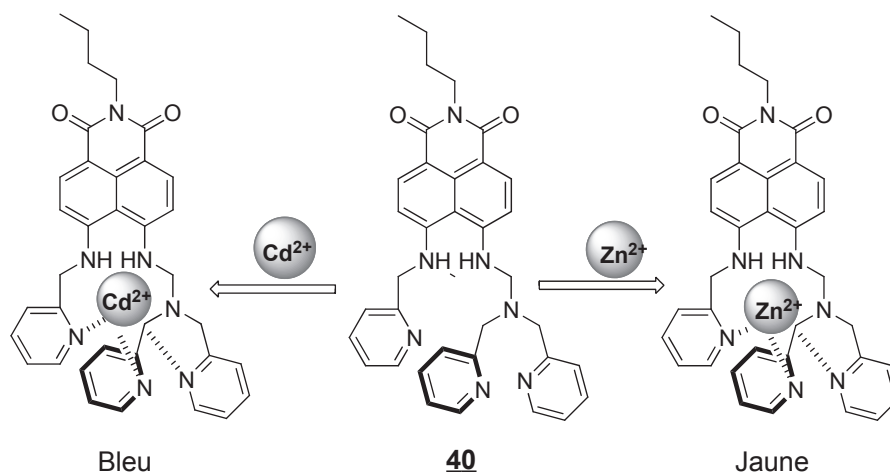


Schéma I-12 : Fluoroionophores de type transfert de charge étudiés pour la détection du mercure.<sup>48,100</sup>

#### II.4.d. Fluoroionophores pour la détection du cadmium

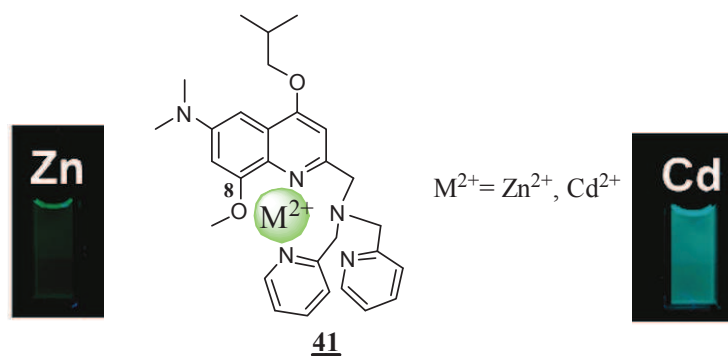
Le cadmium est considéré dans la classification de Pearson comme un cation intermédiaire à tendance mou. Donc, les atomes d'oxygène (durs), ainsi que les atomes d'azote et de soufre (mous) sont susceptibles d'interagir avec celui-ci pour former des complexes stables. Plusieurs types de ligands d'architectures variées à bases de macrocycles,<sup>101</sup> d'éthers couronne ou cryptands<sup>102</sup> sont décrits dans la littérature. Contrairement aux ligands décrits pour la détection du plomb ou du mercure, la plupart des ligands spécifiques du cadmium sont solubles dans l'eau et les dosages sont très souvent effectués à un pH = 7. Par contre, un problème majeur se pose pour la conception d'un ligand sélectif du cadmium. Comme on peut le voir sur les tables de classification périodique, le cadmium et le zinc possèdent des propriétés électroniques très proches: donc les sondes sensibles au cadmium le sont aussi pour le zinc.

Les structures à base de pyridine sont très utilisées pour la complexation du cadmium en milieu aqueux.<sup>103,104</sup> Dans la plupart des cas une interférence avec le zinc est observée. Différentes stratégies sont développées pour discriminer le cadmium du zinc. Parmi les plus performantes, on peut citer celle développée par Yoon *et al.* qui utilise un fluoroionophore à transfert de charge intramoléculaire (TC) constitué par des groupements pyridines et picolylamines **40**.<sup>105</sup> Cette sonde détecte aussi bien le cadmium, que le zinc en milieu réel c'est-à-dire dans de l'eau tamponnée à pH = 7,2 (Schéma I-13). Ces deux éléments sont discriminés par des mesures ratiométriques. En effet, le spectre d'absorption du composé **40** présente un maximum à 460 nm, par ajout croissant de cadmium un point isobestique apparaît à 420 nm. La même expérience effectuée avec le zinc montre un point isobestique à 470 nm. A partir de ces informations obtenues en absorption, des mesures ratiométriques ont permis de déterminer sélectivement le cadmium du zinc.



**Schéma I-13** : Dosage du zinc et du cadmium par des mesures ratiométriques.<sup>105</sup>

La méthode basée sur les mesures ratiométriques est la technique la plus utilisée pour discriminer le cadmium du zinc par fluorescence.<sup>103,105</sup> Shengui *et al.* ont utilisé un analogue du composé **41** pour étudier la complexation du cadmium en milieu aqueux.<sup>104</sup> Celui-ci est substitué par un groupement méthoxy en position 8 de la quinoléine (Schéma II-14). Cette sonde s'est révélée être un bon complexant du cadmium, mais comme la plupart des sondes dont l'entité complexante est du type di-2-picolyldiamine, on observe l'interférence du zinc. Le spectre d'émission du composé **41** libre présente un maximum à 558 nm. En présence d'une quantité croissante de perchlorate de cadmium, on observe une inhibition de la fluorescence. Les spectres d'émission correspondants sont déplacés vers les courtes longueurs d'onde et un point isoémissif apparaît à 495 nm. Cependant, l'ajout d'une solution de perchlorate de zinc entraîne aussi un « quenching » de la fluorescence et un déplacement hypsochrome des spectres d'émission. De plus, un point isoémissif apparaît à une longueur d'onde de 510 nm. En effectuant des mesures ratiométriques à une intensité de fluorescence de 558 nm correspondant au maximum du spectre d'émission du ligand libre **41** et au point isoémissif du dosage du cadmium (495 nm), ce dernier est discriminé du zinc. Une très faible quantité de cadmium est déterminée en milieu aqueux avec une limite de détection de 1,1 ng/L.



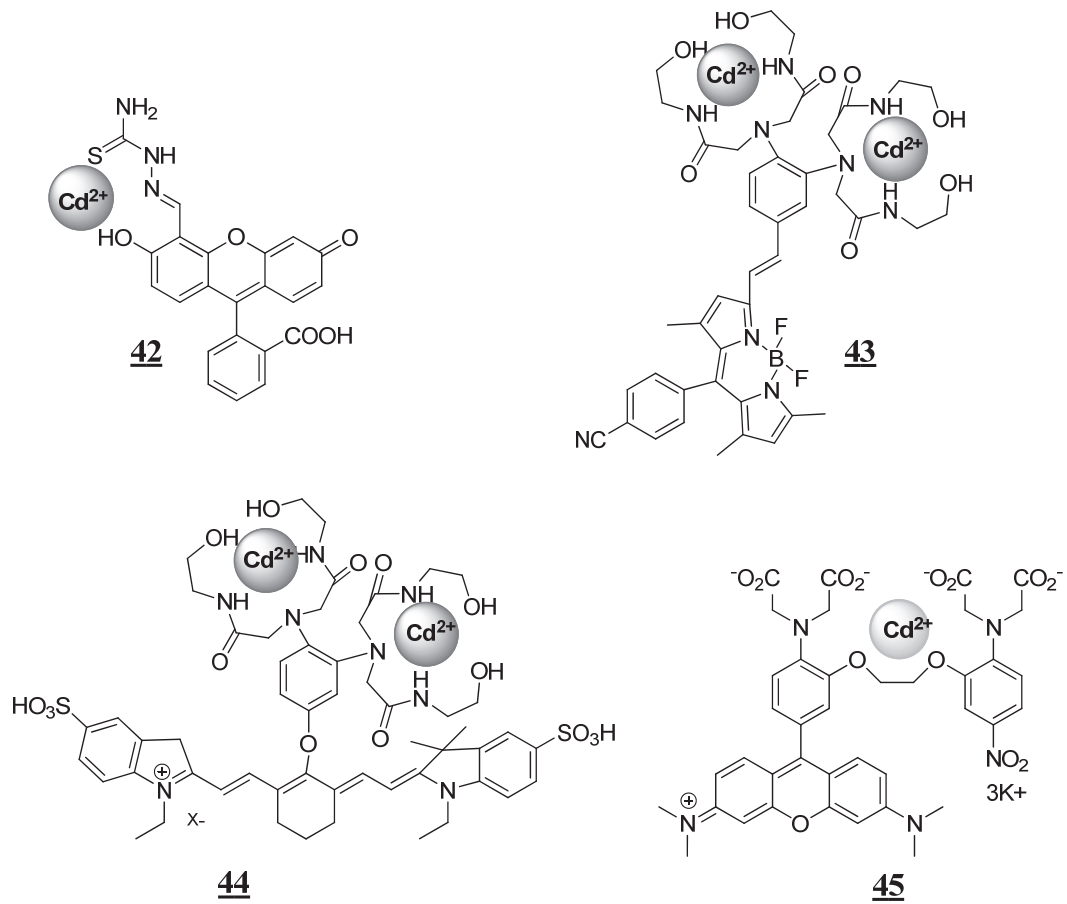
**Schéma II-14** : Sonde fluorescente pour la discrimination du cadmium avec le zinc par mesures ratiométriques.<sup>104</sup>

Le tableau ci-dessous est un résumé des propriétés photophysiques du composé **41** libre et des complexes formés avec le cadmium et le zinc.

|                     | $\lambda_{\text{max abs}}$ (nm) |     | $\epsilon \times 10^{-4}$ ( $\text{M}^{-1} \text{Cm}^{-1}$ ) | $\Phi_{\text{F}}$ |
|---------------------|---------------------------------|-----|--|-------------------|
| Ligand <b>41</b>    | 258                             | 558 | 3,74   | 0,15              |
| Cd-Ligand <b>41</b> | 262                             | 495 | 4,80   | 0,11              |
| Zn-Ligand <b>41</b> | 263                             | 510 | 4,34   | 0,06              |

**Tableau II-6 :** Propriétés photophysiques du ligand **41** et des complexes formés avec le cadmium et le zinc en milieu aqueux tamponné par le MOPS.<sup>104</sup>

Les structures à base de thiosemicarbazide **42** ont été étudiées par Pengfei *et al.* pour la détection du cadmium en milieu aqueux.<sup>106</sup> En présence d'une quantité croissante de cadmium une exaltation de la fluorescence est observée et le complexe formée est relativement stable. Cependant, une interférence des cations  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  est observée si ces éléments sont présents à partir de 20 équivalents. Une macromolécule à base de bodipy substitué par un groupement électroattracteur du type nitrile **43** a également été étudiée par Qian *et al.* pour la détection du cadmium.<sup>107</sup> Pour augmenter sa solubilité ainsi que sa sélectivité dans l'eau, les groupements complexants utilisés sont des structures à base de polyamides. En présence d'une quantité croissante de cadmium, le transfert de charge du groupement amine électrodonneur vers le groupement électroattracteur nitrile du chromophore est inhibé. Contrairement à beaucoup de fluoroionophores décrits pour la détection du cadmium, aucune interférence n'est observée en présence de zinc. Une limite de détection de 67,5  $\mu\text{g/L}$  (0,6  $\mu\text{M}$ ) est obtenue, mais cette valeur reste supérieure à la norme imposée par l'union européenne. Récemment, le même groupe a développé une nouvelle sonde à transfert de charge (composé **44**) pour la détection du cadmium en milieu biologique.<sup>50</sup> Une limite de détection de 258  $\mu\text{g/L}$  (2,3  $\mu\text{M}$ ) ainsi qu'une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents sont obtenues. Dans le cas des composés **43** et **44** (Schéma I-15) la réversibilité du système est observée en ajoutant de l'EDTA, ce qui représente un atout majeur pour la conception de dispositifs réutilisables pour la détection des métaux lourds dans l'eau. Il a été étudié au laboratoire, la complexation du cadmium par un composé commercial **43** ; le Rhod-5N.<sup>49</sup> Celui-ci est constitué par une entité complexante du même type que l'EDTA. En présence d'une quantité croissante de cadmium, une exaltation de l'intensité de fluorescence est observée. Une faible quantité de cadmium est détecté 3,1  $\mu\text{g/L}$  ( $3,49 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ). Contrairement à la plupart des sondes de cadmium où le zinc reste le principalement cation interférent, on n'observe que l'interférence des ions  $\text{Pb}^{2+}$ .

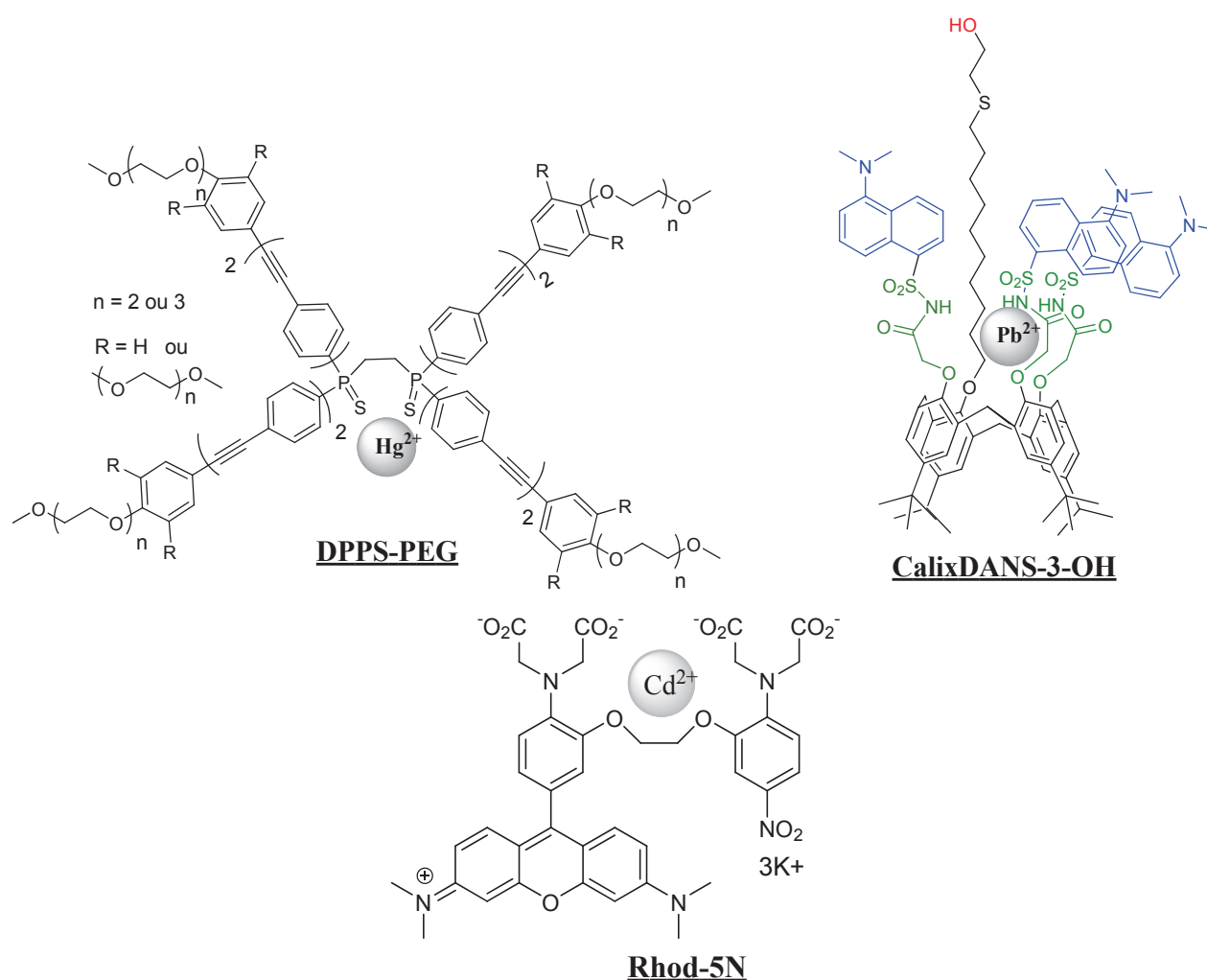


*Schéma I-15 : Exemples de sondes fluorescentes pour la détection du cadmium en milieu aqueux.*<sup>106,107,50</sup>



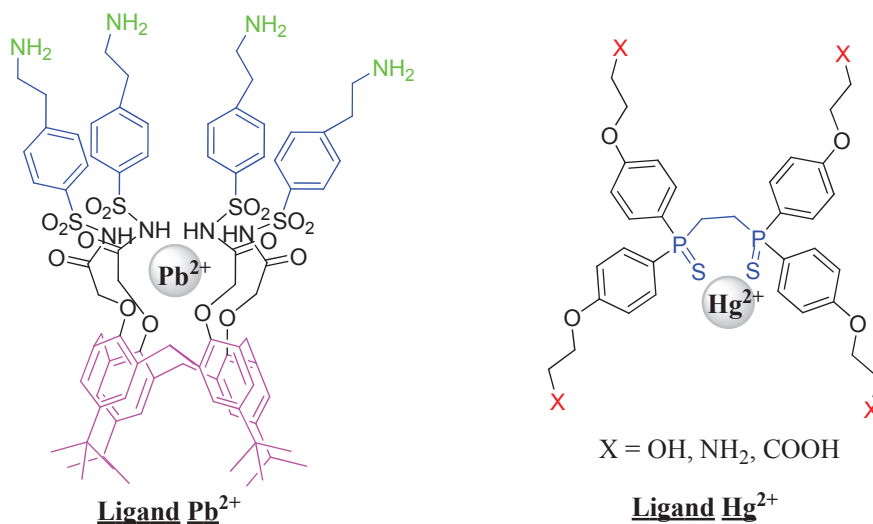
## Conclusion

Ce chapitre a souligné la toxicité des métaux lourds. Une étude bibliographique des différentes méthodes de détection du plomb, du mercure et du cadmium a été effectuée. Parmi les techniques les plus performantes, on peut citer, la spectroscopie de masse, l'électrochimie et la fluorescence. Un grand nombre de fluoroionophores destinés à la détection de ces cations toxiques par fluorescence a été présenté. Dans notre projet d'élaboration de dispositifs portables pour la détection de métaux lourds, deux axes ont été principalement développés pour la conception de systèmes spécifiques et moins onéreux pour la détection du plomb, du mercure et du cadmium en milieu aqueux. La première approche a consisté à étudier la complexation des ions  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  par les ligands fluorescents, respectivement par **Rhod-5N**, **DPPS-PEG** et **CalixDANS-3-OH** (voir structures sur le Schéma I-16) en solution puis en circuit microfluidique.



*Schéma I-16 : Les molécules cibles pour la détection du mercure, du plomb et du cadmium par fluorescence en milieu aqueux.*

La deuxième partie du travail a été une nouvelle approche de détection des métaux lourds par microlaser à partir de microcavités organiques. Les microcavités organiques sont constituées d'un polymère fonctionnalisé par des ligands non fluorescents puis dopé d'un colorant laser. Les ligands que nous avons choisi d'étudier possèdent la même entité complexante que les ligands **DPPS-PEG** et **CalixDANS-3-OH** étudiés pour le dosage du mercure et du plomb en solution. Le Schéma I-17 ci-dessous présente la structure de nos ligands ciblés pour la détection des ions  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  par microcavités laser.



*Schéma I-17 : Ligands cibles pour la détection du plomb et du mercure.*

## Références Bibliographiques

- 1 O. Malm, "Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon", Environ. Res. **1998** (77), 73-78.
- 2 UNEP, "Global Mercury Assessment Report", UNEP (United Nations Environment Programme), Genève, **2002**.
- 3 A.K. Das, M. de la Guardia, M.L. Cervera "Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions", Talanta **2001** (55), 1-28.
- 4 D. Elbaum, S.K. Nair, M.W. Patchan, R.B. Thompson, D.W. Christianson "Structure-Based Design of a Sulfonamide Probe for Fluorescence Anisotropy Detection of Zinc with a Carbonic Anhydrase-Based Biosensor", J. Am. Chem. Soc. **1996** (118), 8381-8387.
- 5 D.R. Juberg "Lead and Human Health: An Update. 2<sup>nd</sup> Edition", American Council on Science and Health. **2000**.
- 6 M.J. Warren, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan "Lead Poisoning, Haem Synthesis and 5-aminolaevulinic Acid Dehydratase", Trends. Biochem. Sci. **1998** (23), 217-221.
- 7 P. Landrigan, A.C. Todd "Lead Poisoning", West. J. Med. **1994**. (161), 153-159.
- 8 ATSDR, "Toxicological profile", Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **1999**, US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Atlanta, Georgia, USA.
- 9 L. Friberg, C.G. Elinger, T. Kjelström "Cadmium", World Health Organization, Genève, **1992**.
- 10 T. Sorahan, R.J. Lancashire "Lung Cancer Mortality in a Cohort of Workers Employed at a Cadmium Recovery Plant in the United States: an Analysis with Detailed Job Histories", Occup. Environ. Med., **1997**, (54), 194-201.
- 11 J.D. Hem "Geochemical controls on lead concentrations instream water and sediments." Geochim. Cosmochim. Acta **1976** (40), 599-609.
- 12 J.B. Christensen, J.J. Botma, T.H. Christensen "Complexation of Cu and Pb by DOC in polluted groundwater: A comparison of experimental data and predictions by computer speciation models (WHAM and MINTEQA2) ". Water Res. **1999** (15), 3231-3238.
- 13 C.E. Martinez, H.L. Motto "Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils". Environ. Pollut. **2000** (107), 153-158.
- 14 WHO (World Health Organization) IPCS. "Guidelines for Drinking-water Quality", Geneva: <http://www.inchem.org> **2004**.
- 15 Directive 2008/105/CE du parlement européens et du Conseil du 16 Décembre 2008, "Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants ", Journal Officiel de l'union Européenne L 348/92, **2008**.
- 16 Décret n° 91-257 du 7 mars 1991, "Décret relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles", **1991**.
- 17 J.L. Godet, D. Marchand, D. Tricard. Direction Générale de la Santé. "Qualité des eaux d'alimentation 1993-1994-1995", **1998**, Paris.

- 18 M. Etienne, J. Bessiere, A. Walcarius "Voltammetric detection of copper(II) at a carbon paste electrode containing an organically modified silica." *Sens. Actuat. B-Chem.* **2001** (76), 531-538.
- 19 E. Chow, D.B. Hibbert, J.J. Gooding "Voltammetric detection of cadmium ions at glutathione-modified gold electrodes." *Analyst* **2005** (130), 831-837.
- 20 H. Karami, M.F. Mousavi, M. Shamsipur "Flow injection potentiometry by a new coated graphite ion-selective electrode for the determination of  $Pb^{2+}$ ." *Talanta* **2003** (60), 775-786.
- 21 "Analyse portable des métaux lourds" [www.sens-innov.com](http://www.sens-innov.com)
- 22 P.R. Haddad, P.E. Jackson "Ion Chromatography-Principles and Applications" *J. Chromatogr. Lib.*, Elsevier, Amsterdam, **1990**, (46).
- 23 L. Barron, M. O'Toole, D. Diamond, P.N. Nesterenko, B. Paull "Separation of transition metals on a poly-iminodiacetic acid grafted polymeric resin column with post-column reaction detection utilising a paired emitter-detector diode system." *J. Chromatogr. A* **2008** (1213), 31-36.
- 24 L. Lambertsson, E. Bjorn. "Validation of a simplified field-adapted procedure for routine determinations of methyl mercury at trace levels in natural water samples using species-specific isotope dilution mass spectrometry." *Anal. Bioanal. Chem.* **2004** (380), 871-875.
- 25 J.M. Mermet, E. Poussel. "Couplage plasma induit par haute fréquence spectrométrie de masse", *Techniques de l'ingénieur, traité Analyse et Caractérisation* **1999** (P2720), 1-11.
- 26 A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, C.E. Michos, J.A. Stratis "Time-based on-line preconcentration cold vapour generation procedure for ultra-trace mercury determination - with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry." *Anal. Bioanal. Chem.* **2004** (379), 764-769.
- 27 J. Vandegans, A.M. de Kersabiec, M. Hoenig. "Spectrométrie d'absorption atomique", *Techniques de l'ingénieur, traité Analyse et Caractérisation* (P 2825), 1-27.
- 28 J. Sanz, J. C. Raposo, J. Larreta, I. Martinez-Arkarazo, A. de Diego, J.M. Madariaga "On-line separation for the speciation of mercury in natural waters by flow injection-cold vapour-atomic absorption spectrometry." *J. Sep. Sci.* **2004** (27), 1202-1210.
- 29 R. Kellner, J.M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer. "Analytical Chemistry" *Wiley-VCH, Weinheim*, **1998**.
- 30 A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T. Gunlaugsson, A.J.M. Huxley, C.P. McCoy, J.T. Rademacher, T.E. Rice "Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches." *Chem. Rev.* **1997** (97), 1515-1566.
- 31 C. Krause, T. Werner, C. Huber, O.S. Wolfbeis. "Emulsion-Based Fluorosensors for Potassium Featuring Improved Stability and Signal Change", *Anal. Chem.* **1999** (23), 5304-5308.
- 32 P. Buhlmann, E. Pretsch, E. Bakker. "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors" *Chem. Rev.* **1998** (98), 1593-1687.
- 33 E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics", *Chem. Rev.* **1997** (97), 3083-3132.
- 34 M. Lu, K.E. Toghill, R.G. Compton "Simultaneous Detection of Trace Cadmium(II) and Lead(II) Using an Unmodified Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrode", *Electroanalysis* **2011** (23), 1089-1094.

- 35 O. Krystofova, L. Trnkova, V. Adam, J. Zehnalek, J. Hubalek, P. Babula, R. Kizek "Electrochemical Microsensors for the Detection of Cadmium(II) and Lead(II) Ions in Plants", Sensors **2010** (10), 5308-5328.
- 36 Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner "Trace determination of mercury by anodic stripping voltammetry at the rotating gold electrode", Anal. Chim. Acta **2000** (424), 65-76.
- 37 W. Liang, H.U. Qiufen, G. Yang, Y.I.N. Niayuan, Y. Zhuobin "Determination of lead, cadmium, and mercury by on-line enrichment followed by RP-HPLC", J. Anal. Chem. **2003** (58), 1054-1059
- 38 H.U. Qun, Y. Guangyu, M.A. Jing, L.I. Jikai "Simultaneous determination of tin, nickel, lead, cadmium and mercury in cigarette material by solid phase extraction and HPLC", Bull. Korean Chem. Soc. **2003** (24), 1433-1436.
- 39 P.C. do Nascimento, D. Bohrer, L.M. de Carvalho, C.E. Caon, E. Pilau, Z.B. Vendrame, R. Stefanello "Determination of cadmium, lead and thallium in highly saline hemodialysis solutions by potentiometric stripping analysis (PSA) ". Talanta **2005** (65), 954-959.
- 40 I. Cesarino, E.T.G. Cavalheiro, C.M.A. Brett, "Simultaneous Determination of Cadmium, Lead, Copper and Mercury Ions Using Organofunctionalized SBA-15 Nanostructured Silica Modified Graphite-Polyurethane Composite Electrode", Electroanalysis **2010** (22), 61-68.
- 41 Y. Yang, Z. Wang, M. Yang, M. Guo, Z. Wu, G. Shen, R. Yu "Inhibitive determination of mercury ion using a renewable urea biosensor based on self-assembled gold nanoparticles" Sensor. Actuat. B: Chem. **2006** (114), 1-8.
- 42 D. Pozebon, V.L. Dressler, A.J. Curtius "Determination of copper, cadmium, lead, bismuth and selenium(iv) in sea-water by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation", J. Anal. Atom. Spectrom. **1998** (13), 363-369.
- 43 T.-H. Lee, S.J. Jiang "Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry with microconcentric nebulization" Anal. Chim. Acta **2000** (413), 197-205.
- 44 Z. Fang, T. Guo, B. Welz "Determination of cadmium, lead and copper in water samples by flame atomic-absorption spectrometry with preconcentration by flow-injection on-line sorbent extraction" Talanta **1991** (38), 613-619.
- 45 E. Kopysc, K. Pyrzynska, S. Garbos, E. Bulska "Determination of Mercury by Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometry with Preconcentration on a Gold-Trap" Anal. Sci. **2000** (16), 1309-1312.
- 46 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "Lead and mercury sensing by calixarene-based fluoroionophores bearing two or four dansyl fluorophores." Chem.-a Eur. J. **2004** (10), 4480-4490.
- 47 C.-C. Huang, H.-T. Chang, "Selective Gold-Nanoparticle-Based Turn-On Fluorescent Sensors for Detection of Mercury(II) in Aqueous Solution" Anal. Chem. **2006** (78), 8332-8338.
- 48 M.H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly Selective and Sensitive Phosphane Sulfide Derivative for the Detection of Hg<sup>2+</sup> in an Organoaqueous Medium." Org. Lett. **2007** (9), 1133-1136.
- 49 M. Soibinet, V. Souchon, I. Leray, B. Valeur "Rhod-5N as a Fluorescent Molecular Sensor of Cadmium(II) Ion", J. Fluoresc. **2008** (18), 1077-1082.
- 50 T. Yang, Cheng, W. Zhu, Y. Xu, X. Qian "Highly Selective and Sensitive Near-Infrared Fluorescent Sensors for Cadmium in Aqueous Solution". Org. Lett. **2010** (13), 264-267
- 51 G.M. Whitesides "The origins and the future of microfluidics." Nature **2006** (442), 368-373.

- 52 Recherche effectuée sur le mot-clef *microfluidics* dans la base de données CPlus avec l'outil SciFinder Scholar le 12 juin 2008
- 53 P. Srisungsitthisunti, O.K. Ersoy, X. Xu, "Volume Fresnel zone plates fabricated by femtosecond laser direct writing", Appl. Phys. Lett. **2007** (90), 011104.
- 54 C. Khoury, G.A. Mensing, D.J. Beebe "Ultra rapid prototyping of microfluidic systems using liquid phase photopolymerization." Lab Chip **2002** (2), 50-55.
- 55 S.K. Sia, G.M. Whitesides "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies". Electrophoresis **2003** (24), 3563-3576.
- 56 E. Destandau, J.-P. Lefevre, A.C.F. Eddine, S. Desportes, M.C. Jullien, R. Hierle, I. Leray, B. Valeur "A novel microfluidic flow-injection analysis device with fluorescence detection for cation sensing. Application to potassium", Anal. Bioanal. Chem. **2007** (387), 2627-2632.
- 57 L. Zhao, T. Wu, J.-P. Lefèvre, I. Leray, J.A. Delaire, "Fluorimetric lead detection in a microfluidic device" Lab Chip **2009** (9), 2818-2823.
- 58 R. Mariella "Sample preparation: The weak link in microfluidics-based biodetection". Biomed. Microdev. **2008** (10), 777-784.
- 59 B. Valeur "Molecular Fluorescence. Principles and Applications", **2002**, Wiley-VCH: Weinheim.
- 60 B. Valeur, I. Leray "Calixarene-Based Fluorescent Molecular Sensors for Toxic Metals" Eur. J. Inorg. Chem. **2009**, 3525-3535.
- 61 Y.C. Hsieh, J.L. Chir, H.H. Wu, P.S. Chang, A. Wu "A sugar-aza-crown ether-based fluorescent sensor for  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ ." Carbohyd. Res. **2009** (344), 2236-2239.
- 62 M. Yuan, Y. Li, J. Li, C. Li, X. Liu, J. Lv, J. Xu, H. Liu, S. Wang, D. Zhu "A Colorimetric and Fluorometric Dual-Modal Assay for Mercury Ion by a Molecule." Org. Lett. **2007** (9), 2313-2316.
- 63 M. Mameli, V. Lippolis, C. Caltagirone, J.L. Capelo, O.N Faza, C. Lodeiro " $Hg^{2+}$  Detection by New Anthracene Pendant-Arm Derivatives of Mixed N/S- and N/S/O-Donor Macrocycles: Fluorescence, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Density Functional Theory Studies." Inorg. Chem. **2010** (49), 8276-8286.
- 64 L. Ma, H. Li, Y. Wu "A pyrene-containing fluorescent sensor with high selectivity for lead(II) ion in water with dual illustration of ground-state dimer." Sensor. Actuat. B: Chem. **2009** (143), 25-29.
- 65 B. Valeur, I. Leray "Ion-responsive supramolecular fluorescent systems based on multichromophoric calixarenes: A review." Inorg. Chim. Acta **2007** (360), 765-774.
- 66 D. Zhang, X. Cao, D.W. Purkiss, R.A. Bartsch "Di-ionizable *p*-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-3 ligands in cone and 1,2-alternate conformations: synthesis and metal ion extraction." Org. Biomol. Chem. **2007** (5), 1251-1259.
- 67 A. Ikeda, S. Shinkai "Novel cavity design using calixarene skeletons: Toward molecular recognition and metal binding." Chem. Rev. **1997** (97), 1713-1734.
- 68 A. Ikeda, S. Shinkai. "On the Origin of High Ionophoricity of 1,3-Alternate Calix 4 Arenes - Pi-Donor Participation in Complexation of Cations and Evidence for Metal-Tunneling through the Calix 4 Arene Cavity." J. Am. Chem. Soc. **1994** (116), 3102-3110.
- 69 K. Iwamoto, S. Shinkai "Syntheses and Ion Selectivity of All Conformational Isomers of Tetrakis((Ethoxycarbonyl)Methoxy)Calix[4]arene." J. Org. Chem. **1992** (57), 7066-7073.

- 70 M. H. Ha-Thi, V. Souchon, M. Penhoat, F. Miomandre, J.P. Genet, I. Leray, V. Michelet "Synthesis and photophysical properties of a star-shaped fluorescent phosphane sulfide." *Lett. Org. Chem.* **2007** (4), 185-188.
- 71 G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P.B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F.I. Wolf "8-Hydroxyquinoline derivatives as fluorescent sensors for magnesium in living cells." *J. Am. Chem. Soc.* **2006** (128), 344-350.
- 72 M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Falini "Solvent-Induced Modulation of Collective Photophysical Processes in Fluorescent Silica Nanoparticles." *J. Am. Chem. Soc.* **2002** (124), 13540-13546.
- 73 S.J. Lee, S.S. Lee, I.Y. Jeong, J.Y. Lee, J.H. Jung "Azobenzene coupled chromogenic receptors for the selective detection of copper(II) and its application as a chemosensor kit." *Tet. Lett.* **2007** (48), 393-396.
- 74 M. H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly selective and sensitive phosphane sulfide derivative for the detection of  $Hg^{2+}$  in an organoaqueous medium." *Org. Lett.* **2007** (9), 1133-1136.
- 75 C. P. Kulatilleke, S. A. de Silva, Y. Eliav "A coumarin based fluorescent photoinduced electron transfer cation sensor." *Polyhedron* **2006** (25), 2593-2596.
- 76 Z. Xu, K.-H. Baek, H.N. Kim, J.Cui, X. Qian, D.R. Spring, I. Shin, J. Yoon "Zn<sup>2+</sup>-Triggered Amide Tautomerization Produces a Highly Zn<sup>2+</sup>-Selective, Cell-Permeable, and Ratiometric Fluorescent Sensor." *J. Am. Chem. Soc.* **2010** (132), 601-610.
- 77 H. El-Gezawy, W. Rettig, R. Lapouyade "Solvatochromic behavior of donor-acceptor-polyenes: Dimethylamino-cyano-diphenylbutadiene." *J. Phys. Chem. A* **2006** (110), 67-75.
- 78 J. Bourson, J. Pouget, B. Valeur "Ion-Responsive Fluorescent Compounds .4. Effect of Cation Binding on the Photophysical Properties of a Coumarin Linked to Monoaza-Crown and Diaza-Crown Ethers." *J. Phys. Chem.* **1993** (97), 4552-4557.
- 79 B. Valeur, I. Leray "PCT (Photoinduced Charge Transfer) Fluorescent Molecular Sensors for Cation Recognition. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy, Applications to Chemical and Life Sciences.*" Berlin, Springer-Verlag Editors. **2001** 187-207.
- 80 M. Baruah, W. Qin, R.A.L. Vallée, D. Beljonne, T. Rohand, W. Dehaen, N. Boens "A Highly Potassium-Selective Ratiometric Fluorescent Indicator Based on BODIPY Azacrown Ether Excitable with Visible Light." *Org. Lett.* **2005** (7), 4377-4380.
- 81 H.H. Wang, L. Xue, Y.Y. Qian, H. Jiang "Novel Ratiometric Fluorescent Sensor for Silver Ions." *Org. Lett.* **2009** (12), 292-295.
- 82 M.M. Martin, P. Plaza, Y.H. Meyer, F. Badaoui, J. Bourson, J.P. Lefevre, B. Valeur "Steady-State and Picosecond Spectroscopy of Li<sup>+</sup> or Ca<sup>2+</sup> Complexes with a Crowned Merocyanine. Reversible Photorelease of Cations." *J. Phys. Chem.* **1996** (100), 6879-6888.
- 83 A.B. Othman, J.W. Lee, J.S. Wu, J.S. Kim, R. Abidi, P. Thuéry, J.M. Strub, A. Van Dorsselaer, J. Vicens "Calix[4]arene-Based, Hg<sup>2+</sup>-Induced Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Chemosensor." *J. Org. Chem.* **2007** (72), 7634-7640.
- 84 M.H. Lee, D.T. Quang, H.S. Jung, J. Yoon, C.H. Lee, J.S. Kim "Ion-Induced FRET On-Off in Fluorescent Calix[4]arene." *J. Org. Chem.* **2007** (72), 4242-4245.

- 85 C. Hou, Y. Xiong, N. Fu, C.C. Jacquot, T.C. Squier, H. Cao "Turn-on ratiometric fluorescent sensor for  $Pb^{2+}$  detection." *Tet. Lett.* **2011** (52), 2692-2696.
- 86 Y.C. Hsieh, J.L. Chir, H.H. Wu, P.S. Chang, A.T. Wu, A "A sugar-aza-crown ether-based fluorescent sensor for  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ ." *Carbohydr. Res.* **2009** (344), 2236-2239.
- 87 R. G. Pearson "Hard and Soft Acids and Bases." *J. Am. Chem. Soc.* **1963** (85), 3533-3539.
- 88 R. G. Pearson "Recent advances in the Concept of Hard and Soft Acids and Bases", *J. Chem. Edu.* **1987** (64), 561-567.
- 89 J.Y. Kwon, Y.J. Jang, Y.J. Lee, K.M. Kim, M.S. Seo, W. Nam, J. Yoon "A Highly Selective Fluorescent Chemosensor for  $Pb^{2+}$ ." *J. Am. Chem. Soc.* **2005** (127), 10107-10111.
- 90 G.G. Talanova, N.S.A. Elkarim, V.S. Talanov, R.A. Bartsch "A calixarene-based fluorogenic reagent for selective mercury(II) recognition." *Anal. Chem.* **1999** (71), 3106-3109.
- 91 S.K. Kim, S.H. Lee, J.Y. Lee, R.A. Bartsch, J.S. Kim "An excimer-based, binuclear, on-off switchable calix[4]crown chemosensor". *J. Am. Chem. Soc.* **2004** (126), 16499-16506.
- 92 E.M. Nolan, S.J. Lippard "Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion". *Chem. Rev.* **2008** (108), 3443-3480.
- 93 Y.F. Cheng, D.T. Zhao, M. Zhang, Z.Q. Liu, Y.F. Zhou, T.M. Shu, F.Y. Li, T. Yi, C.H. Huang "Azo 8-hydroxyquinoline benzoate as selective chromogenic chemosensor for  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ ." *Tet. Lett.* **2006** (47), 6413-6416.
- 94 E.M. Nolan, S.J. Lippard "A "Turn-On" fluorescent sensor for the selective detection of mercuric ion in aqueous media." *J. Am. Chem. Soc.* **2003** (125), 14270-14271.
- 95 X.F. Guo, X.H. Qian, L.H. Jia "A highly selective and sensitive fluorescent chemosensor for  $Hg^{2+}$  in neutral buffer aqueous solution." *J. Am. Chem. Soc.* **2004** (126), 2272-2273.
- 96 A.B. Descalzo, R. Martinez-Manez, R. Radeglia, K. Rurack, J. Soto "Coupling Selectivity with Sensitivity in an Integrated Chemosensor Framework: Design of a  $Hg^{2+}$  Responsive Probe, Operating above 500 nm." *J. Am. Chem. Soc.* **2003** (125), 3418-3419.
- 97 Q.Y. Chen, C.F. Chen "A new  $Hg^{2+}$ -selective fluorescent sensor based on a dansyl amide-armed calix[4]-aza-crown." *Tet. Lett.* **2005** (46), 165-168.
- 98 Y.K. Yang, K.J. Yook, J. Tae "A rhodamine-based fluorescent and colorimetric chemodosimeter for the rapid detection of  $Hg^{2+}$  ions in aqueous media". *J. Am. Chem. Soc.* **2005** (127), 16760-16761.
- 99 J.F. Zhang, C.S. Lim, B.R. Cho, J.S. Kim "A two-photon excited luminescence of water-soluble rhodamine-platinum (II) complex: Fluorescent probe specific for  $Hg^{2+}$  detection in live cell". *Talanta* **2010** (83), 658-662.
- 100 I. Samb, J. Bell, P.Y. Toullec, I. Leray, V. Michelet "Fluorescent Phosphane Selenide As Efficient Mercury Chemodosimeter." *Org. Lett.* **2011** (13), 1182-1185.
- 101 V. Souchon, O. David, I. Leray, J. Xie, B. Valeur "Photophysics of cyclic multichromophoric systems based on  $\beta$ -cyclodextrin and calix[4]arene with appended pyridin-2'-yl-1,2,3-triazole groups." *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008** (7), 1323-1331.
- 102 Y. Zhou, Y. Xiao, X. Qian "A highly selective  $Cd^{2+}$  sensor of naphthyridine: fluorescent enhancement and red-shift by the synergistic action of forming binuclear complex." *Tet. Lett.* **2008** (49), 3380-3384.



- 
- 103 M. Taki, M. Desaki, A. Ojida, S. Iyoshi, T. Hirayama, I. Hamachi, Y. Yamamoto "Fluorescence Imaging of Intracellular Cadmium Using a Dual-Excitation Ratiometric Chemosensor". J. Am. Chem. Soc. **2008** (130), 12564-12565.
- 104 L. Xue, G. Li, Q. Liu, H. Wang, C. Liu, X. Ding, S. He, H. Jiang, "Ratiometric Fluorescent Sensor Based on Inhibition of Resonance for Detection of Cadmium in Aqueous Solution and Living Cells". Inorg. Chem. **2011** (50), 3680-3690.
- 105 Z. Xu, K.H Baek, H.N Kim, J. Cui, X. Qian, D.R Spring, I. Shin, J. Yoon "Zn<sup>2+</sup>-Triggered Amide Tautomerization Produces a Highly Zn<sup>2+</sup>-Selective, Cell-Permeable, and Ratiometric Fluorescent Sensor". J. Am. Chem. Soc. **2010** (132), 601-610.
- 106 W. Liu, L. Xu, R. Sheng, P. Wang, H. Li, S. Wu "A Water-Soluble "Switching On" Fluorescent Chemosensor of Selectivity to Cd<sup>2+</sup>." Org. Lett. **2007** (9), 3829-3832.
- 107 T. Cheng, Y. Xu, S. Zhang, W. Zhu, X. Qian, L. Duan "A Highly Sensitive and Selective OFF-ON Fluorescent Sensor for Cadmium in Aqueous Solution and Living Cell." J. Am. Chem. Soc. **2008** (130), 16160-16161.

The background of the slide is a fluorescence microscopy image showing a dense population of cells. The cells exhibit a mix of blue and red fluorescence, suggesting the presence of different markers or dyes. The overall appearance is that of a complex, interconnected network of cells, possibly in a microfluidic or tissue-like environment. The lighting is dark, highlighting the bright spots of fluorescence.

**Chapitre II : Détection du  
cadmium par le Rhod-5N dans  
un dispositif microfluidique**



# Chapitre II : Détection du cadmium par le Rhod-5N dans un dispositif microfluidique

## Sommaire

|  |    |
|--|----|
| Sommaire .....   | 57 |
| Introduction .....   | 58 |
| I. Présentation de la sonde Rhod-5N .....  | 58 |
| II. Etudes spectroscopiques de Rhod-5N en solution .....   | 60 |
| II.1. Complexation du cadmium par Rhod-5N .....  | 60 |
| II.2. Sélectivité du ligand Rhod-5N .....  | 62 |
| III. Complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique.....                           | 63 |
| III.1. Dosage du cadmium en fonction de la longueur du circuit .....                                 | 64 |
| III.1.a. Dosage du cadmium en circuit court .....  | 65 |
| III.1.b. Dosage du cadmium en circuit long .....   | 66 |
| III.1.c. Courbe de calibration du Rhod-5N en circuit microfluidique .....                            | 67 |
| III.1.d. Interférence du plomb en circuit microfluidique .....                                       | 68 |
| III.1.e. Complexation du Cd <sup>2+</sup> et du Pb <sup>2+</sup> en mélange interne et externe ..... | 69 |
| III.2. Discrimination du cadmium et plomb par préconcentration.....                                  | 71 |
| III.2.a. Utilisation d' un préconcentrateur de cations .....   | 71 |
| III.2.b. Discrimination du cadmium et plomb par préconcentration .....                               | 73 |
| III.2.c. Isotherme d'adsorption du cadmium .....   | 74 |
| III.2.d. Efficacité d'adsorption du plomb et du cadmium.....   | 75 |
| Conclusion .....   | 78 |
| Références bibliographiques .....  | 79 |

# Introduction

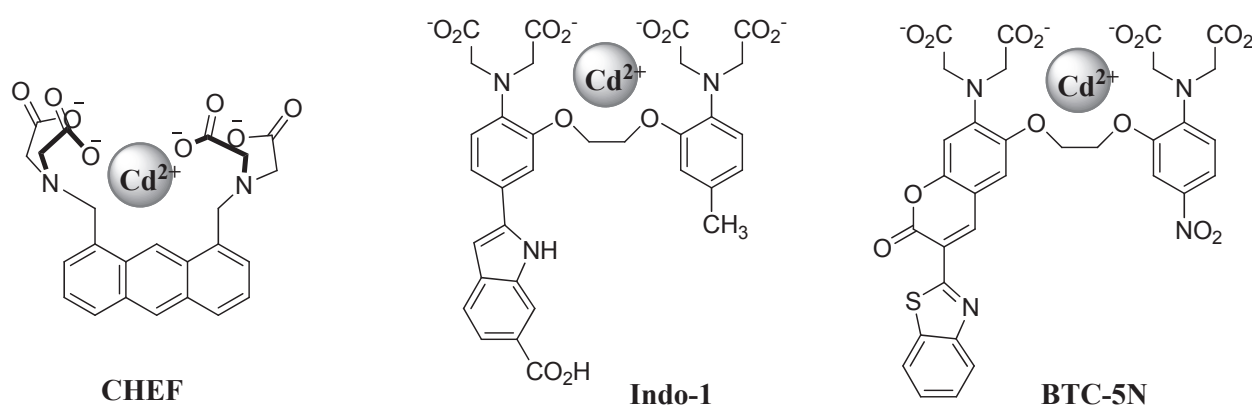
Le cadmium, comme la plupart des métaux lourds, est considéré comme un élément très toxique. A cause de sa forte toxicité et de sa teneur croissante dans l'environnement, cet élément mérite d'être étudié en détail pour limiter sa propagation dans l'organisme. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, de nombreux ligands ont été mis au point pour la détection du cadmium en milieu aqueux. La limite de détection obtenue pour la plupart des sondes spécifiques au cadmium est encore supérieure à celle imposée dans les eaux de consommation en Europe en 2018 (0,2 µg/L).<sup>1</sup> Malgré une très bonne solubilité dans l'eau, la plupart des ligands décrits dans la littérature ne sont pas sélectifs du cadmium ; on observe principalement l'interférence du zinc.<sup>2,3,4,5</sup> La difficulté de conception d'un ligand sélectif du cadmium est due à sa structure électronique qui est très proche de celle du zinc. Devant cette difficulté d'élaborer un ligand sensible et sélectif au cadmium, notre choix s'est porté sur le Rhod-5N ; un composé fluorescent commercialisé par la société Invitrogen. L'entité complexante du Rhod-5N est un groupement tétraacide du type BAPTA (1,2-Bis(2 AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid). Des études de complexation du cadmium en solution effectuées au laboratoire révèlent une très bonne sensibilité en milieu aqueux.<sup>6</sup>

## I. Présentation de la sonde Rhod-5N

Les structures à base de tétraacides, notamment l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) et l'acide éthylène glycol bis(β-aminoéthyle éther)-N-N' tétracétique ont été étudiées en 1976 par Lebel et Poisson<sup>7,8</sup> pour la titration du magnésium et du calcium dans les eaux de mer. En 1989, Tsien *et al.* ont mis au point des molécules dont l'entité complexante est une pince du type BAPTA, pour le dosage du calcium dans les eaux de mer.<sup>9,10</sup> Il faut également rappeler que ces sondes ont été utilisées pour déterminer des concentrations élevées de K<sup>+</sup> et de Ca<sup>2+</sup> en milieu marin ou physiologique, d'où l'idée de tester ces molécules pour la détection des métaux lourds.

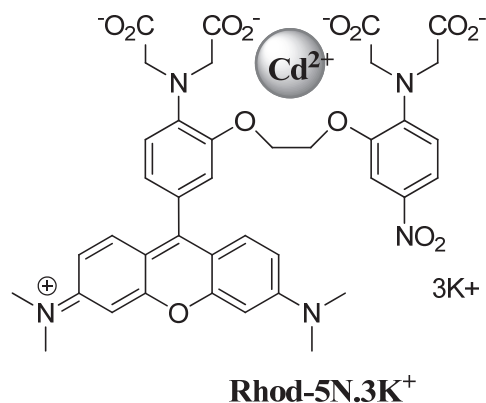
L'idée de doser le cadmium par une molécule fluorescente dont l'entité complexante est un tétraacide est aussi développée par Yoon *et al.*<sup>11</sup> La sonde utilisée est un fluoroionophore constitué d'un groupement anthracène substitué par quatre fonctions acide carboxylique : CHEF (Schéma II-1). En présence d'une quantité croissante de cadmium, on observe une exaltation de la fluorescence due à l'inhibition du transfert d'électron de l'entité complexante (amine) vers le chromophore (anthracène). Une interférence des ions Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> est principalement observée. L'efficacité de la complexation d'un cation dépend fortement de la stabilité des complexes formés avec le ligand, donc de la nature et de la position des substituants. Ainsi, des études de complexation du cadmium par le composé Indo-1 (Schéma II-1) ont été effectuées. Cette

molécule est constituée par une entité complexante de type BAPTA substituée en position 5 du second cycle phényle de la pince par un groupement méthyle. Une limite de détection de 11,2  $\mu\text{g/L}$  est obtenue pour une concentration de calcium et de potassium dans le milieu inférieure à 1  $\mu\text{M}$ .<sup>12</sup> Par ailleurs, Lindberg *et al.* ont étudié les propriétés de complexation du cadmium par le dérivé BTC-5N (Schéma II-1). Cette molécule est un analogue du composé Indo-1 ; elle est obtenue par substitution du groupement méthyle (position 5, électrodonneur) par un groupement nitro (électroattracteur).<sup>13,14</sup> En présence d'une quantité croissante de cadmium en milieu intracellulaire, une exaltation de la fluorescence est observée. Une limite de détection de 3  $\mu\text{g/L}$  très inférieure à celle observée avec le dérivé Indo-1 est obtenue.<sup>15</sup> Bien que la sélectivité vis-à-vis des ions  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  ne soit pas excellente, les molécules possédant la même entité complexante que le BTC-5N méritent d'être étudiées pour la complexation du cadmium.



**Schéma II-1** : Exemples de fluoroionophores à base de tétraacide pour la complexation du cadmium en milieu aqueux.

Le fluoroionophore Rhod-5N (voir sa structure sur le Schéma II-2) est un composé commercialisé sous forme de sel de potassium, ce qui lui confère une très bonne solubilité en milieu aqueux. Cette molécule est commercialisée pour déterminer des concentrations de cadmium comprises entre 0,1 et 1 mM, en milieu marin et physiologique.<sup>16</sup> Par analogie avec le composé BTC-5N utilisé pour la détection du cadmium en milieu intracellulaire, celui-ci possède un site de complexation identique. De plus, le substituant nitro en position 5 du phényle responsable de la grande stabilité du complexe formé avec le calcium<sup>17</sup> pourrait conférer une meilleure affinité pour le cadmium. Dans cette optique, le Rhod-5-N. $3\text{K}^+$  a été étudié au laboratoire pour la complexation du cadmium. A l'exception du plomb, une très bonne sélectivité vis-à-vis des autres cations interférents est obtenue. Une faible limite de détection de l'ordre de 3,1  $\mu\text{g/L}$  est atteinte.<sup>6</sup> Le Schéma II-2 ci-dessous présente la structure du complexe formé avec le Rhod-5N. L'avantage de cette sonde provient du fait que le chromophore rhodamine permet une excitation de la molécule vers le visible, ce qui s'avère très intéressant pour la détection en circuit microfluidique.



*Schéma II-2 : Structure du complexe formé lors du dosage du cadmium par le Rhod-5N en milieu aqueux.*

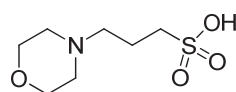
Donc l'objectif de ce chapitre consiste d'abord à étudier les propriétés de complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique. Puis, dans une deuxième partie du travail, nous tenterons de discriminer le cadmium du plomb ; celui-ci constituant le principal cation interférent.

## II. Etudes spectroscopiques de Rhod-5N en solution

L'étude de la complexation du cadmium par Rhod-5N en solution a été effectuée au laboratoire.<sup>6</sup> Les études de complexation en absorption comme en émission ont été réalisées en milieu aqueux tamponné par le MOPS à 10 mM équilibré à pH 7 par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH).

### II.1. Complexation du cadmium par Rhod-5N

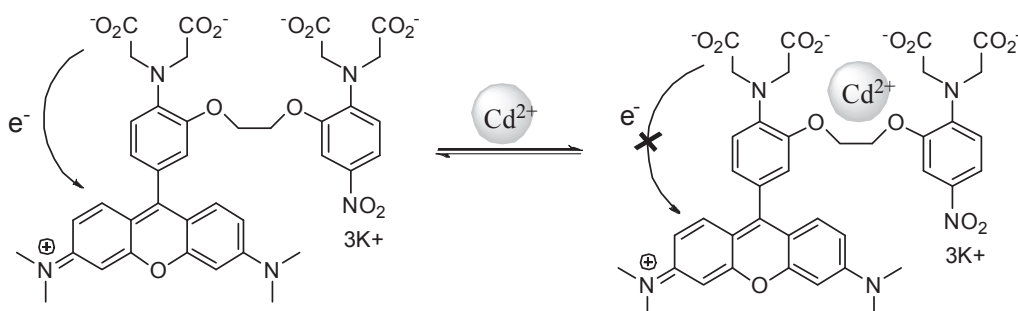
Le spectre d'absorption du composé Rhod-5N libre présente une bande d'absorption avec un maximum à 550 nm caractéristique du fluorophore Rhodamine. Quant au spectre d'émission, un faible déplacement de Stokes d'environ 26 nm est obtenu. La mesure du rendement quantique de fluorescence est très difficile à cause des conditions d'étude choisies. En effet, le tampon MOPS-KOH présenté sur le Schéma II-3 contient des ions K<sup>+</sup> qui peuvent être complexés par le Rhod-5N.



*Schéma II-3 : Structure du MOPS : acide 3-morpholinopropanesulfonique.*

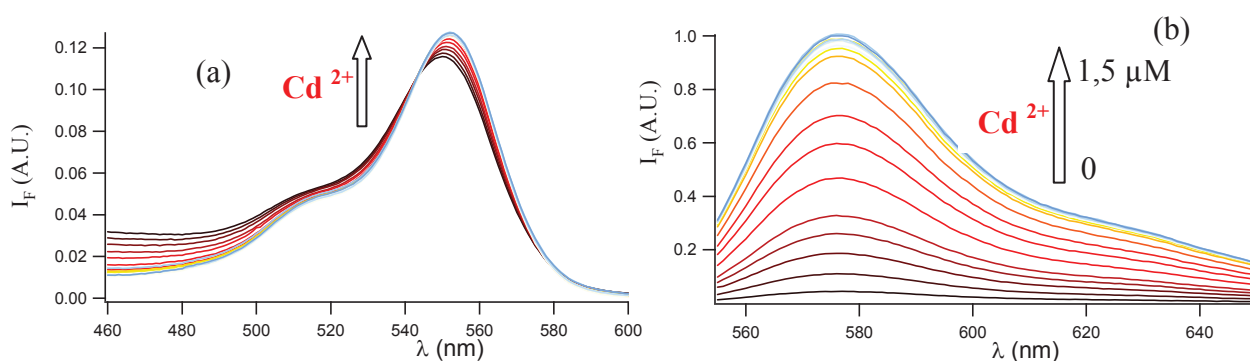
Une mesure du rendement quantique de fluorescence dans ces conditions, a conduit à une valeur de  $\Phi = 0,015$ . Pour avoir une valeur plus précise, une solution d'EDTA est ajoutée pour complexer les ions  $K^+$ . Le rendement quantique de fluorescence mesuré à nouveau est de l'ordre de 0,002 ; ce rendement est donc très faible.

En présence d'une quantité croissante de cadmium, une exaltation de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un léger déplacement bathochrome de 4 nm sont observés. En effet, la complexation du cation  $Cd^{2+}$  par la pince BAPTA inhibe le processus de transfert d'électron de l'atome d'azote du BAPTA vers le chromophore rhodamine. Cette inhibition du transfert d'électron (Schéma II-4) est responsable de l'exaltation de la fluorescence observée.



**Schéma II-4** : Inhibition du processus de transfert d'électron en présence de cadmium.

La Figure II-1 ci-dessous présente l'évolution des spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence (figure b) du Rhod-5N en présence d'une quantité croissante de cadmium.

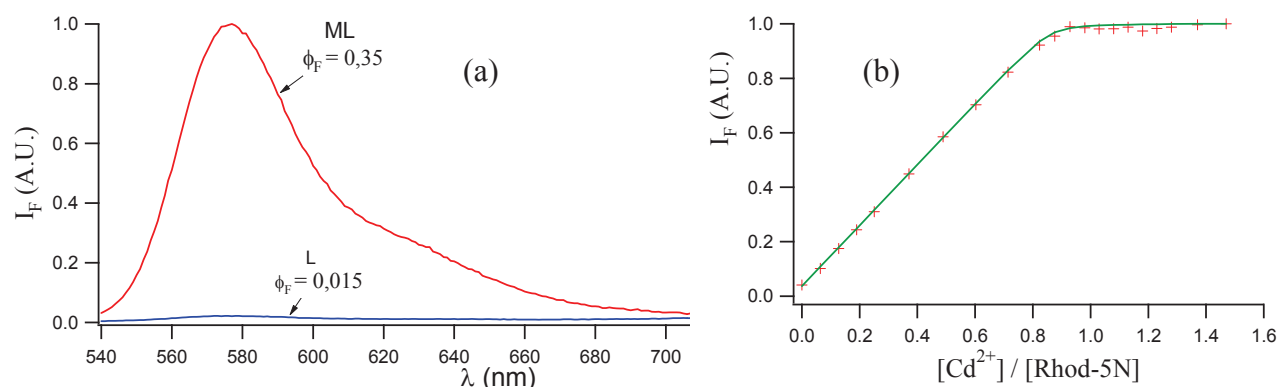


**Figure II-1** : Evolution des spectres d'absorption  $[Rhod-5N] = 1,2 \mu M$  (figure a), et de fluorescence corrigé  $[Rhod-5N] = 0,9 \mu M$  (figure b), tampon MOPS-KOH à  $pH = 7$  par ajout croissant de perchlorate de cadmium.<sup>6</sup>

L'ajustement numérique des faisceaux de courbes de fluorescence à l'aide du logiciel SPECFIT<sup>TM</sup> est compatible avec la formation d'un complexe (Figure II-2-a) de stœchiométrie 1:1 : un cation  $Cd^{2+}$  est complexé par une molécule de Rhod-5N. La Figure II-2-b montre l'évolution de l'intensité de fluorescence du Rhod-5N en fonction de la concentration de cadmium ajoutée. A partir d'un équivalent de cadmium, aucune variation de l'intensité de fluorescence n'est observée. La constante de complexation correspondante est élevée ( $\log K_{1:1} = 8,85 \pm 0,05$ ). Par



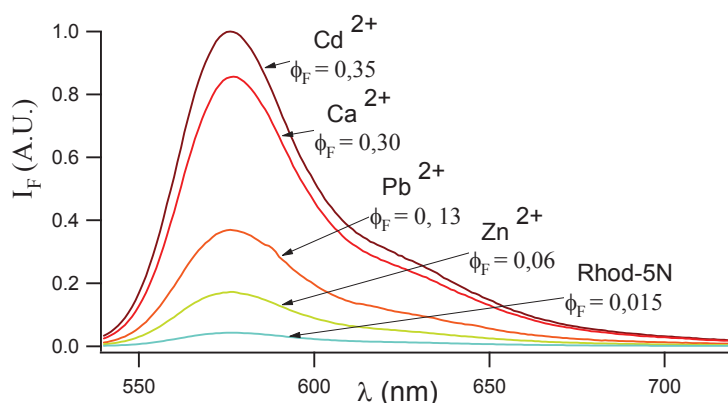
des mesures de fluorescence dans un spectrofluorimètre classique, une très faible quantité de cadmium peut être détectée avec une limite de détection de 3,1  $\mu\text{g/L}$ .<sup>6</sup>



**Figure II-2 :** Spectres de fluorescence du ligand Rhod-5N et du complexe ML (figure a) et courbe de calibration (figure b) à 576 nm  $[\text{Rhod-5N}] = 0,9 \mu\text{M}$ , tampon MOPS-KOH à pH = 7.<sup>6</sup>

## II.2. Sélectivité du ligand Rhod-5N

La sélectivité du Rhod-5N vis-à-vis de certains cations interférents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  a aussi été étudiée au laboratoire. Pour une concentration inférieure au millimolaire, aucune interférence significative des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  n'a été observée. Cependant, comme on peut le voir sur la Figure II-3 ci-dessous, les cations divalents testés interfèrent avec le  $\text{Cd}^{2+}$ . On observe principalement une interférence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ . Contrairement à la plupart des ligands décrits dans la littérature, une faible interférence des ions  $\text{Zn}^{2+}$  est observée.



**Figure II-3 :** Spectres de fluorescence des complexes formés par le Rhod-5N avec les cations interférents  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  en milieu tamponné par le MOPS-KOH à pH = 7.<sup>6</sup>

En effet, le complexe formé avec le calcium n'est pas stable, la constante de complexation apparente associée est de  $\log K_{1:1} = 4,20 \pm 0,25$ . Le rapport des constantes de complexation  $K(\text{Cd}^{2+})/K(\text{Ca}^{2+})$  est très supérieur à  $10^3$ . Ce rapport signifie que dans les conditions d'étude utilisées, nous avons une bonne sélectivité vis-à-vis du calcium. Le rapport des constantes de complexation  $K(\text{Cd}^{2+})/K(\text{Zn}^{2+})$  est particulièrement intéressant. Ce rapport est supérieur d'un facteur  $10^3$  comparé à celui donné pour la plupart des sondes du même type.<sup>18,2</sup> En revanche, si le

Rhod5-N est sélectif face au zinc et au calcium, tel n'est pas le cas avec le plomb. La constante de complexation du complexe formé avec le plomb est relativement stable  $\log K_{1:1} = 7,95 \pm 0,06$  et le rapport  $K(\text{Cd}^{2+})/K(\text{Pb}^{2+})$  correspondant est très inférieur à  $10^3$  : cette valeur est de 8. Le tableau ci-dessous est un résumé des propriétés photophysiques du Rhod-5N et des complexes formés avec les cations interférents étudiés.

| Cations          | Log Kapp        | Sélectivité<br>$K(\text{Cd}^{2+})/K(\text{M}^{2+})$ | $\Phi_F$ |
|------------------|-----------------|---|----------|
| Rhod-5N          | -               | -   | 0,002    |
| $\text{Ca}^{2+}$ | $4,20 \pm 0,02$ | $4,5 \times 10^4$                                   | 0,30     |
| $\text{Zn}^{2+}$ | $5,55 \pm 0,01$ | $2,0 \times 10^4$                                   | 0,06     |
| $\text{Pb}^{2+}$ | $7,95 \pm 0,06$ | 8   | 0,13     |
| $\text{Cd}^{2+}$ | $8,85 \pm 0,02$ | -   | 0,35     |

*Tableau II-1 : Sélectivité du Rhod-5N par rapport aux cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  en milieu aqueux tamponné par le MOPS à  $\text{pH} = 7$ .*

### III. Complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique.

Malgré l'interférence des ions  $\text{Pb}^{2+}$  en solution, nous avons étudié la complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique. Les circuits microfluidiques utilisés sont fabriqués selon le protocole décrit sur le paragraphe VI de la partie expérimentale. Le principe de détection du cadmium en circuit microfluidique est décrit sur la Figure II-4 ci-dessous. Celui-ci consiste à introduire à l'aide d'un pousse seringue dans l'une des deux entrées du circuit microfluidique une concentration fixe de ligand. Dans la deuxième entrée, une concentration variable de l'analyte est introduite. La complexation du métal par le Rhod-5N se fait tout au long du circuit microfluidique. A la sortie du circuit, le complexe formé est excité à l'aide de deux fibres optiques ( $\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ ) incorporées dans le substrat de PDMS. Un filtre chromatique passe-haut est placé devant le photomultiplicateur pour diminuer la lumière parasite venant de la LED excitatrice. L'intensité de fluorescence correspondante est mesurée par le détecteur placé à la sortie du circuit. Le signal est ensuite numérisé et traité par ordinateur.

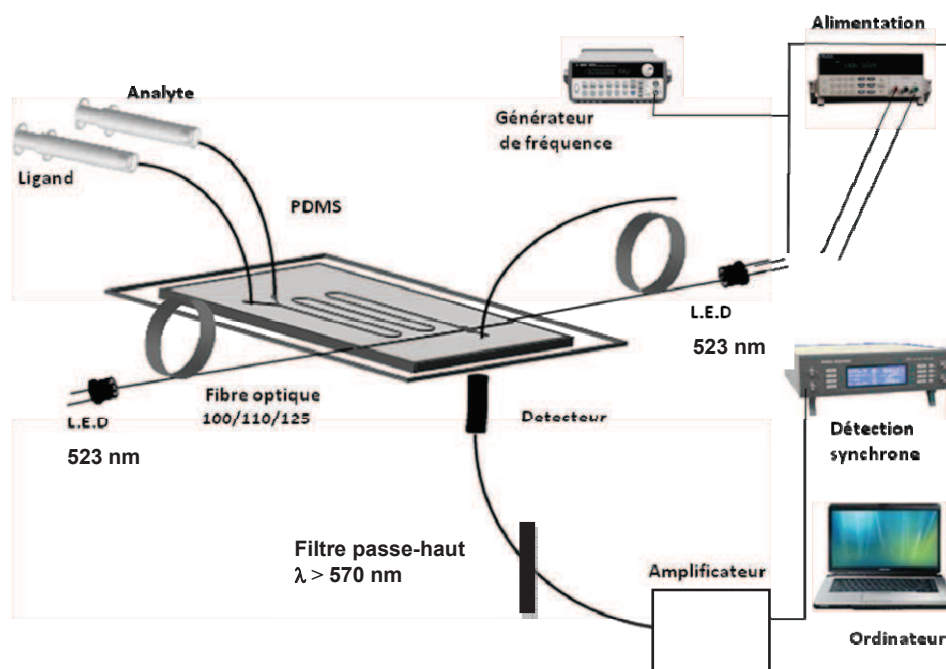
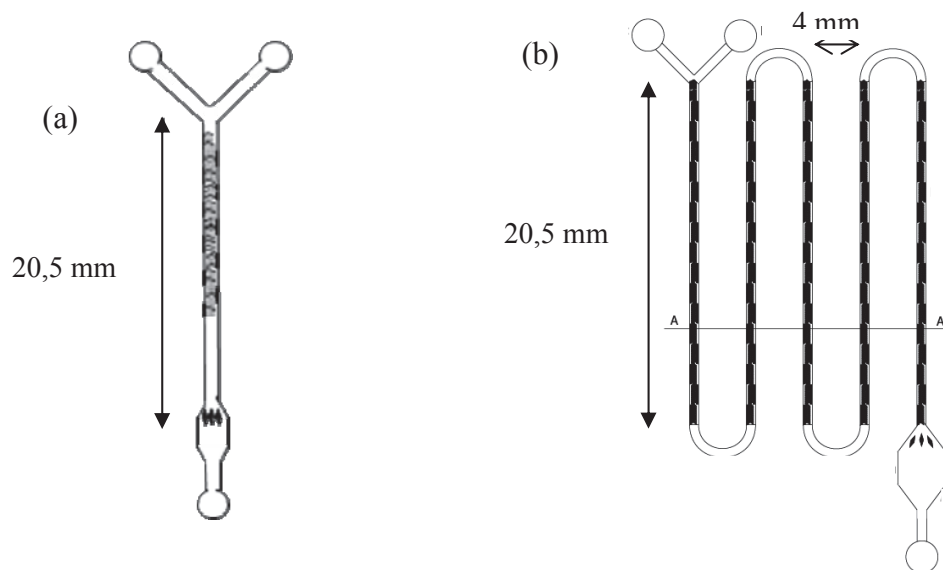


Figure II-4 : Schéma de principe du dosage du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique.

### III.1. Dosage du cadmium en fonction de la longueur du circuit

Afin d'étudier l'efficacité de la complexation du cadmium par le Rhod-5N en circuit microfluidique, nous avons effectué la réaction de complexation dans un circuit court (Figure II-5-a) et un circuit long (Figure II-5-b). La longueur du canal du circuit court est de 2,2 cm, alors que celle du circuit long est de 13 cm.<sup>19</sup> La variation de la longueur du circuit permet de faire varier le temps de résidence du mélange réactionnel dans le canal, avant la détection de la fluorescence en sortie de canal. Pour le débit choisi de 0,25 mL/h, le temps de résidence varie entre 8,8 secondes pour le circuit court et 40 secondes pour le circuit long. Comme la réaction de complexation a lieu entre des solutions très diluées, le temps nécessaire à la réaction peut être long, or il est important que la réaction ait atteint l'équilibre en sortie de canal. Plus le circuit est long, plus il est probable que l'équilibre soit atteint. Il est donc important de vérifier l'influence de la longueur du circuit.

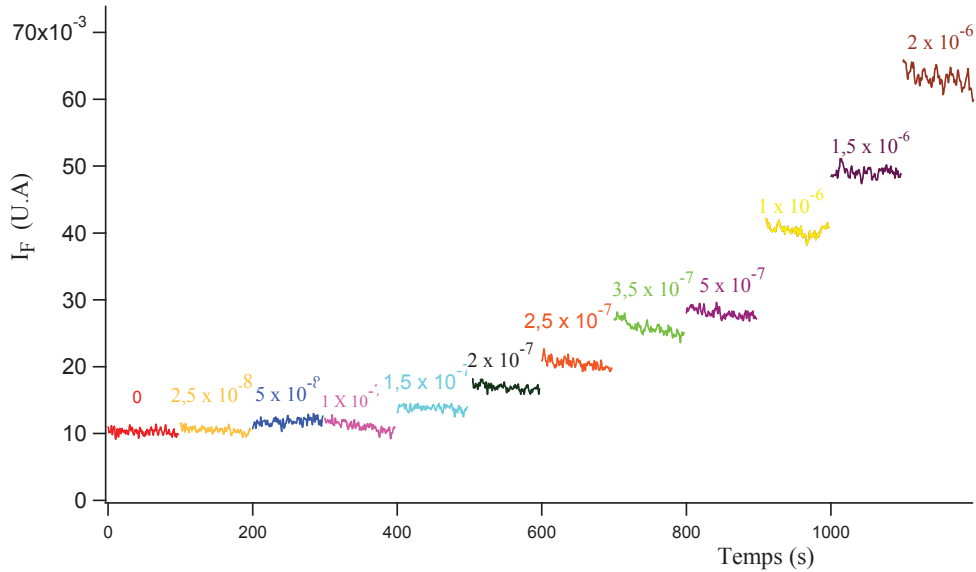
Comme en solution, le dosage du cadmium par le Rhod-5N est effectué en milieu aqueux tamponné à pH = 7 par le MOPS.



**Figure II-5 :** Circuit court (figure a) et circuit long (figure b) utilisés pour la complexation du cadmium par le Rhod-5N.

### III.1.a. Dosage du cadmium en circuit court

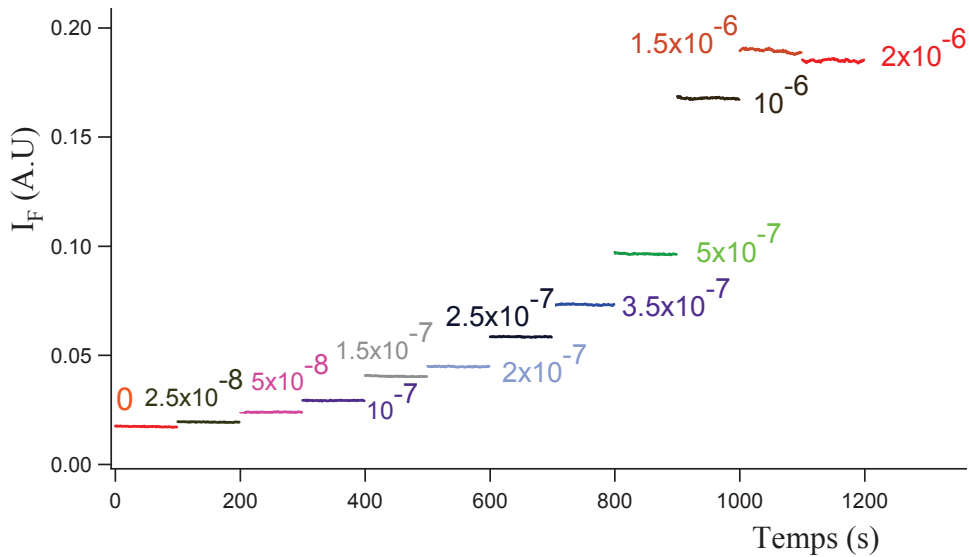
Nous avons d'abord étudié la complexation du cadmium par le Rhod-5N à une concentration de  $10^{-6}$  mol/L dans le circuit microfluidique court (Figure II-5-a). L'utilisation d'un circuit court permet d'avoir un court temps de transit de l'analyte, donc un gain de temps pour des expériences de routine. En présence d'une quantité croissante de perchlorate de cadmium dans le circuit microfluidique, une exaltation de l'intensité de fluorescence est observée. Comme en solution, l'exaltation de l'intensité de fluorescence observée en circuit microfluidique (Figure II-6) est due à une inhibition du transfert d'électron de l'entité complexante de type BAPTA vers le chromophore (rhodamine) du Rhod-5N. Comme on peut le constater, le bruit est assez important. Nous l'interprétons comme la conséquence d'un mélange insuffisamment homogène des réactifs à la sortie du canal. Pour augmenter le rapport signal / brut, nous nous sommes intéressés à augmenter le temps de transit des analytes dans le canal du circuit microfluidique. Ceci est réalisé en effectuant la complexation du cadmium par le Rhod-5N dans le circuit long.



**Figure II-6 :** Variation de l'intensité de fluorescence du Rhod-5N à  $C = 10^{-6}$  M en présence d'une quantité croissante de perchlorate de cadmium dans le circuit microfluidique court à  $\text{pH} = 7$  tamponné par le MOPS.

### III.1.b. Dosage du cadmium en circuit long

Afin d'avoir une meilleure stabilité du rapport Signal/bruit, nous avons aussi effectué la complexation du cadmium par le Rhod-5N à  $C = 10^{-6}$  M dans le circuit microfluidique long (Figure II-5-b). Comme en circuit court, la présence d'une quantité croissante de perchlorate de cadmium dans le circuit entraîne une exaltation de l'intensité de fluorescence (Figure II-7). Deux régimes sont principalement observés : pour une concentration de cadmium comprise entre  $2 \times 10^{-8}$  et  $10^{-6}$  mol/L l'exaltation de la fluorescence observée est de plus en plus importante. En fin de dosage, c'est-à-dire pour une concentration de cadmium comprise entre  $1,5 \times 10^{-6}$  et  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, aucune variation significative de l'intensité de fluorescence n'est observée. Ce plateau observé correspond à une situation où tous les sites de complexation du Rhod-5N sont occupés par les ions  $\text{Cd}^{2+}$ . En effet, il est atteint lorsque la concentration en cadmium ajouté est égale à la concentration du ligand Rhod-5N, ce qui correspond à la stœchiométrie 1:1 observée pour le complexe en solution. Par ailleurs, on notera l'excellente stabilité des signaux qui résulte d'un mélange parfaitement homogène réalisé dans le canal long. Le très bon rapport signal/bruit conduira à une très bonne sensibilité du ligand Rhod-5N.



**Figure II-7 :** Variation de l'intensité de fluorescence du Rhod-5N à  $C = 10^{-6}M$  en présence d'une quantité croissante de perchlorate de cadmium dans le circuit microfluidique long à  $pH = 7$  tamponné par le MOPS.

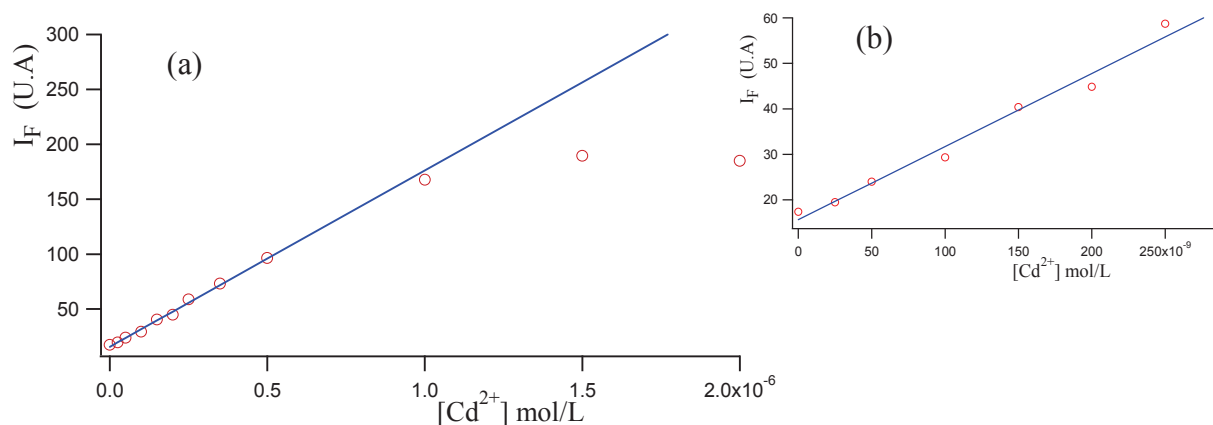
### III.1.c. Courbe de calibration du Rhod-5N en circuit microfluidique

La courbe de calibration de l'intensité de fluorescence du Rhod-5N en fonction de la concentration de cadmium ajoutée obtenue avec le circuit long, est linéaire jusqu'à une concentration de cadmium voisine à celle du Rhod-5N (Figure II-8-a). Pour une concentration de cadmium inférieure à  $1 \times 10^{-6}$  mol/L, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence proportionnelle à la concentration de perchlorate de cadmium ajoutée Figure II-8-b). L'équation ci-dessous permet d'accéder à la concentration de cadmium dans la zone de linéarité de la courbe de calibration du Rhod-5N.

$$[Cd^{2+}] \text{ mol/L} = 7 \times 10^{-9} \times I_{F(U.A)} - 1 \times 10^{-7} \quad \text{éq II-1}$$

Avec  $R^2 = 0,9973$

A partir d'un équivalent de cadmium ( $[Cd^{2+}] = 1 \times 10^{-6}$  mol/L), aucune évolution de significative de la fluorescence n'est observée. Ce plateau observé est caractéristique de l'équilibre du complexe formé de stœchiométrie ML : un atome de cadmium est complexé avec une molécule de Rhod-5N.

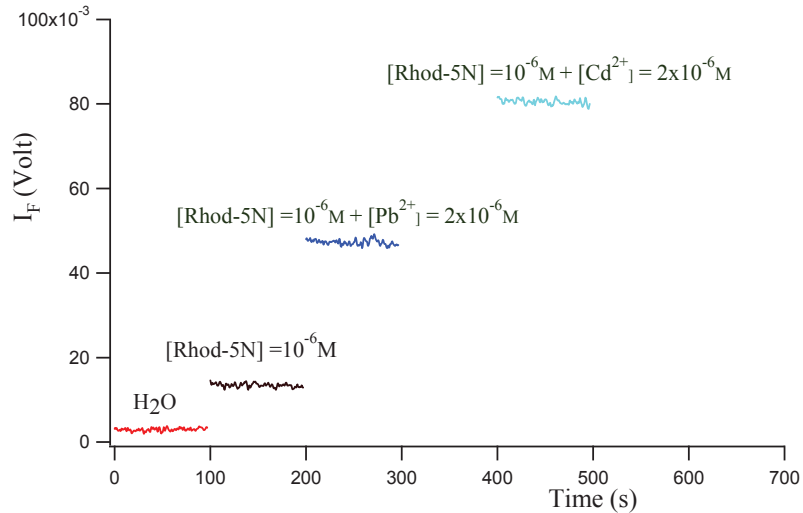


**Figure II-8** : Courbe de calibration du dosage du cadmium par le Rhod-5N à une concentration de  $C = 10^{-6}$  mol/L (figure a) et agrandissement de la partie linéaire de la courbe (figure b).

La limite de détection est déterminée pour une intensité de fluorescence qui est supérieure à l'intensité de référence (Rhod-5N seul) d'une quantité égale à trois fois l'écart-type du signal. Elle a été déterminée égale à  $2 \times 10^{-9}$  mol/L dans le canal soit  $4 \times 10^{-9}$  mol/L (soit  $0,45 \mu\text{g/L}$ ) pour la solution de cadmium introduite, compte-tenu de la dilution d'un facteur 2 pour la sonde fluorescente. Cette limite est inférieure à la concentration maximale admissible fixée par l'union européenne qui est aujourd'hui de  $5 \mu\text{g/L}$ .<sup>20</sup>

### III.1.d. Interférence du plomb en circuit microfluidique

Le plomb est le principal cation interférent observé lors du dosage du cadmium par le Rhod-5N en solution (paragraphe II.2). Etant donné que l'efficacité de la complexation dépend de la taille du circuit (comparaison de la Figure II-6 et la Figure II-7), nous avons étudié l'interférence du plomb en circuit microfluidique court. En effet, si les temps de complexation du plomb et du cadmium sont suffisamment différents, on peut discriminer ces derniers en circuit court. En présence de deux équivalents d'une solution de perchlorate de plomb ou de cadmium, on observe une exaltation de l'intensité de fluorescence (Figure II-9). Le signal du complexe formé avec les ions  $Pb^{2+}$  est 3,5 fois plus intense que celui du ligand Rhod-5N libre. Quant à celui du complexe formé avec les ions  $Cd^{2+}$ , l'intensité de la fluorescence correspondante est 6 fois supérieure à celle du Rhod-5N libre. Si on compare la fluorescence du complexe formé avec les ions  $Pb^{2+}$  à celle formée avec les ions  $Cd^{2+}$ , cette dernière est 1,7 fois plus intense. Malgré une bonne complexation du cadmium par le Rhod-5N dans le circuit court, l'interférence des ions  $Pb^{2+}$  n'est pas négligeable.



**Figure II-9 :** Interférence des ions  $Pb^{2+}$  à une concentration de  $2 \times 10^{-6}$  mol/L en circuit microfluidique court, pour une concentration de Rhod-5N =  $10^{-6}$  mol/L.

Le tableau ci-dessous est un récapitulatif de l'intensité de fluorescence du Rhod-5N et des complexes formés avec les ions  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$ .

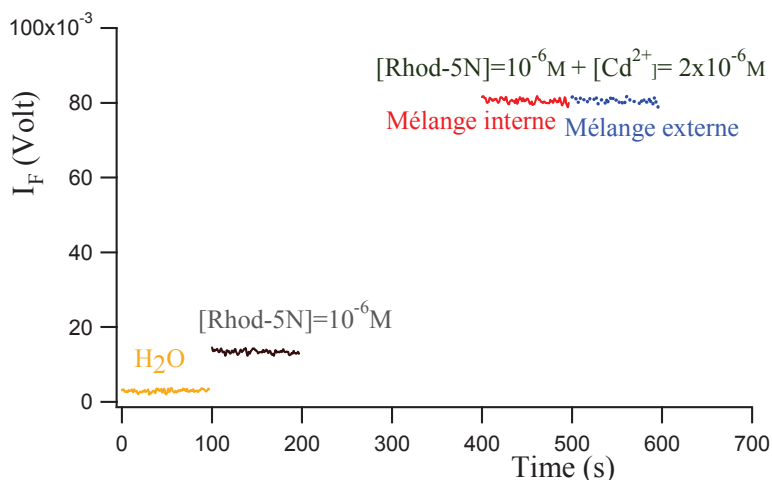
|              | L          | L+ $Pb^{2+}$ | L+ $Cd^{2+}$ | (L+ $Pb^{2+}$ )/L | (L+ $Cd^{2+}$ )/L | (L+ $Cd^{2+}$ )/(L+ $Pb^{2+}$ ) |
|--------------|------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
| $I_{F(moy)}$ | 0,01343632 | 0,047271     | 0,0805305    | 3,5               | 6                 | 1,7                             |

**Tableau II-2 :** Récapitulatif des complexes Rhod-5N à  $C = 10^{-6}$  mol/L formés avec les ions  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  ajoutés à deux équivalents.

### III.1.e. Complexation du $Cd^{2+}$ et du $Pb^{2+}$ en mélange interne et externe

Nous avons voulu comparer l'efficacité de la complexation du cadmium et du plomb par le Rhod-5N en effectuant le mélange à l'extérieur (avant introduction) puis à l'intérieur du circuit microfluidique court. La Figure II-10 ci-dessous montre que l'intensité de fluorescence du complexe formé avec le cadmium en mélange externe est identique à celle obtenue en effectuant le mélange Rhod-5N avec le cadmium dans le circuit microfluidique. La cohérence de ces résultats obtenus prouve que la réaction de complexation a atteint son état d'équilibre à la sortie du canal, quelle que soit la longueur du canal.

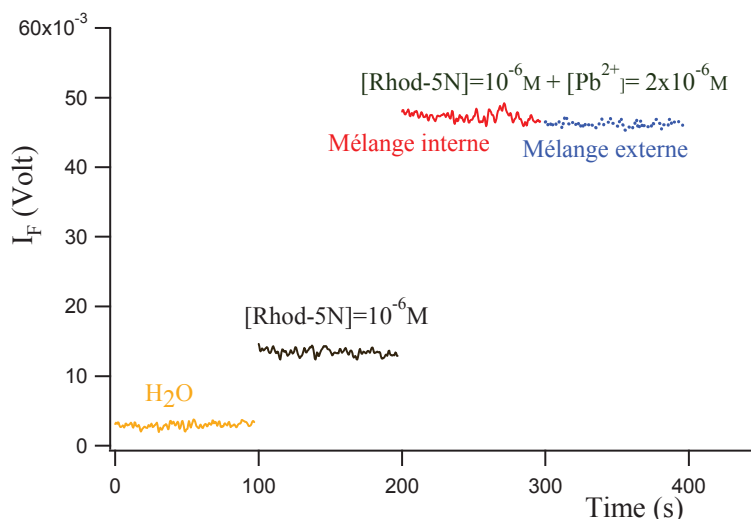




**Figure II-10 :** Complexation du cadmium à une concentration de  $C = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$  par le Rhod-5N à  $C = 10^{-6} \text{ M}$  en effectuant le mélange à l'intérieur et à l'externe du circuit court.

Dans la même logique, nous avons cherché à étudier la cinétique de complexation du cation interférent  $\text{Pb}^{2+}$  en mélange interne et externe du circuit microfluidique court. La Figure II-11 ci-dessous présente la variation de l'intensité de fluorescence du complexe formé avec le Rhod-5N. Comme nous l'avons observé pour le cadmium, aucune variation de l'intensité de fluorescence du complexe formé à l'extérieur puis à l'intérieur du circuit microfluidique n'est observée. La réaction de complexation du plomb dans le circuit court est donc elle aussi très rapide.

Si les temps de complexation du cadmium ou du plomb étaient suffisamment différents, une mesure de l'intensité de fluorescence à la sortie des canaux de longueur différente aurait pu permettre de discriminer les deux métaux.



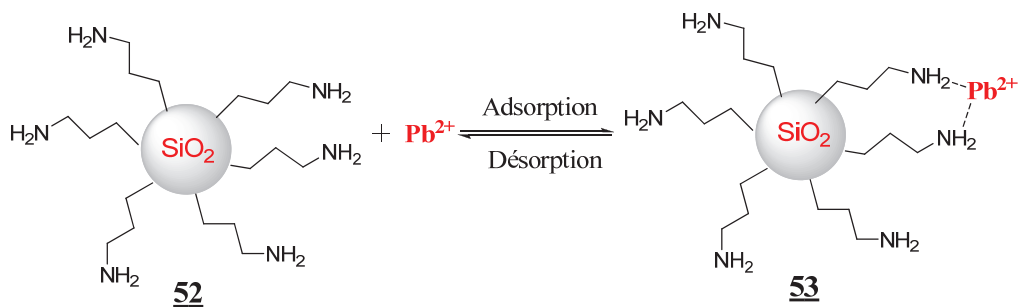
**Figure II-11 :** Complexation du plomb à une concentration de  $C = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$  par le Rhod-5N à  $C = 10^{-6} \text{ M}$  en mélange interne et externe du circuit microfluidique court.

## III.2. Discrimination du cadmium et plomb par préconcentration

### III.2.a. Utilisation d'un préconcentrateur de cations

Grâce à l'affinité du soufre et de l'azote pour un certain nombre de cations toxiques, de la silice fonctionnalisée par des groupements amines ou thiols est très utilisée pour l'extraction du mercure, du plomb, du zinc, *etc...*<sup>21,22</sup> Cette silice mésoporeuse placée dans une colonne peut être utilisée comme préconcentrateur de cations. Le préconcentrateur de cations est souvent couplé avec des méthodes de détection de métaux lourds très performantes comme la spectroscopie de masse (ICP) ou la spectrométrie par absorption atomique (AAS). De très faibles quantités d'analytes peuvent être détectées.<sup>23,24</sup> La silice fonctionnalisée par de l'aminopropyltriéthoxysilane ( $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ ) est utilisée pour la préconcentration du zinc, du plomb, du cadmium et du nickel.<sup>25</sup> Les études effectuées à  $\text{pH} = 7$  ont montré que la totalité du plomb introduite dans la mini-colonne est adsorbée par la silice. La réversibilité du système est obtenue par décomplexation en milieu acide.

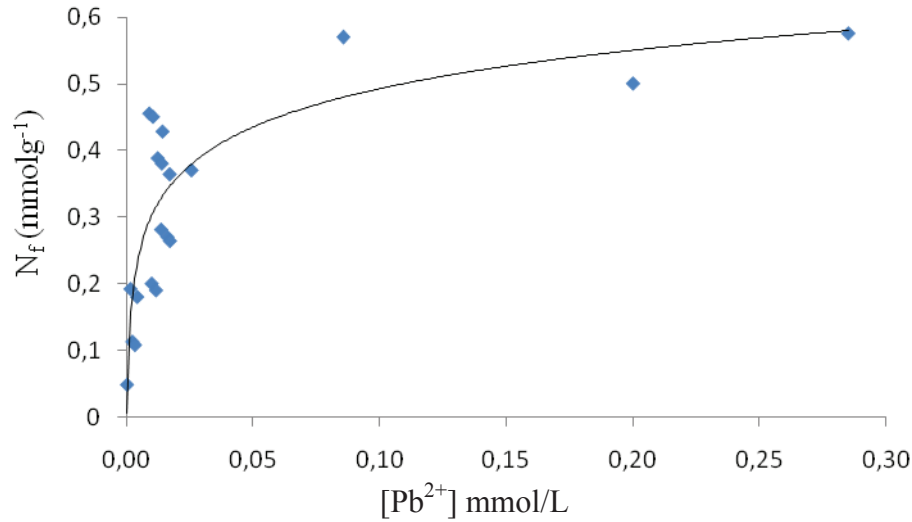
Dans le but de détecter des traces, voire ultra-traces de plomb dans des solutions aqueuses très diluées, la silice mésoporeuse fonctionnalisée par de l'APTES ( $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ ) a été utilisée au laboratoire comme préconcentrateur des ions  $\text{Pb}^{2+}$  (Schéma II-5). Cette technique consiste à adsorber les ions  $\text{Pb}^{2+}$  à  $\text{pH} = 7$  sur une mini-colonne capillaire remplie de  $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ . La décomplexation est ensuite effectuée en milieu acide ( $\text{pH} = 2$ ) ; la solution ainsi obtenue en sortie de colonne est dosée par le CalixDANS-4 en circuit microfluidique. De très faibles quantités de  $\text{Pb}^{2+}$  ont été détectées, avec une limite de détection de  $2 \mu\text{g/L}$  inférieure à la valeur obtenue sans préconcentration ( $4,2 \mu\text{g/L}$ ).<sup>26</sup> En outre, le préconcentrateur permettait de s'affranchir de l'interférence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  présents en grande quantité dans les eaux de surface.



**Schéma II-5 :** Adsorption et désorption des ions  $\text{Pb}^{2+}$  sur de la silice fonctionnalisée par de l'APTES ( $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ ).

La Figure II-12 présente l'isotherme d'adsorption des ions  $\text{Pb}^{2+}$  à différentes concentrations sur 2 mg de  $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ . L'adsorption est effectuée à  $\text{pH} = 7$ . Comme on peut le voir, à faibles concentrations de plomb, on observe une évolution linéaire de l'efficacité

d'adsorption. Celle-ci atteint un palier avec une efficacité maximale pour environ 0,6 mmole d'ions  $Pb^{2+}$  par gramme de  $SiO_2$ -APTES.



**Figure II-12** : Isotherme d'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  par la silice fonctionnalisée par l'aminopropyltriéthoxysilane ( $SiO_2$ -APTES) à  $pH = 7$ .

L'isotherme de Langmuir ou équation de Langmuir (éq II-2) met en relation l'adsorption de molécules sur une surface solide avec la pression ou la concentration au sein du milieu environnant. Dans notre cas, les études sont effectuées en fonction de la concentration d'ions métalliques à l'équilibre. L'efficacité de l'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES est déterminée à partir de l'équation ci-dessous :

$$N_f = \frac{V(C_0 - C_s)}{m} \quad \text{éq II-2}$$

où,

$N_f$  est le nombre de moles de  $Pb^{2+}$  adsorbées par gramme de silice

$C_0$  est la concentration initiale de  $Pb^{2+}$  en mol/L

$C_s$  est la concentration de  $Pb^{2+}$  à l'équilibre en mol/L

$V$  est le volume de la solution

$m$  est la masse de  $SiO_2$ -APTES

L'évolution de l'efficacité d'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  en fonction de la concentration de perchlorate de plomb peut aussi être déterminée à partir de l'équation ci-dessous, qui est l'équation de l'isotherme de Langmuir.

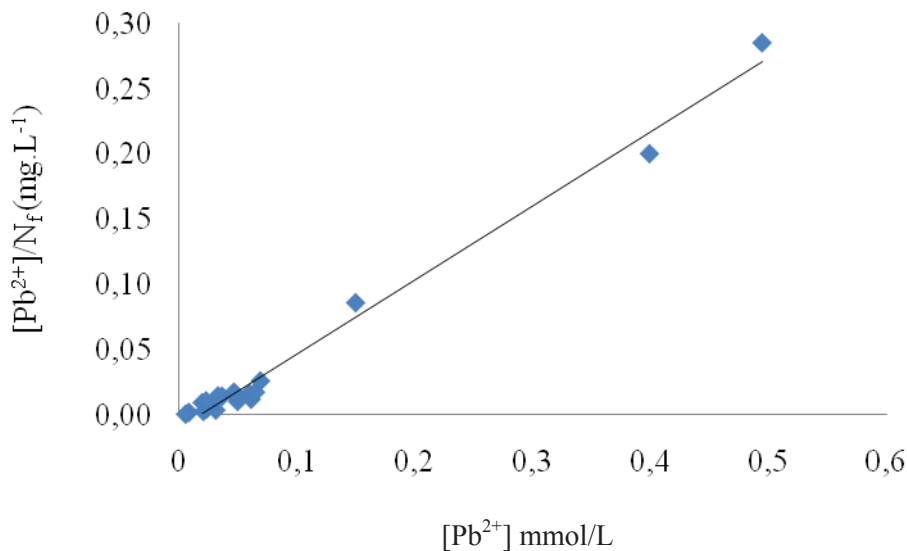
$$\frac{C_s}{N_f} = \frac{C_s}{N_s} + \frac{1}{b * N_s} \quad \text{éq II-3}$$

où,

b est la constante de Langmuir exprimée en L/mol

$N_s$  représente la capacité maximale d'adsorption exprimée en mol/g

La Figure II-13 présente l'évolution de l'efficacité d'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES en fonction de la concentration. La constante de Langmuir ( $b = 97000$ ) relative à la stabilité du complexe formé avec les ions  $Pb^{2+}$  ainsi que l'adsorption maximale ( $N_s = 0,57$  mol/g) sont déterminées à partir de l'équation II-4. Ces constantes sont obtenues à partir de la courbe de régression linéaire de la Figure II-13.



**Figure II-13 :** Détermination de l'efficacité d'adsorption maximale et de la constante de Langmuir des ions  $Pb^{2+}$  à  $pH = 7$  sur la  $SiO_2$ -APTES.

$$\frac{[Pb^{2+}]}{N_{f(mg.L^{-1})}} = 0,5663 * [Pb^{2+}]_{mmol.L^{-1}} - 0,01 \quad \text{éq II-4}$$

Afin de faire du Rhod-5N une sonde spécifique pour la détection du cadmium en circuit microfluidique, nous nous sommes intéressés à utiliser la  $SiO_2$ -APTES comme préconcentrateur sélectif de cations.

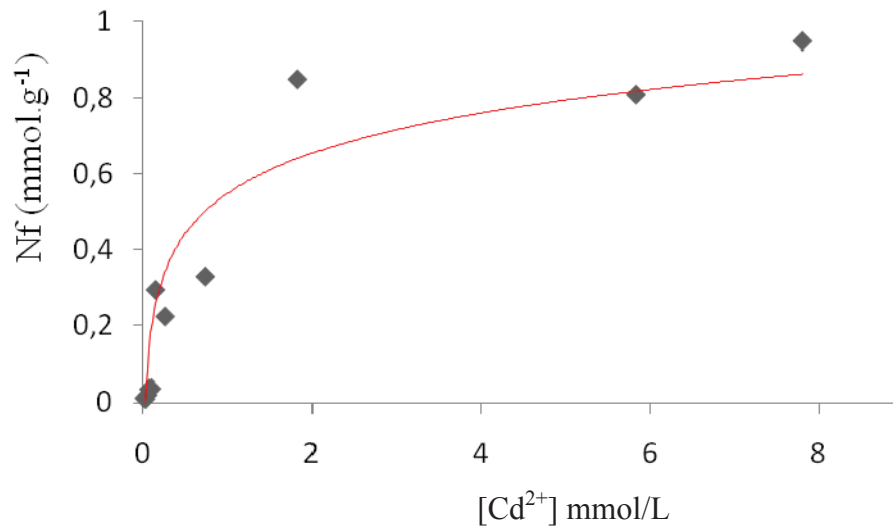
### III.2.b. Discrimination du cadmium et plomb par préconcentration

Etant donné que seul le plomb constitue le principal cation interférent lors du dosage du cadmium par le Rhod-5N, nous nous sommes intéressés à la discrimination de celui-ci avec le cadmium par adsorption sélective sur la résine de silice  $SiO_2$ -APTES. Une première partie du

travail a constitué à comparer l'efficacité d'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  des ions  $\text{Pb}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES.

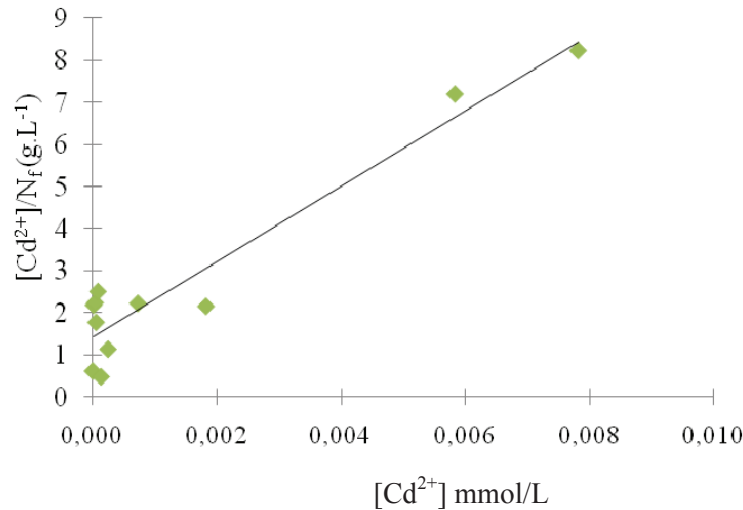
### III.2.c. Isotherme d'adsorption du cadmium

Afin de discriminer le plomb du cadmium, nous avons aussi réalisé l'isotherme d'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES. Comme dans le cas des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , cette étude a été réalisée à  $\text{pH} = 7$  à partir de différentes concentrations d'une solution de perchlorate de cadmium sur 4 mg de  $\text{SiO}_2$ -APTES. Après agitation à température ambiante pendant une nuit, la solution surnageante est filtrée à l'aide d'un filtre Millipore. Le filtrat ainsi obtenu est dosé par spectroscopie de fluorescence par la Rhod-5N. La Figure II-14 ci-dessous décrit l'isotherme d'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES à  $\text{pH} = 7$ . On observe à faibles concentrations de cadmium une évolution linéaire du nombre de moles de  $\text{Cd}^{2+}$  adsorbées dans la  $\text{SiO}_2$ -APTES suivie d'un palier avec un maximum voisin de  $1 \text{ mmol.g}^{-1}$ .



**Figure II-14 :** Isotherme d'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES à  $\text{pH} = 7$ .

Comme dans le cas des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , la Figure II-15 présente l'évolution de l'efficacité d'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES. A partir de l'équation II-5 issue de la courbe de régression linéaire, une efficacité maximale d'adsorption ( $N_S = 1,11 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) ainsi qu'une constante de Langmuir ( $b = 630$ ) sont obtenues.



**Figure II-15 :** Détermination de l'efficacité d'adsorption maximale et de la constante de Langmuir des ions  $Cd^{2+}$  à  $pH = 7$  sur la  $SiO_2$ -APTES.

$$\frac{[Cd^{2+}]}{N_{f(mg.L^{-1})}} = 897,14 * [Cd^{2+}]_{mmol.L^{-1}} + 1,42 \quad \text{éq II-5}$$

Si on compare les résultats obtenus de l'adsorption des ions  $Cd^{2+}$  avec les ions  $Pb^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES, on remarque une meilleure affinité des groupements amines de l'APTES avec les ions  $Pb^{2+}$  ( $9,7 \times 10^4$  vs  $6,3 \times 10^2$ ). Le nombre de moles d'ions  $Cd^{2+}$  adsorbé par gramme de silice est supérieur au nombre de moles d'ions  $Pb^{2+}$  (0,57 vs 1,11). Ceci serait probablement dû à la taille des cations (0,238 pour le plomb et 0,194 pour le cadmium). Le tableau ci-dessous est un résumé des propriétés absorbantes de la  $SiO_2$ -APTES en présence d'ions  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  à  $pH = 7$

|           | $N_f$ (mmol/g) | $b$ (L/mol)       |
|-----------|----------------|-------------------|
| $Pb^{2+}$ | 0,57           | $9,7 \times 10^4$ |
| $Cd^{2+}$ | 1,11           | $6,3 \times 10^2$ |

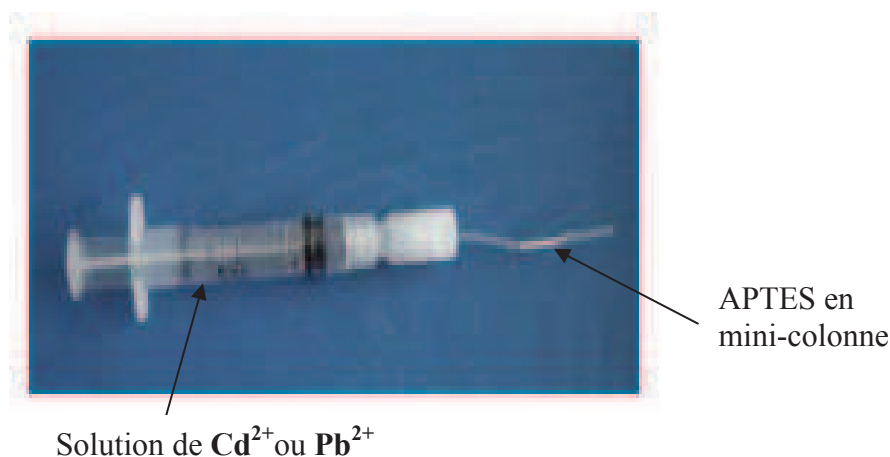
**Tableau II-3 :** Etude comparative de l'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES à  $pH = 7$ .

### III.2.d. Efficacité d'adsorption du plomb et du cadmium

Après une étude détaillée de l'adsorption des ions  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  à  $pH = 7$ , nous nous sommes intéressés à discriminer ces cations par préconcentration. Cette technique consiste à adsorber sélectivement les ions  $Pb^{2+}$  dans la  $SiO_2$ -APTES à partir d'un mélange de cations ( $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , etc...). En effet, la valeur de la constante de Langmuir  $b$  obtenue avec les ions  $Pb^{2+}$  est relativement plus importante que celle obtenue avec les ions  $Cd^{2+}$  (Tableau II-3,  $9,7 \times 10^4$  vs  $6,3 \times 10^2$ ). Cette valeur est fortement liée à la stabilité du complexe formé entre le cation et la  $SiO_2$ -

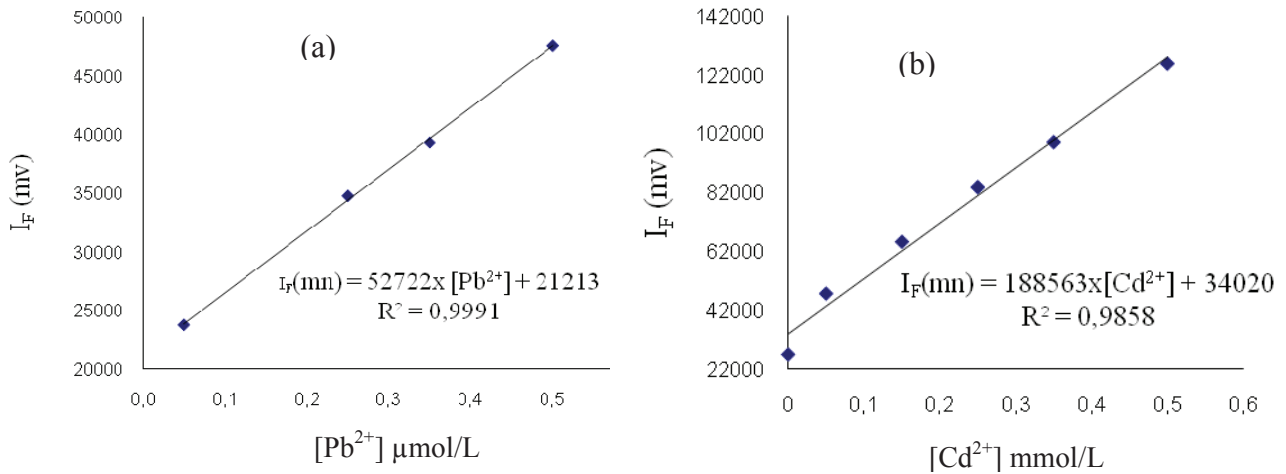
APTES. A partir de ces résultats, il devrait être possible de discriminer le cadmium du plomb par préconcentration.

A l'aide d'un capillaire, une mini-colonne de silice fonctionnalisée par l'aminopropyltriéthoxysilane ( $\text{SiO}_2$ -APTES) est préparée (Figure II-16). La longueur du capillaire rempli de silice est voisine de 1 cm ce qui correspond à une masse de 4 à 5 mg de  $\text{SiO}_2$ -APTES. Des études ont montrées que pour avoir une adsorption maximale, la vitesse d'injection des analytes injectés dans la colonne à l'aide d'une seringue et d'un pousse-seringue doit être relativement faible; elle doit être comprise entre 0,5 et 5 mL/mn.<sup>27</sup> Nous avons choisi d'injecter la solution contenant les ions  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  dans la mini-colonne à une vitesse de 1 mL/mn.



*Figure II-16 : Complexation sélective du plomb par un préconcentrateur.*

La solution obtenue en sortie de colonne est ensuite dosée par le Rhod-5N. La Figure II-17-a et Figure II-17-b correspondent respectivement à la courbe de calibration des ions  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ . Ces courbes sont obtenues par complexation de différentes concentrations connues de  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  par le Rhod-5N à une concentration de  $10^{-6}$  M. A partir de l'équation obtenue par régression linéaire de chacune de ces courbes, la concentration d'analytes en en sortie de mini-colonne est déterminée.



**Figure II-17 :** Courbes de calibration des ions  $Pb^{2+}$  (figure a) et  $Cd^{2+}$  (figure b) par le Rhod-5N en milieu aqueux à  $pH = 7$ .

Nous avons étudié l’efficacité de l’adsorption des ions  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES à différents  $pH$ . Après différentes tentatives à différentes concentrations de cations métalliques l’adsorption maximale des ions  $Pb^{2+}$  obtenue à  $pH = 7$  est de l’ordre de 95 %. La quantité minimale d’ions  $Cd^{2+}$  complexée par la  $SiO_2$ -APTES dans une mini-colonne à partir de la solution contenant les ions  $Cd^{2+}$  est de 13 % (Tableau II-4). Pour améliorer l’efficacité d’adsorption sélective des ions  $Pb^{2+}$  sur la silice, nous avons voulu effectuer la même expérience à  $pH = 9$ . Une première expérience a consisté à effectuer l’adsorption des ions  $Cd^{2+}$ , comme on peut le voir sur le Tableau II-4 ci-dessous, on observe une adsorption de 81 à 100 % des ions  $Cd^{2+}$ .

| <b>pH</b> | <b>% Adsorption <math>Pb^{2+}</math></b> | <b>% Adsorption <math>Cd^{2+}</math></b> |
|-----------|--|--|
| <b>7</b>  | 76-93                                    | 13-25                                    |
| <b>9</b>  | 95-100                                   | 81-100                                   |

**Tableau II-4 :** Adsorption des ions  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  sur la  $SiO_2$ -APTES en fonction du  $pH$ .

Pour avoir une meilleure discrimination des ions  $Pb^{2+}$  des ions  $Cd^{2+}$ , nous travaillons sur l’optimisation du  $pH$ . Des tests d’adsorption des ions  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  à  $pH = 8$  puis  $pH = 8,5$  sont en cours. Ceci permettrait d’adsorber sélectivement les ions  $Pb^{2+}$ . Une autre stratégie consisterait à changer la nature de la silice utilisée et la remplacer par une silice fonctionnalisée en surface par des ligands sélectifs du plomb. Ces travaux se poursuivent actuellement.



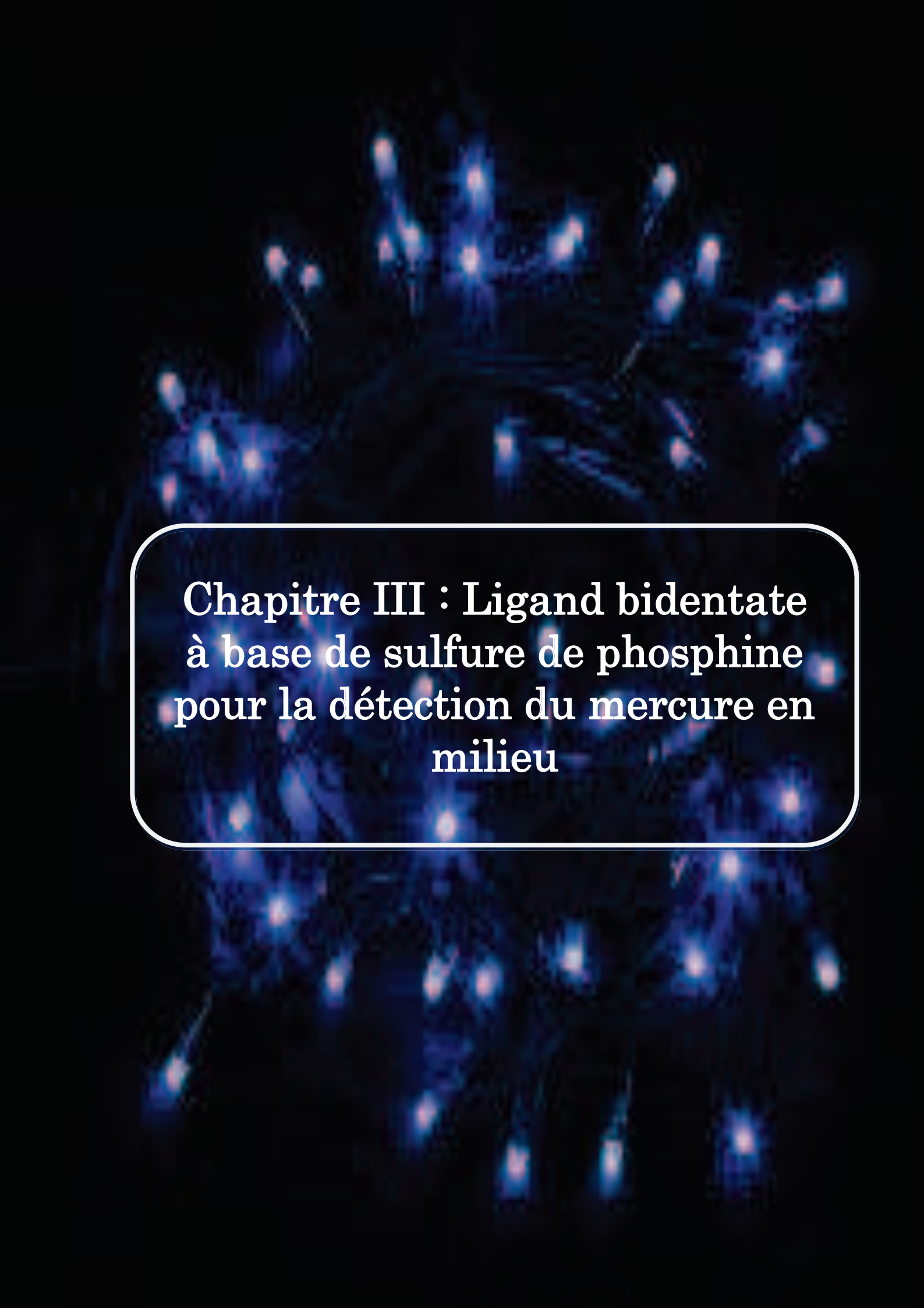
## Conclusion

Nous avons réussi à incorporer le Rhod-5N en circuit microfluidique pour la détection du cadmium. Cette sonde s'est révélée très stable dans le dispositif microfluidique ; aucune dégradation significative de celle-ci n'est observée. Une première étude a consisté à étudier l'influence de la longueur du circuit sur la cinétique de complexation. Celle-ci montre que la complexation des ions  $\text{Cd}^{2+}$  est très rapide, quelque soit la longueur du circuit microfluidique utilisé. Une limite de détection relativement faible ( $2 \times 10^{-9}$  mol/L, 0,45  $\mu\text{g/L}$ ) est obtenue ; cette valeur est inférieure à la valeur maximale admissible dans les eaux de consommation en Europe (5 $\mu\text{g/L}$ ). Il faut également signaler que pour la plupart des sondes décrites dans la littérature, le zinc reste le principal cation interférent. Dans le cas du Rhod-5N, à l'exception des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , une bonne sélectivité est obtenue vis-à-vis des cations interférents. Afin de discriminer les ions  $\text{Cd}^{2+}$  des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , nous nous sommes intéressés à la méthode de préconcentration. Celle-ci consiste à adsorber sélectivement les ions  $\text{Pb}^{2+}$  sur une résine de silice fonctionnalisée par l'aminopropyltriéthoxysilane ( $\text{SiO}_2$ -APTES). Les résultats obtenus sur l'adsorption d'une solution contenant les ions  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2$ -APTES montrent que, malgré une bonne affinité des groupements amines de l'APTES avec les ions  $\text{Pb}^{2+}$ , il reste toujours une petite quantité de  $\text{Pb}^{2+}$  en sortie de colonne à  $\text{pH} = 7$ . Ces résultats sont entrain d'être optimisés par Haitao Zhang qui travaille sur la continuité du projet.

## Références bibliographiques

- 1 Directive 2008/105/CE du parlement européens et du Conseil du 16 Décembre 2008, "*Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants* ", Journal Officiel de l'union Européenne L 348/92, **2008**.
- 2 S.Y. Park, J.H. Yoon, C.S. Hong, R. Souane, J.S. Kim, S.E. Matthews, J. Vicens "*A Pyrenyl-Appended Triazole-Based Calix[4]arene as a Fluorescent Sensor for Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>*." J. Org. Chem. **2008** (73), 8212-8218.
- 3 T. Gunnlaugsson, T. Clive Lee, R. Parkesh, R. "*Highly selective fluorescent chemosensors for cadmium in water.*" Tetrahedron **2004** (60), 11239-11249.
- 4 Y.M. Zhang, Y. Chen, Z.Q. Li, N. Li, Y. Liu "*Quinolinotriazole-[beta]-cyclodextrin and its adamantanecarboxylic acid complex as efficient water-soluble fluorescent Cd<sup>2+</sup> sensors.*" Bioorg. Med. Chem. **2010** (18), 1415-1420.
- 5 C. Lodeiro, J.L. Capelo, J.C. Mejuto, E. Oliveira, H.M. Santos, B. Pedras, C. Nunez "*Light and colour as analytical detection tools: A journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors.*" Chem. Soc. Rev. **2010** (39), 2948-2976.
- 6 M. Soibinet, V. Souchon, I. Leray, B. Valeur "*Rhod-5N as a Fluorescent Molecular Sensor of Cadmium(II) Ion*", J. Fluoresc. **2008** (18), 1077-1082.
- 7 J. Lebel, A. Poisson "*Potentiometric determination of calcium and magnesium in seawater*" Marine Chemistry. **1976** (4), 321.
- 8 S.R. Adams, J.P.Y. Kao, R.Y. Tsien. "*Biologically useful chelators that take up Ca<sup>2+</sup> upon illumination*", J. Am. Chem. Soc., **1989** (111), 7957-7968.
- 9 G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien "*A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*", J. Biol. Chem. **1985** (260), 3440-3450.
- 10 A.C. Ribou, J.M. Salmon, J. Vigo, C. Goyet. "*Measurements of calcium with a fluorescent probe Rhod-5N: Influence of high ionic strength and pH.*" Talanta **2007** (71), 437-442.
- 11 M. Choi, M. Kim, K. D. Lee, K.N Han, I.A Yoon, H.J Chung "*A New Reverse PET Chemosensor and Its Chelatoselective Aromatic Cadmiation*", Org. Lett. **2001** (3), 3455-3457.
- 12 T. Vo-dinh, P. Viallet, L. Ramirez, A. Pal, J. Vigo. "*Detection of cadmium ion using the fluorescence probe Indo-1*", Anal. Chim. Acta, **1994** (295), 67-72.
- 13 S. Lindberg, T. Landber, M. Greger "*A new method to detect cadmium uptake in protoplasts.*" Planta **2004** (219), 526-532.
- 14 S. Lindberg, T. Landberg, M. Greger "*Cadmium uptake and interaction with phytochelatin in wheat protoplasts*", Plant Physiol. Bioch. **2007** (45), 47-53.
- 15 H. Prestel, A. Gahr, R. Niessner "*Detection of heavy metals in water by fluorescence spectroscopy: On the way to a suitable sensor system*" J. Anal. Chem. **2000** (368), 182-191
- 16 R.P. Haugland. "*The Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 9<sup>th</sup> ed*" Molecular Probes, Eugene, **2002**.

- 17 C.J. Mc Namara, T.D. Perry, K. Bearce, R. Mitchell "Measurement of limestone biodeterioration using the  $Ca^{2+}$  binding fluorochrome Rhod-5N" *J. Microbiol. Methods* **2005** (61), 245-250
- 18 Z. Xu, K.H. Baek, H.N. Kim, J. Cui, X. Qian, D.R Spring, I. Shin, J. Yoon " $Zn^{2+}$  Triggered Amide Tautomerization Produces a Highly  $Zn^{2+}$ -Selective, Cell-Permeable, and Ratiometric Fluorescent Sensor" *J. Am. Chem. Soc.* **2010** (132), 601-610.
- 19 T. Wu, I. Leray, V. Génot, J.P. Lefèvre, A. Korovitch, N.T. Ha-Duong, J.M. El Hage Chahine, J.A. Delaire "Thermodynamics and Kinetics of the Complexation Reaction of Lead by Calix-DANS4." *ChemPhysChem* **2010** (11), 3355-3362.
- 20 Directive 98/83/EC du Conseil du 3 Novembre 1998, "The Quality of Water Intended for Human Consumption", L 330/32, **1998**.
- 21 D. Pérez-Quintanilla, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra "Mesoporous silica functionalized with 2-mercaptopyridine: Synthesis, characterization and employment for Hg(II) adsorption". *Micropor. Mesopor. Mater.* **2006** (89), 58-68.
- 22 A. Walcarius, M. Etienne, J. Bessiere "Rate of access to the binding sites in organically modified silicates. 1. Amorphous silica gels grafted with amine or thiol groups". *Chem. Mater.* **2002** (14), 2757-2766.
- 23 G. Álvarez-Llamas, M.d.R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel, "ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis". *Trends Anal. Chem.*, **2005** (24), 28-36.
- 24 S. Saraçoğlu, L. Elçi "Column solid-phase extraction with Chromosorb-102 resin and determination of trace elements in water and sediment samples by flame atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **2002** (452), 77-83.
- 25 J. Aguado, J.M Arsuaga, A. Arencibia, M. Lindo, V. Gascón "Aqueous heavy metals removal by adsorption on amine-functionalized mesoporous silica". *J. Hazard. Mater* **2009** (163), 213-222.
- 26 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "A highly sensitive and selective fluorescent molecular sensor for Pb(II) based on a calix 4 arene bearing four dansyl groups", *Chem. Commun* **2003** (8), 996-997.
- 27 C.F. Poole, A.D. Gunatilleka, R. Sethuraman "Contributions of theory to method development in solid-phase extraction." *J. Chromatogr. A* **2000** (885), 17-39.



**Chapitre III : Ligand bidentate  
à base de sulfure de phosphine  
pour la détection du mercure en  
milieu**



# Chapitre III : Ligand bidentate à base de sulfure de phosphine pour la détection du mercure en milieu microfluidique

## Sommaire

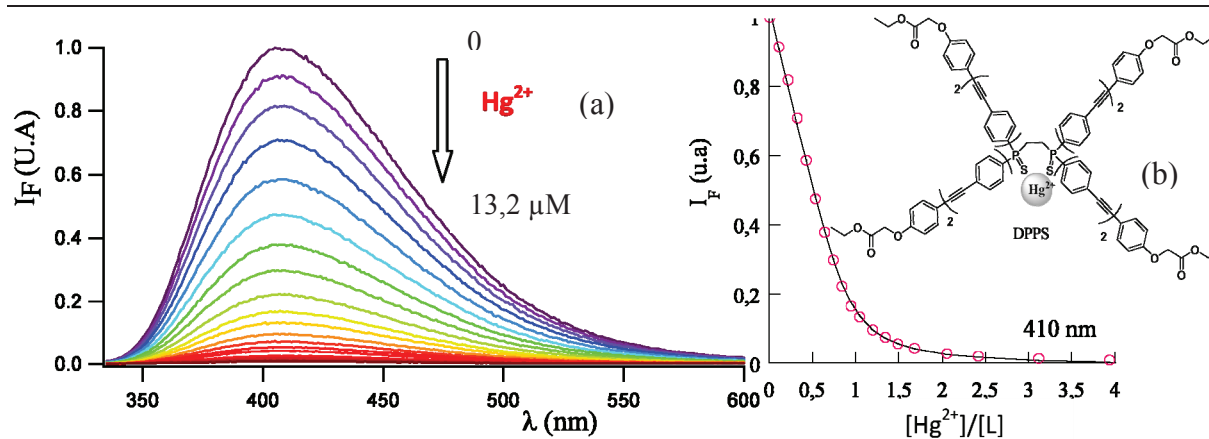
|  |    |
|--|----|
| Sommaire .....   | 81 |
| Introduction .....   | 82 |
| I. Présentation de la sonde .....  | 82 |
| II. Synthèse et propriétés photophysiques des composés modèles .....                       | 84 |
| II.1. Le composé modèle PS-3PEG.....   | 84 |
| II.1.a. Synthèse de la phosphine PS-3PEG .....   | 84 |
| II.1.b. Propriétés photophysiques du PS-3PEG .....   | 87 |
| II.2. Le composé modèle PS-PEG.....  | 88 |
| II.2.a. Synthèse de la phosphine PS-PEG .....  | 88 |
| II.2.b. Propriétés photophysiques du PS-PEG .....  | 89 |
| III. Synthèse et propriétés photophysiques du DPPS-PEG .....                               | 91 |
| III.1. Analyse rétrosynthétique .....  | 91 |
| III.2. Synthèse du DPPS-PEG .....  | 91 |
| III.2.a. Préparation du sulfure de bis(diphénylacétylène phosphino)-éthane <b>72</b> ..... | 91 |
| III.2.b. Accès au DPPS-PEG par couplage de Sonogashira.....                                | 92 |
| III.3. Complexation des ions mercuriques par le DPPS-PEG .....                             | 93 |
| IV. Complexation du mercure en circuit microfluidique .....                                | 95 |
| Conclusion.....  | 97 |
| Références Bibliographiques.....   | 99 |

## Introduction

Dans ce chapitre nous décrivons la conception d'un ligand hydrosoluble pour la détection du mercure dans l'eau en circuit microfluidique. Plusieurs types de sondes spécifiques pour la détection de l'ion  $\text{Hg}^{2+}$  sont développées dans la littérature.<sup>1,2,3</sup> Elles se caractérisent par une bonne sélectivité, mais la limite de détection obtenue est encore supérieure aux normes européennes sur la qualité de l'eau de consommation. Du fait de la grande affinité<sup>4</sup> entre le soufre et le mercure, les structures à base de sulfure de phosphine ont été étudiées au laboratoire pour la détection du mercure.<sup>5,6</sup> Une très bonne sensibilité, ainsi qu'une grande sélectivité vis-à-vis des cations interférents ont été obtenues. Une limite de détection de 0,75  $\mu\text{g/L}$ , inférieure aux directives européennes, a été également obtenue. Les spectres d'émission sont enregistrés à une longueur d'onde de 350 nm, dans un mélange de solvants  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  80 : 20. Afin d'augmenter sa solubilité, mais aussi utiliser une LED excitatrice de 365 nm (peu onéreuse) en circuit microfluidique, nous nous sommes intéressés à la synthèse de son analogue substitué par des groupements poly(éthylèneglycols) (PEG). Une première partie du travail consiste à synthétiser des composés modèles afin de déterminer le nombre de groupements PEG permettant d'assurer leur solubilité dans l'eau, ainsi que leurs propriétés photophysiques. La deuxième partie du travail a consisté à synthétiser l'analogue hydrosoluble, d'étudier ses propriétés de complexation vis à vis du mercure ainsi que la sélectivité vis-à-vis des cations interférents. En troisième partie, la sonde choisie a été incorporée en circuit microfluidique.

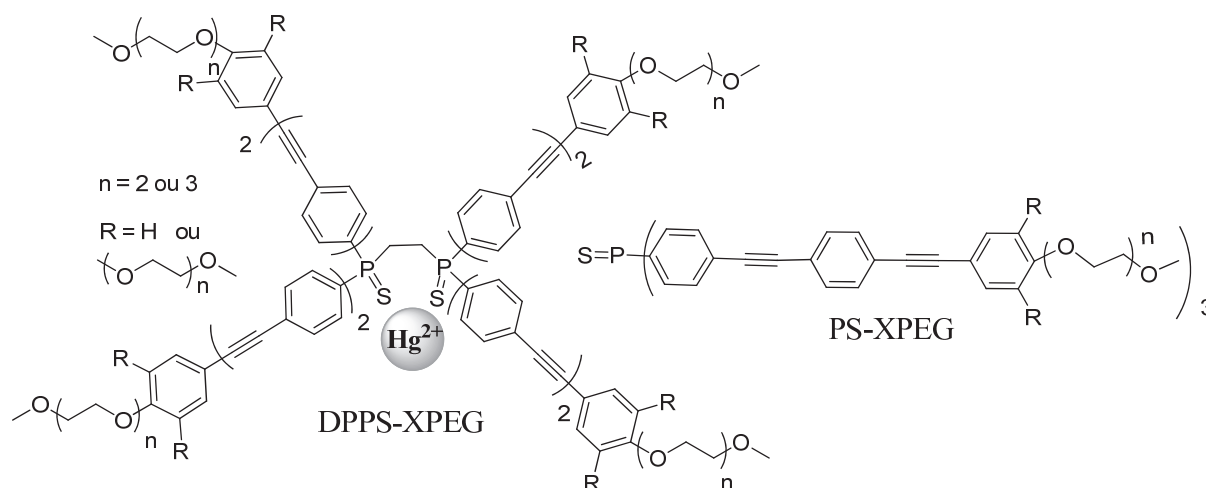
## I. Présentation de la sonde

Les chromophores du type transfert de charge intramoléculaire appelés aussi « push-pull » sont très utilisés dans le domaine de l'optique non linéaire<sup>7</sup> et pour la conception de senseurs fluorescents.<sup>8</sup> Ces chromophores sont constitués d'un groupement électrodonneur (D) qui interagit avec un groupement électroattracteur (A) par un système  $\pi$  conjugué. Ces types de structures présentent l'avantage d'être photo-stables, ils possèdent un coefficient d'extinction molaire élevé et un important rendement quantique de fluorescence.<sup>9</sup> Du fait de la grande affinité entre le sulfure de phosphine et le mercure, un fluoroionophore constitué de groupements phénylacétylène conjugués et d'une entité complexante à base de bis-(diphénylthiophosphino)éthane (DPPSI) a été synthétisé au laboratoire (Figure III-1). Cette sonde s'est révélée être un très bon complexant du mercure avec une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents. Une limite de détection de 0,75  $\mu\text{g/L}$  a été déterminée, elle se trouve largement inférieure à la plupart de celles données dans la littérature.<sup>10,11,12</sup>



**Figure III-1 :** Complexation du mercure par le DPPSI,  $C = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,  $\lambda_{exc} = 324 \text{ nm}$ , solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{Eau } 80 : 20$   $\text{pH} = 4$  ajusté par le  $\text{HClO}_4$  les spectres de fluorescence (figure a), courbe de calibration (figure b).

Cependant, cette sonde est très peu soluble dans l'eau, ce qui est un inconvénient pour le dosage des ions mercuriques dans les eaux. Notre objectif est d'augmenter sa solubilité en synthétisant un analogue de type DPPS-XPEG substitué par des groupements éthylène glycol. En effet, l'éthylène glycol est utilisé comme substituant pour augmenter la solubilité des composés organiques dans l'eau.<sup>13</sup> Nous nous sommes d'abord intéressés à la synthèse et à l'étude des propriétés photophysiques du composé modèle PS-XPEG, puis au ligand spécifique DPPS-XPEG. Les structures de ces deux composés sont données ci-dessous (Figure III-2).

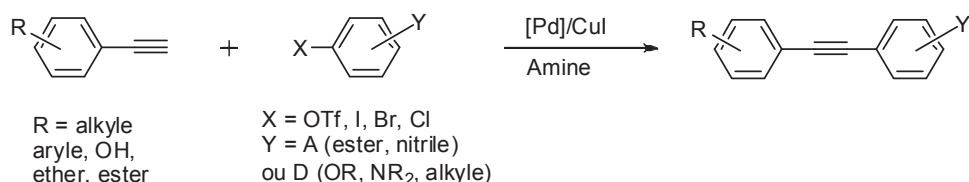


**Figure III-2 :** Structures du ligand spécifique pour la détection du mercure (DPPS-XPEG) et du composé modèle (PS-XPEG).



## II. Synthèse et propriétés photophysiques des composés modèles

Dans le but d'élaborer une sonde spécifique hydrosoluble pour la détection du mercure en circuit microfluidique, nous avons opté pour la substitution des fluorophores du ligand DPPS étudié au laboratoire comme étant un bon complexant du mercure, par des groupements éthylène glycol.<sup>14</sup> Les fluorophores utilisés dans ce chapitre sont constitués d'un enchainement de groupements phénylacétylènes. La réaction de couplage de Sonogashira est très utilisée pour la formation de liaison C-C (Schéma III-1). Le couplage de Sonogashira est une réaction de couplage direct entre un halogénure d'aryle et un alcyne terminal, catalysée par un complexe de palladium et un sel de cuivre(I) en tant que co-catalyseur. Cette réaction dont le mécanisme est décrit ci-dessous constitue l'étape clé de la synthèse des fluorophores étudiés.



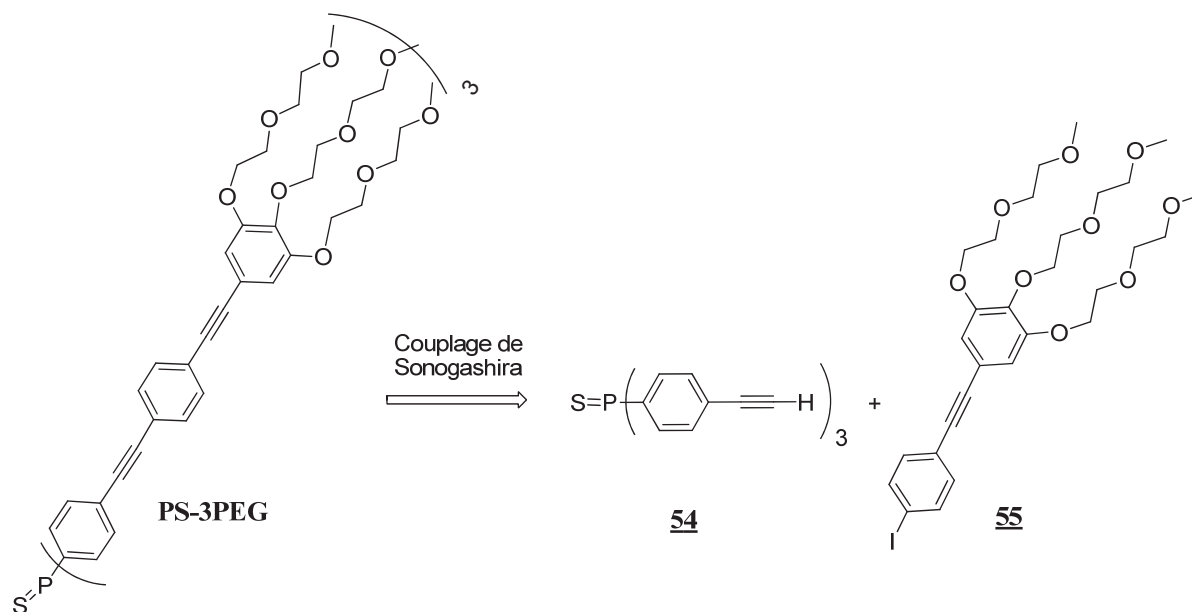
*Schéma III-1 : Mécanisme de la réaction de couplage de Sonogashira.*

Une première partie du travail consiste à synthétiser des composés modèles dont la solubilité ainsi que les propriétés photophysiques seront étudiées en fonction de la position du groupement PEG. La deuxième partie consiste à synthétiser le ligand spécifique du mercure DPPS-XPEG ; ses propriétés de complexation du mercure seront ensuite étudiées.

### II.1. Le composé modèle PS-3PEG

#### II.1.a. Synthèse de la phosphine PS-3PEG

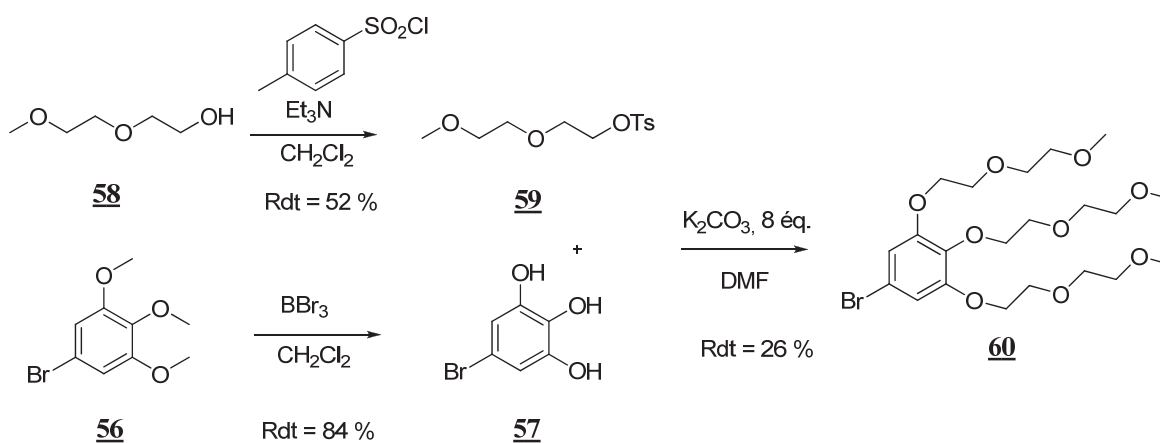
Dans un premier temps, nous avons préparé le composé PS-3PEG (Schéma III-2). La stratégie envisagée est le couplage de Sonogashira entre la thiophosphine **54** trisubstituée par des chaînes phénylacétylènes et le dérivé iodé **55** porteur de trois chaînes PEG sur le phényle terminal.



*Schéma III-2 : Analyse rétrosynthétique du composé modèle PS-3PEG.*

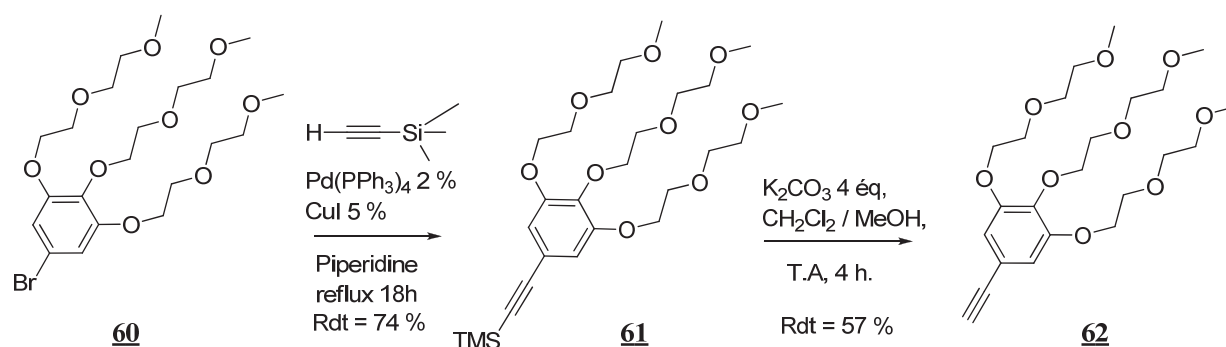
### I.1.a.1. Préparation du dérivé iodé **55**

Le dérivé iodé **55** est préparé en cinq étapes à partir du dérivé commercial 5-bromo-1,2,3-triméthoxybenzène **56** (Schéma III-3). Après libération des fonctions hydroxy par action du  $\text{BBr}_3$  pour conduire au composé **57** avec 84 % de rendement, ce dernier est alkylé par réaction avec le dérivé tosyloxy **59**, issu de la réaction d'activation de l'alcool **58** par le chlorure de tosyloxy.<sup>15</sup> Après optimisation du temps de réaction et du nombre d'équivalents de base ajoutée, la réaction de substitution des groupements phénoliques<sup>16</sup> conduit au dérivé bromé porteur de trois chaînes PEG **60** avec un rendement modeste de 26 %.



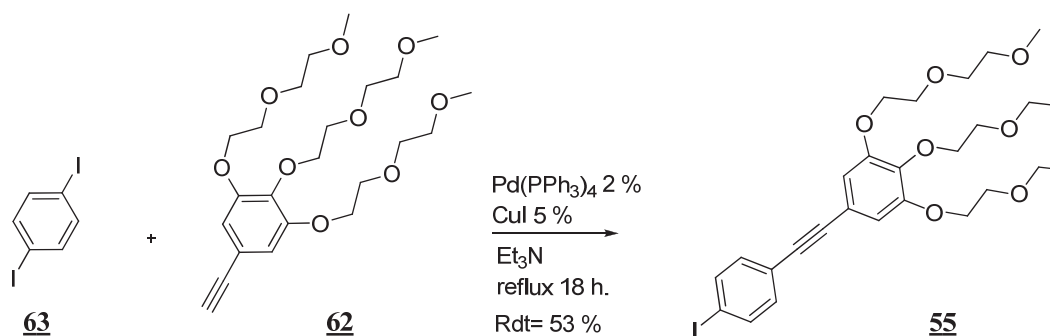
*Schéma III-3 : Substitution du tri-hydroxyphénol par des groupements PEG.*

Le couplage de Sonogashira<sup>17</sup> entre le dérivé bromé **60** et le triméthylsilylacétylène conduit au dérivé **61** avec un rendement de 74 % (Schéma III-4). La réaction de déprotection de l'alcyne effectuée en milieu basique a conduit à l'intermédiaire **62** avec un rendement de 57 %.



*Schéma III-4 : Alcylation du dérivé bromé **60**.*

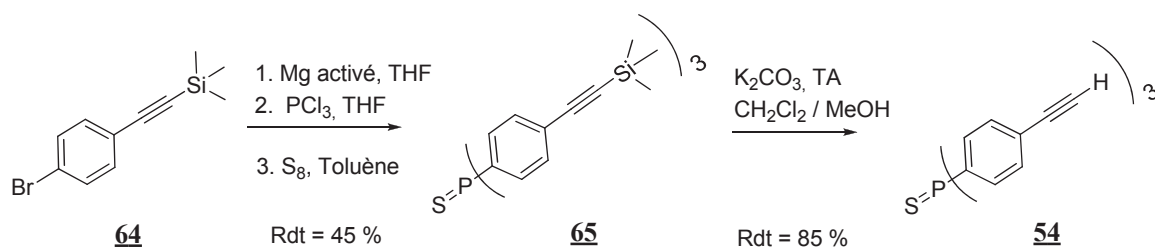
La dernière étape de la synthèse du composé **55** est une réaction de couplage de Sonogashira de l'alcyne **62** avec le 1,4-diiodobenzène (Schéma III-5). La seule difficulté de cette étape est de travailler en milieu suffisamment dilué pour minimiser la formation du produit de disubstitution du 1,4-diiodobenzène. Le composé **55** obtenu avec un rendement de 53 % est suffisamment pur pour être couplé avec la phosphine **54**. Malgré la  $\pi$ -conjugaison du composé **55**, celui-ci n'est pas fluorescent, phénomène qui peut s'expliquer par l'effet d'atome lourd de l'iode.



*Schéma III-5 : Réaction de couplage de Sonogashira de l'alcyne **62** avec le 1,4 di-iodobenzene.*

#### I.1.a.2. Préparation de la thiophosphine **54**

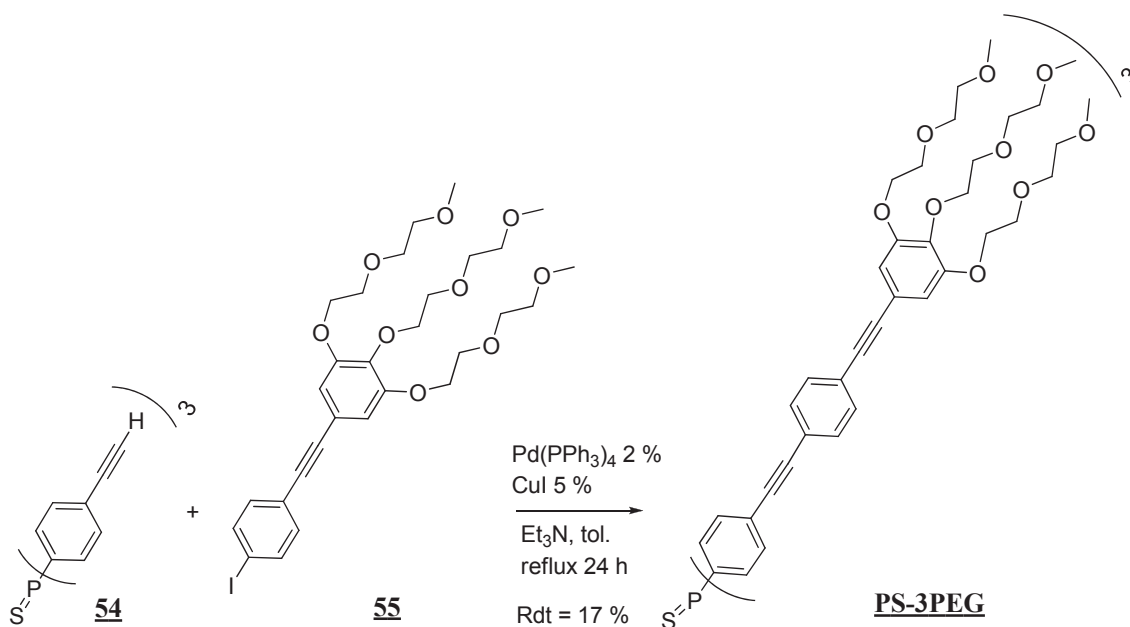
La thiophosphine **54** est obtenue par une réaction d'alkylation du trichlorure de phosphore (Schéma III-6). En effet, l'organomagnésien correspondant au dérivé commercial 4-bromotriméthylsilylphénylacétylène **64** est formé en présence de magnésium au reflux du THF, puis est mis en réaction avec le trichlorure de phosphore pour conduire au phosphane intermédiaire **64**. La réaction d'oxydation de celui-ci en présence de soufre élémentaire  $\text{S}_8$  dans le toluène conduit à la thiophosphine **65** avec un rendement de 45 % sur les deux étapes. Ce dérivé est ensuite désilylé en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dans un mélange de dichlorométhane / méthanol pour conduire à l'intermédiaire clé **54** avec un très bon rendement de 85 %.



**Schéma III-6 :** Préparation de la phosphine **54** après quatre étapes de synthèse.

### I.1.a.3. Accès au PS-3PEG par couplage de Sonogashira

Le composé PS-3PEG est obtenu en utilisant les conditions de couplage de Sonogashira entre la thiophosphine **54** et le dérivé iodé **55**. Le composé PS-3PEG obtenu avec un rendement de 17 % est suffisamment pur pour étudier ses propriétés photophysiques.

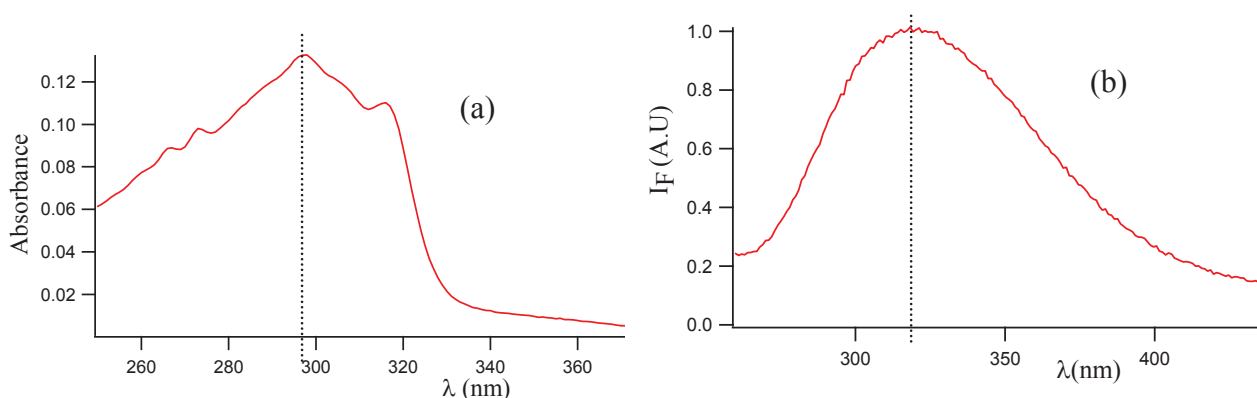


**Schéma III-7 :** Préparation du composé modèle PS-3PEG par couplage de l'alcyne **54** avec le dérivé iodé **55**.

### II.1.b. Propriétés photophysiques du PS-3PEG

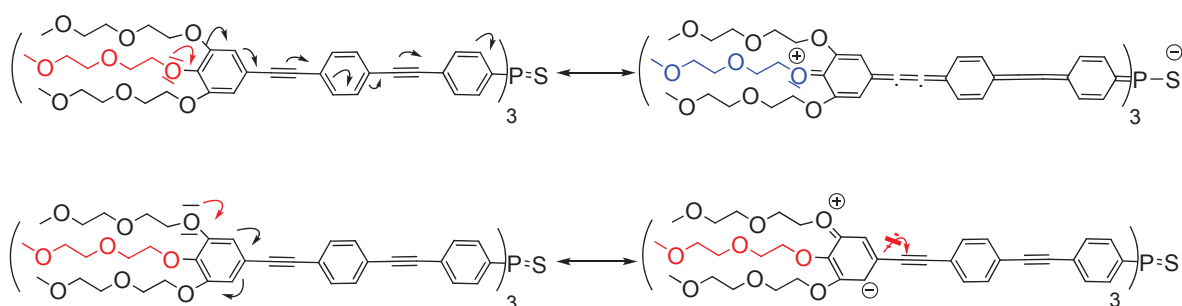
Le composé modèle PS-3PEG obtenu est très soluble en milieu aqueux. La présence de substituants électrodonneurs, ainsi que la  $\pi$ -conjugaison du chromophore permettent d'envisager un déplacement bathochrome des spectres d'absorption et d'émission. Ce déplacement des spectres vers le rouge pourrait nous permettre d'utiliser pour l'excitation du fluorophore des LED à 365 nm qui sont moins chères et plus puissantes en circuit microfluidique que les LED émettant à basse longueur d'onde. Les spectres d'absorption et de fluorescence du PS-PEG sont enregistrés dans de l'eau tamponnée à pH = 4 par l'acide perchlorique (Figure III-3). Contre toute attente, le spectre d'absorption obtenu (Figure III-3-a) est décalé vers le bleu comparé à l'analogue substitué

par un seul groupement donneur du type méthoxy (MeO).<sup>18</sup>



**Figure III-3 :** Spectres d'absorption (figure a), et de fluorescence (figure b) du composé modèle PS-3PEG,  $C = 1,35 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$   $\lambda_{exc} = 314 \text{ nm}$ , solvant eau à  $\text{pH} = 4,2$  ajusté avec le  $\text{HClO}_4$ .

Ce phénomène observé pourrait s'expliquer à partir des formes mésomères des composés aromatiques en fonction de la position du groupement électrodonneur (Schéma III-8). Même si l'efficacité du transfert de charge dépend fortement du pH, de la polarité du solvant utilisé et de la planéité<sup>19</sup> de la molécule, la position des substituants est à prendre en compte. A partir des formes mésomères ci-dessous, on peut supposer que le phénomène observé serait dû à l'effet antagoniste des groupements électrodonneurs en position para et méta du chromophore.



A = groupement électroacteur

**Schéma III-8 :** Les formes mésomères du chromophore pour un groupement donneur en position para et méta.

## II.2. Le composé modèle PS-PEG

### II.2.a. Synthèse de la phosphine PS-PEG

Malgré la très bonne solubilité du composé modèle PS-3PEG dans l'eau, le déplacement hypsochrome des spectres obtenus nous paraît peu séduisant pour une utilisation microfluidique. Dans le but d'avoir une sonde soluble dans l'eau et excitable à une longueur d'onde de 365 nm, nous avons envisagé de synthétiser un analogue monosubstitué par un groupement PEG. La stratégie développée pour la synthèse du composé modèle PS-PEG (Schéma III-9) est identique à

celle utilisée lors de la synthèse du composé PS-3PEG. La première étape de la synthèse est une réaction de substitution nucléophile du PEG activé par un groupement tosylé **67** avec le 4-bromophénol. La réaction effectuée en présence de carbonate de potassium et d'éther couronne a conduit au dérivé bromé **68** avec un rendement de 79 %. L'étape suivante est un couplage de Sonogashira avec le triméthylsilylacétylène pour conduire au composé **69** avec un rendement de 81,5 %. Ce dernier est ensuite soumis à une réaction de déprotection de l'alcyne pour donner l'intermédiaire **70**. Le composé **71** est obtenu par une réaction de couplage de Sonogashira du composé **70** avec le 1,4-diiodophénylène pour conduire au composé **71** avec un rendement de 50 %. Le rendement moyen obtenu est dû à la formation du sous produit de disubstitution. Notre composé modèle PS-PEG est enfin obtenu avec un rendement de 56 % par une nouvelle réaction de couplage de Sonogashira entre 3 équivalents du dérivé iodé **71** et le sulfure de phosphine **54**. Notre deuxième composé modèle ainsi obtenu est suffisamment pur pour étudier ses propriétés spectroscopiques.

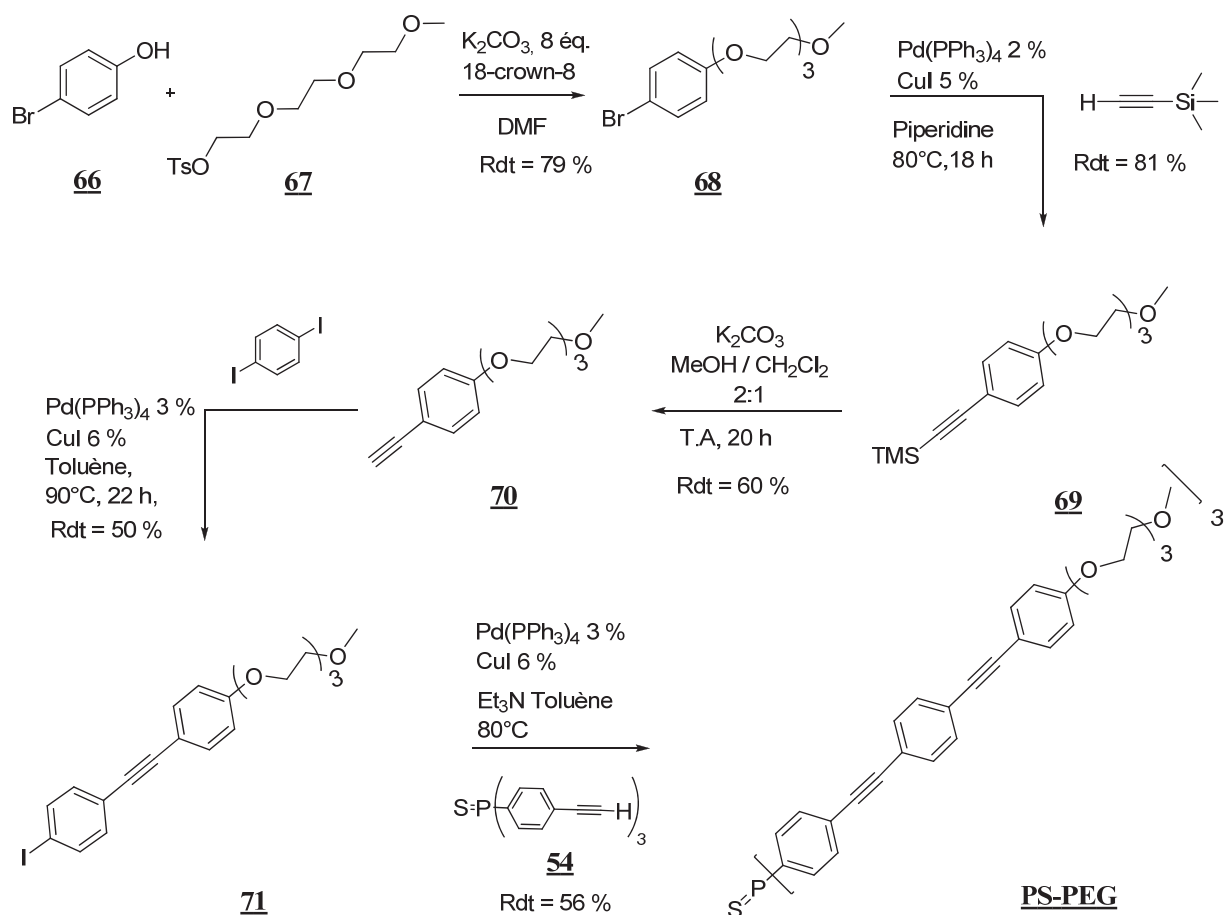
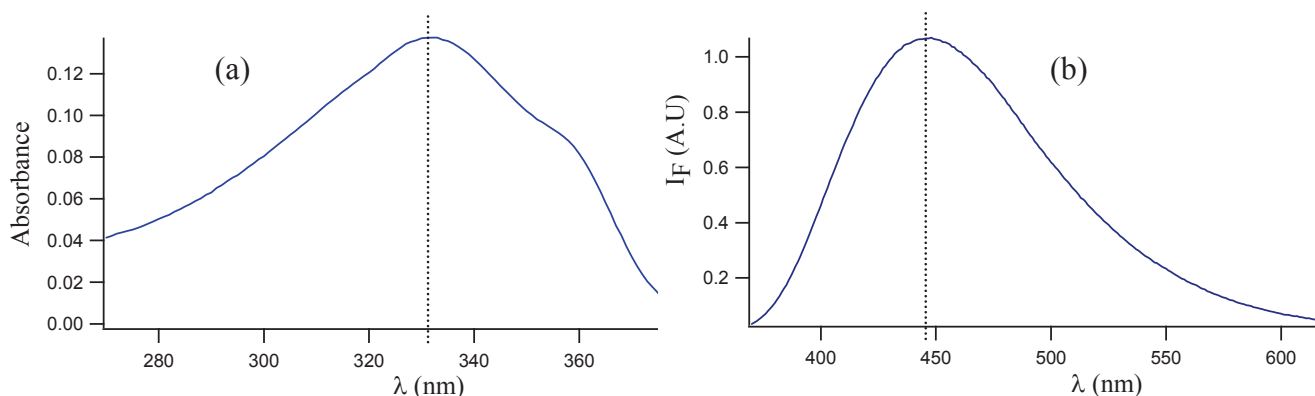


Schéma III-9 : Synthèse du composé modèle PS-PEG.

### II.2.b. Propriétés photophysiques du PS-PEG

Malgré la substitution du chromophore en position para par un groupement PEG, le composé modèle PS-PEG n'est pas très soluble dans l'eau. Le meilleur compromis est obtenu

dans un mélange  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 en volume. La Figure III-4 ci-dessous représente le spectre d'absorption et d'émission à  $\text{pH} = 4$  ajusté avec de l'acide perchlorique. Le spectre d'absorption obtenu (Figure III-4-a) présente un déplacement bathochrome avec un maximum à 335 nm alors que celui du composé modèle PS-3PEG présente un maximum à 297 nm. Donc la substitution par un seul groupement PEG peut permettre d'enregistrer un spectre d'émission (Figure III-4-b) à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm. Pour détecter le mercure en circuit microfluidique à l'aide d'une LED à 365 nm, les groupements phényles de notre ligand spécifique DPPS-PEG sont substitués par un seul PEG.



**Figure III-4 :** Spectres d'absorption (figure a) et d'émission (figure b) du composé modèle PS-PEG,  $C = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$   $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ , solvant eau  $\text{pH} = 4,2$  ajusté par  $\text{HClO}_4$  dans un mélange de solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40.

Le tableau ci-dessous présente les différents maxima des spectres d'absorption et de fluorescence en fonction des substituants sur les composés modèles. Le rendement quantique de fluorescence du composé modèle PS-PEG est légèrement différent de celui de l'analogue PS3 synthétisé au laboratoire (non substitué par des groupements PEG,  $\Phi_F = 0,54$ ).<sup>6</sup> Ceci est dû à la proportion d'eau dans le solvant utilisé ; dans notre cas, pour PS-PEG  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 et  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  80 : 20 dans le cas du PS3. Même si le PS-PEG s'avère moins soluble dans l'eau que le PS-3PEG, son spectre d'absorption en milieu partiellement aqueux ( $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40) nous paraît satisfaisant pour passer à la synthèse du ligand spécifique pour la détection du mercure.

|         | $\lambda_{\text{max}} \text{ Abs (nm)}$ | $\lambda_{\text{max}} \text{ em (nm)}$ | $\Phi_F$ | Solvant   |
|---------|---|--|----------|---|
| PS-3PEG | 297                                     | 319                                    | 0,56     | Eau   |
| PS-PEG  | 336                                     | 343                                    | 0,43     | $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 60 : 40 |

**Tableau III-1 :** Tableau récapitulatif des propriétés photophysiques des composés modèles PS-3PEG et PS-PEG à  $\text{pH} = 4$  ajusté par le  $\text{HClO}_4$ .

## III. Synthèse et propriétés photophysiques du DPPS-PEG

### III.1. Analyse rétrosynthétique

Suite aux résultats obtenus en spectroscopie sur les deux composés modèles PS-3PEG et PS-PEG, nous avons choisi de préparer le ligand bidentate DPPS-PEG à partir d'un chromophore substitué en position para par un seul groupement PEG (Schéma III-10). Pour ce faire, la stratégie envisagée est le couplage de Sonogashira entre l'entité complexante, le bis(diphénylacétylènephosphino)éthane **72** et le dérivé iodé **71**. Le composé **71** substitué par un groupement PEG sur le phényle terminal est décrit précédemment pour la synthèse du composé modèle PS-PEG (voir Schéma III-10).

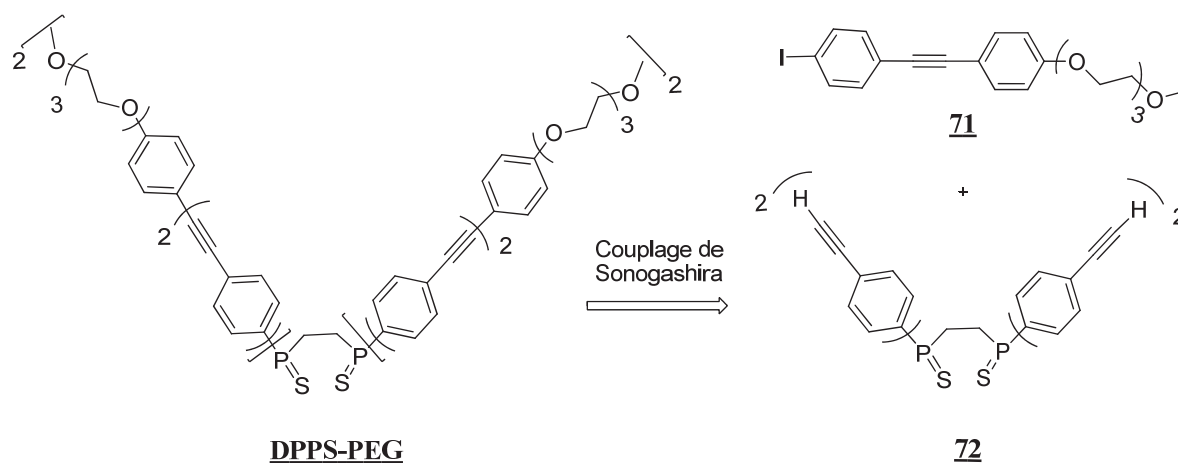


Schéma III-10 : Analyse rétrosynthétique du ligand DPPS-PEG.

### III.2. Synthèse du DPPS-PEG

#### III.2.a. Préparation du sulfure de bis(diphénylacétylènephosphino)éthane **72**

La première étape de la synthèse du composé **72** consiste à préparer l'organomagnésien correspondant au dérivé bromé **67** par une réaction de tétrasubstitution du bis(dichlorophosphino)éthane pour conduire au phosphane **73** (Schéma III-11).<sup>5</sup> Pour éviter toute oxydation du phosphore, le produit obtenu doit être conservé dans des conditions inertes. L'étape suivante est une réaction d'oxydation du phosphore par le soufre élémentaire S<sub>8</sub> au reflux de l'acétone. La phosphine **74** correspondante est obtenue avec un très bon rendement de 82 %. Par une réaction de déprotection de l'alcyne en milieu basique en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans un mélange de dichlorométhane / méthanol, l'entité complexante du mercure **72** est obtenue avec un



rendement de 60 %.

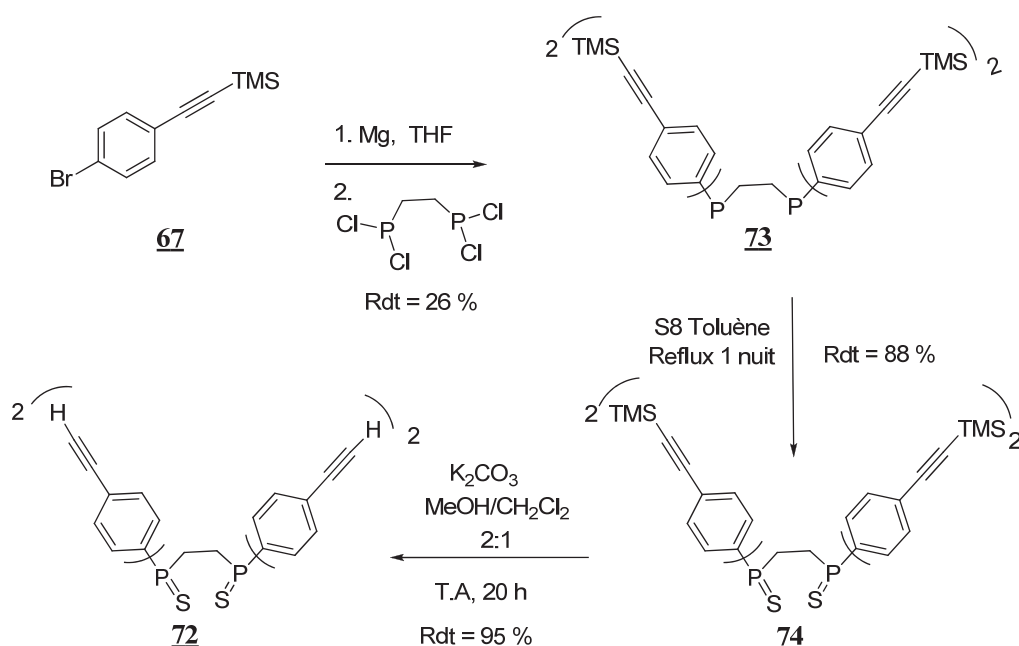


Schéma III-11 : Synthèse de l'entité complexante du mercure.

### III.2.b. Accès au DPPS-PEG par couplage de Sonogashira

La dernière étape de la synthèse permet d'accéder au ligand DPPS-PEG substitué par quatre chromophores (Schéma III-12). Celui-ci est obtenu par une réaction de couplage de Sonogashira entre sulfure de bis(diphénylacétylène phosphino)éthane **72** et le dérivé iodé **71** préparé précédemment. Après plusieurs purifications par chromatographie sur gel de silice, notre produit escompté est obtenu avec un rendement de 45 %. L'analyse RMN<sup>1</sup>H du produit obtenu, montre que celui est suffisamment pur pour étudier ses propriétés complexantes vis-à-vis du mercure en milieu aqueux.

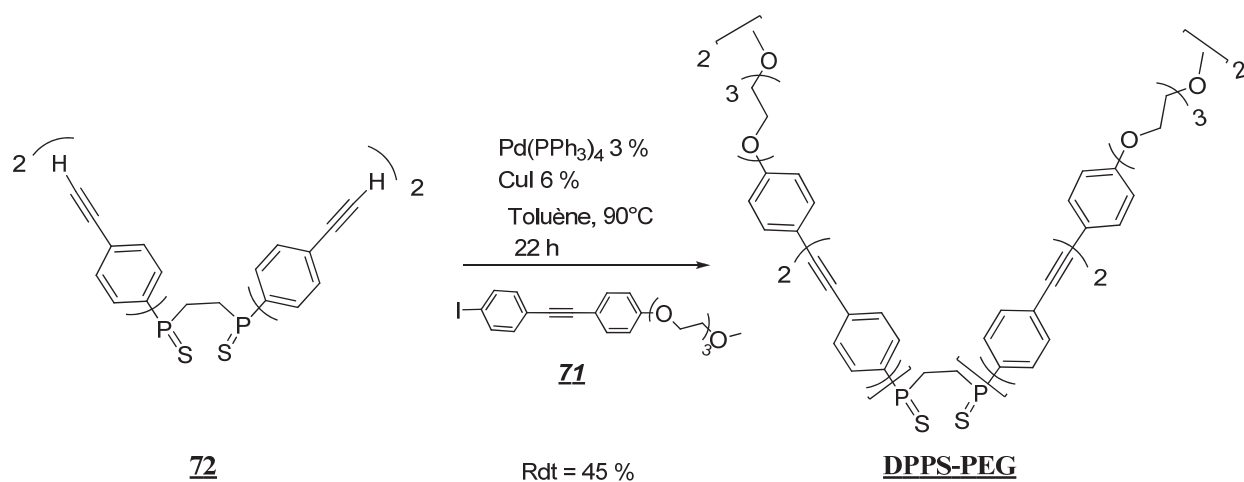
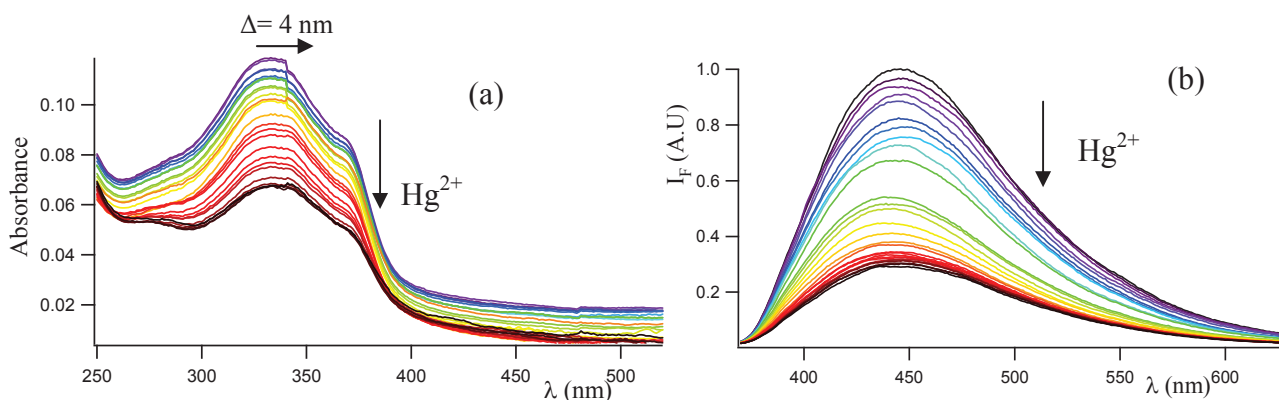


Schéma III-12 : Synthèse du ligand spécifique DPPS-PEG par réaction de couplage de Sonogashira du composé **72** avec le dérivé iodé **71**.

### III.3. Complexation des ions mercuriques par le DPPS-PEG

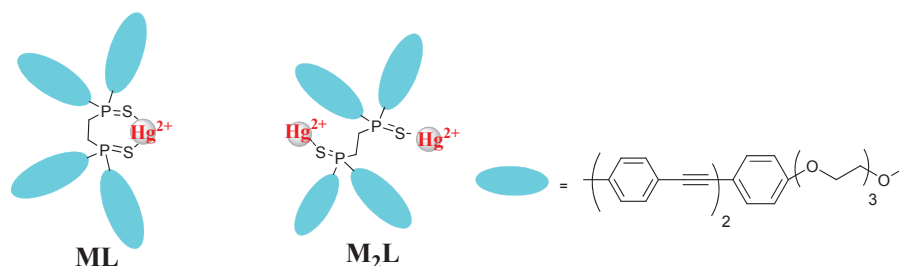
L'étude des propriétés complexantes du ligand DPPS-PEG est effectuée dans un mélange de solvants  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 (v/v) à  $\text{pH} = 4$  tamponné par de l'acide perchlorique. La concentration en ligand est maintenue constante en absorption comme en fluorescence pendant toute la durée du dosage. La Figure III-5 ci-dessous représente l'évolution de courbe d'absorption et de fluorescence par ajout croissant d'une solution de perchlorate de mercure.

En présence d'une quantité croissante d'ions mercurique  $\text{Hg}^{2+}$ , on observe un déplacement bathochrome de 4 nm des spectres d'absorption (Figure III-5-a). Cette variation s'explique par l'affinité entre le soufre et l'atome de mercure.<sup>20</sup> Le caractère accepteur de la phosphine est renforcé, ce qui conduit à une augmentation du caractère transfert de charge du chromophore.<sup>21</sup> En ce qui concerne l'évolution des spectres de fluorescence, l'ajout croissant d'une solution d'ions  $\text{Hg}^{2+}$  induit à une « quenching » de la fluorescence d'environ 70 % (Figure III-5-b). Ce « quenching » de la fluorescence est dû à un phénomène de transfert d'électron entre le fluorophore excité et le mercure complexé par le groupement sulfure de phosphine. Ces phénomènes photophysiques observés ont également été mis en évidence sur son analogue DPPSI étudié au laboratoire pour la complexation du mercure.<sup>5</sup>



**Figure III-5 :** Evolution des spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence (figure b) du DPPS-PEG par ajout croissant d'une solution de perchlorate de mercure,  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 tamponné à  $\text{pH} = 4$ , par le  $\text{HClO}_4$ ,  $C = 1,26 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ .

L'évolution des spectres de fluorescence par ajouts d'une solution de perchlorate de mercure permet d'accéder à la stabilité des complexes formés. L'ajustement numérique effectué à l'aide du logiciel SPECTFIT<sup>TM</sup> est compatible avec la formation de deux types de complexes : un ion de mercurique est complexé par un ligand DPPS-PEG pour donner le complexe ML et deux ions mercuriques sont complexés par un ligand DPPS-PEG pour donner le complexe  $\text{M}_2\text{L}$ . La structure possible de ces complexes est donnée sur le Schéma III-13 ci-dessous.



**Schéma III-13** : Structure des complexes ML et M<sub>2</sub>L du DPPS-PEG avec le mercure.

A partir des résultats de l'ajustement numérique de l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité de mercure ajoutée, deux régimes sont principalement observés :

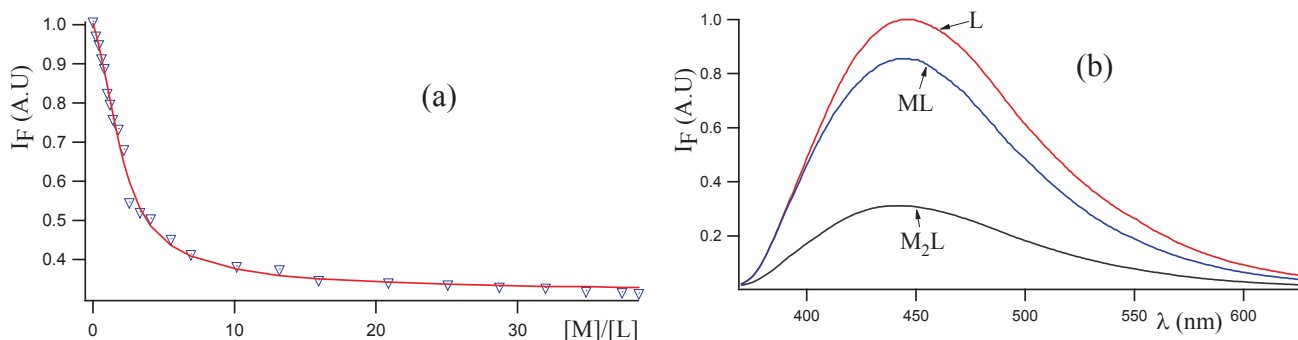
Entre 0 et 4 équivalents de mercure, un premier régime correspond à une stœchiométrie type 1:1 avec une constante de complexation de stabilité apparente :  $\log K_{\text{apparente}} = 6,1 \pm 0,3$ . Ce complexe formé à faibles concentrations de mercure a une stabilité comparable à celle du complexe de même stœchiométrie formé avec le ligand DPPSI ( $\log K_{\text{apparente}} = 6,9 \pm 0,2$ ).

Entre 4 et 25 équivalents, la concentration en mercure dans le milieu favorise la formation du complexe de stœchiométrie 1:2 avec une constante de stabilité apparente de  $\log K_{\text{apparente}} = 12,53 \pm 0,30$ . L'effet chélatant des ligands bidentates avec le mercure est très connu dans la littérature.<sup>22</sup> Ce phénomène explique la stabilité du complexe du complexe formé ML formé avec le DPPS-PEG ( $\log K_{1:1} = 6,1 \pm 0,3$ ). Les ligands chélatants qui engendrent deux groupements sulfures de phosphine peuvent entraîner la formation du complexe de stœchiométrie M<sub>2</sub>L. Les équations ci-dessous décrivent le processus des complexes ML et M<sub>2</sub>L formés avec le DPPS-PEG.



Les constantes de complexation obtenues sont légèrement plus faibles que celles obtenues avec l'analogue DPPSI (voir Tableau III-2) ; cette faible différence s'explique par la proportion d'eau utilisée, celle-ci est de 20 % dans le cas du DPPSI et 40 % dans notre cas. Une limite de détection de l'ordre de 0,27 µg/L ( $1,35 \times 10^{-9}$  mol/L) est obtenue. Celle-ci correspond à la concentration d'ions Hg<sup>2+</sup> pour une intensité de fluorescence trois fois supérieure à celle l'écart type du DPPS-PEG seul.

La Figure III-6-a décrit les deux régimes observés par ajouts croissants d'une solution de perchlorate de mercure. Sur cette figure, on observe un important « quenching » de la fluorescence qui commence à être modéré à partir de quatre équivalents de mercure. La Figure III-6-b décrit les spectres de fluorescence du ligand DPPS-PEG et des complexes ML et M<sub>2</sub>L formés par complexation du mercure.



**Figure III-6 :** Résultats de l'ajustement numérique de l'intensité de fluorescence à 445 nm (figure a) et spectres de fluorescence du ligand L et des complexes formés  $M_2L$  et  $ML$  (figure b) à  $pH = 4$  reconstruits par le logiciel SPECFIT<sup>TM</sup>.

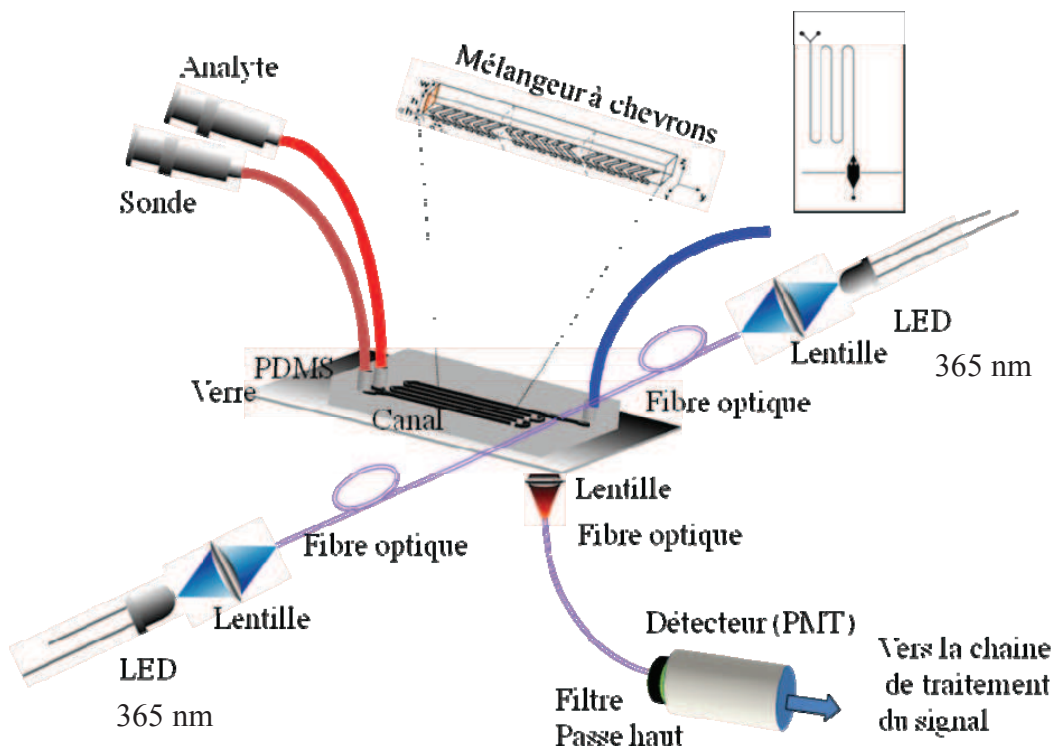
Comme on peut le voir sur le tableau ci-dessous, les constantes de complexation de  $Hg^{2+}$  avec les ligands DPPS-PEG et DPPSI sont du même ordre de grandeur. Les spectres d'absorption et de fluorescence du DPPS-PEG sont légèrement vers le rouge par rapport à ceux du composé DPPSI. Cette variation est de l'ordre 2 nm en absorption et de 4 nm en émission. Le coefficient d'extinction molaire du DPPE-PEG est légèrement plus faible que celui du DPPSI, ce qui serait probablement dû à la substitution du phénol par des groupements polyéthylène glycols (PEG).

|          | $\lambda_{max}$<br>Abs (nm) | $\lambda_{max}$<br>em (nm) | $\Phi_F$ | $(M^{-1}cm^{-1})$ | Log ( $\beta_{1:1}$ ) | Log ( $\beta_{2:1}$ ) |
|----------|-----------------------------|----------------------------|----------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| DPPS-PEG | 336                         | 444                        | 0,15     | 214000            | $6,06 \pm 0,28$       | $12,53 \pm 0,30$      |
| DPPEI    | 334                         | 440                        | 0,32     | 200000            | $6,90 \pm 0,20$       | $13,80 \pm 0,50$      |

**Tableau III-2 :** Tableau récapitulatif des propriétés photophysiques du DPPS-PEG et DPPEI étudiés pour la complexation du mercure.

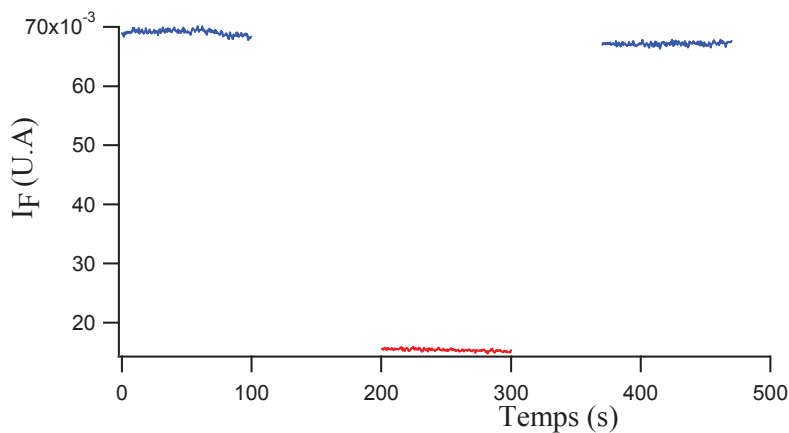
## IV. Complexation du mercure en circuit microfluidique

Nous avons étudié la complexation du mercure par le DPPS-PEG à partir du dispositif microfluidique décrit sur le Schéma III-14 ci-dessous. Ce dispositif est identique à celui utilisé au Chapitre II basé sur le dosage du cadmium par le Rhod-5N. La source excitatrice utilisée ici est une LED à 365 nm. Les études photophysiques sont effectuées dans un mélange de solvants  $CH_3CN / H_2O$  60 : 40 ajusté à  $pH = 4$  par une solution d'acide perchlorique.



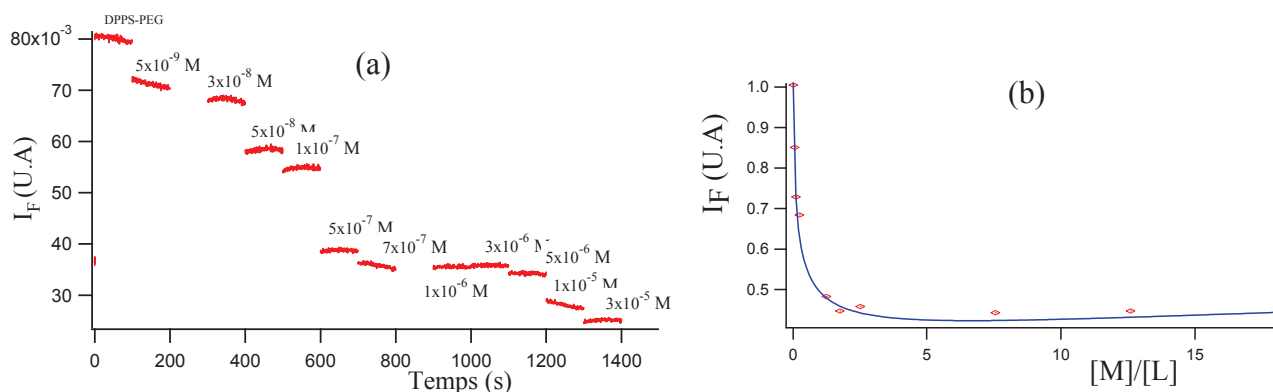
*Schéma III-14 : Schéma de principe du dosage du mercure par le DPPS-PEG en circuit microfluidique.*

Dans un premier temps, nous cherché à étudier la stabilité du DPPS-PEG dans le dispositif microfluidique. La Figure III-7 ci-dessous décrit la variation de l'intensité du DPPS-PEG seul en fonction du temps. Comme on peut le voir, le signal correspondant est stable, on n'observe aucune dégradation du DPPS-PEG en excitant à une longueur d'onde de 365 nm. Le circuit microfluidique est ensuite rincé à l'eau : le signal enregistré est faible, ce qui signifie que nous n'avons pas d'adsorption significative de la sonde sur le substrat de verre ou de PDMS. La réversibilité du système est obtenue en faisant passer à nouveau une solution de DPPS-PEG.



*Figure III-7 : Etude de la stabilité du signal du DPPS-PEG dans le dispositif microfluidique à  $C = 4 \times 10^{-9} M$ .*

Nous avons ensuite étudié la complexation d'ions  $\text{Hg}^{2+}$  par le DPPS-PEG en circuit microfluidique en adoptant la même stratégie que celle utilisée lors du dosage du cadmium par le Rhod-5N (cf chapitre II). La Figure III-8 décrit les premiers résultats obtenus. Comme en solution, la présence d'une quantité croissante de perchlorate mercurique entraîne un « quenching » de l'intensité de fluorescence (Figure III-8-a). La faible exaltation de fluorescence observée entre  $10^{-8}$  M et  $5 \times 10^{-8}$  M est due au fait que nous n'avons pas laissé conditionner notre circuit pendant un temps suffisant. La courbe de calibration correspondante (Figure III-8-b) présente la même allure que celle obtenue en solution. Cependant, ces premiers résultats obtenus sont très encourageants pour faire du DPPS-PEG une sonde très sensible du mercure en circuit microfluidique. La limite de détection obtenue à partir de cette courbe est de l'ordre de  $10 \mu\text{g/L}$ . Cette valeur nous paraît très importante, ce qui est probablement dû aux conditions d'équilibrage du circuit microfluidique.



**Figure III-8 :** Dosage des ions mercurique par le DPPS-PEG à  $C = 1,26 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$  (figure a) et courbe de calibration correspondante (figure b) dans le circuit microfluidique à  $\text{pH} = 4$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ .

## Conclusion

Deux fluorophores modèles ont été synthétisés par des couplages successifs de type Sonogashira. Afin d'augmenter leur solubilité en milieu aqueux, ces composés modèles sont substitués par des groupements polyéthylène glycols. Des études spectroscopiques ont montré que malgré une moins bonne solubilité du PS-PEG par rapport au PS-3PEG en milieu aqueux, celui-ci peut être incorporé en circuit microfluidique en utilisant une LED excitatrice à 365 nm (peu onéreuse). Nous avons ensuite synthétisé le DPPS-PEG, une nouvelle sonde hydrosoluble pour la détection du mercure. Une très bonne complexation des ions  $\text{Hg}^{2+}$  est obtenue en solution. Les complexes formés sont relativement stables avec des constantes de stabilité apparente de  $\log K_{2:1} = 12,53 \pm 0,30$  et  $\log K_{1:1} = 6,06 \pm 0,28$ . Ces constantes sont

très proches de celles obtenues avec l'analogue DPPSI synthétisé au laboratoire et démontre que le DPPS-PEG est un bon complexant du mercure ( $12,53 \pm 0,30$  vs  $13,80 \pm 0,50$ ,  $6,06 \pm 0,28$  vs  $6,90 \pm 0,20$ ). Une limite de détection de l'ordre de  $0,27 \mu\text{g/L}$ , inférieure à celle obtenue avec le DPPSI ( $0,75 \mu\text{g/L}$ ) est déterminée.


Cette sonde est ensuite incorporée dans le dispositif microfluidique ; aucune dégradation significative du fluoroionophore n'est observée. Les premiers résultats de dosages des ions  $\text{Hg}^{2+}$  dans le circuit microfluidique sont très encourageants. Une très bonne complexation des ions  $\text{Hg}^{2+}$  est observée. La courbe de calibration obtenue en microfluidique présente la même allure que celle en solution. De très faibles quantités d'ions  $\text{Hg}^{2+}$  sont détectées avec une limite de détection de l'ordre de  $1 \mu\text{g/L}$ . L'optimisation des résultats du dosage des ions  $\text{Hg}^{2+}$  par le DPPS-PEG en circuit microfluidique est en cours.

## Références Bibliographiques

- 1 J.F. Zhang, C.S. Lim, B.R. Cho, J.S. Kim "A two-photon excited luminescence of water-soluble rhodamine-platinum(II) complex: Fluorescent probe specific for  $Hg^{2+}$  detection in live cell." Talanta **2010** (83), 658-662.
- 2 B. Kuswandi, B.K. Nuriman, H.H. Dam, D.N. Reinhoudt, W. Verboom "Development of a disposable mercury ion-selective optode based on trityl-picolinamide as ionophore." Anal. Chim. Acta **2007** (591), 208-213.
- 3 W.X. Ren, S. Bhuniya, J.F. Zhang, Y.H. Lee, S.J. Lee, J.S. Kim "A new fluorogenic chemodosimetric system for mercury ion recognition." Tetrahedron **2010** (51), 5784-5786.
- 4 T.S. Lobana, R. Verma, A. Singh, M. Shikha, A. Castineiras "Metal-phosphine chalcogenide interactions. Crystal structures of palladium(II)/mercury(II) complexes with 1,2-bis(diphenylthiophosphinyl)ethane containing seven-membered metallacyclic rings." Polyhedron **2002** (21), 205-209.
- 5 M.H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly selective and sensitive phosphane sulfide derivative for the detection of  $Hg^{2+}$  in an organoaqueous medium." Org. Lett. **2007** (9), 1133-1136.
- 6 M.H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly selective and sensitive  $Hg^{2+}$  fluorescent sensors based on a phosphane sulfide derivative." Org. Biomol. Chem. **2009** (7), 1665-1673.
- 7 S. Bidault, L. Viau, O. Maury, S. Brasselet, J. Zyss, E. Ishow, K. Nakatani, H. Le Bozec "Optically tunable nonlinearities in polymers based on photoisomerizable metal-based coordination complexes." Adv. Funct. Mater. **2006** (16), 2252-2262.
- 8 B. Valeur, "Molecular Fluorescence. Principles and Applications " Weinheim, Wiley-VCH. **2002**
- 9 T. Baumgartner, R. Reau. "Organophosphorus  $\pi$ -conjugated materials." Chem. Rev. **2006** (106), 4681-4727.
- 10 H. Wang, Y. Li, X. Fei, L. Sun, L. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Li, Q. Yang "Synthesis and characterization of multifunctional CdTe/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> SiO<sub>2</sub> core/shell nanosensors for  $Hg^{2+}$  ions detection." New J. Chem. **2010** (34), 2996-3003.
- 11 B.K. Nuriman, B. Kuswandi, W. Verboom "Selective chemosensor for Hg(II) ions based on tris[2-(4-phenyldiazenyl)phenylaminoethoxy]cyclotriveratrylene in aqueous samples." Anal. Chim. Acta **2009** (655), 75-79.
- 12 B.K. Nuriman, B. Kuswandi, W. Verboom, "Optical fiber chemical sensing of Hg(II) ions in aqueous samples using a microfluidic device containing a selective tripodal chromoionophore-PVC film." Sensor. Actuat. B Chem. **2011** (157), 438-443.
- 13 Y. Inoue, M. Miyauchi, H. Nakajima, Y. Takashima, H. Yamaguchi, A. Harada "Self-Threading of a Poly(ethylene glycol) Chain in a Cyclodextrin-Ring: Control of the Exchange Dynamics by Chain Length." J. Am. Chem. Soc. **2006** (128), 8994-8995.



- 14 B. Jastrzebska, R.J. Lebel, H. Therriault, J.O. McIntyre, E. Escher, B. Guérin, B. Paquette, W.A. Neugebauer, M. Lepage "New Enzyme-Activated Solubility-Switchable Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging: From Synthesis to in Vivo Imaging." J. Med. Chem. **2009** (52), 1576-1581.
- 15 C. Gentilini, M. Boccalon, L. Pasquato "Straightforward Synthesis of Fluorinated Amphiphilic Thiols." Eur. J. Org. Chem. **2008** (19), 3308-3313.
- 16 T. Sakurai, K. Shi, H. Sato, K. Tashiro, A. Osuka, A. Saeki, S. Seki, S. Tagawa, S. Sasaki, H. Masunaga, K. Osaka, M. Takata, T. Aida "Prominent Electron Transport Property Observed for Triply Fused Metalloporphyrin Dimer: Directed Columnar Liquid Crystalline Assembly by Amphiphilic Molecular Design." J. Am. Chem. Soc. **2008** (130), 13812-13813.
- 17 F. Camerel, G. Ulrich, P. Retailleau, R. Ziessel "Ethyne-Boron Subphthalocyanines Displaying Efficient Cascade Energy Transfer and Large Stokes Shifts." Angew. Chem. **2008** (120), 9008-9012.
- 18 R. Metivier, R. Amengual, I. Leray, V. Michelet, J.P. Genet "Novel fluorophores: Efficient synthesis and photophysical properties." Org. Lett. **2004** (6), 739-742.
- 19 E.B. Veale, T. Gunnlaugsson. "Synthesis, Photophysical, and DNA Binding Studies of Fluorescent Tröger's Base Derived 4-Amino-1,8-naphthalimide Supramolecular Clefts." J. Org. Chem. **2010** (75), 5513-5525.
- 20 Y.K. Yang, K.J. Yook, J. Tae "A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg<sup>2+</sup> Ions in Aqueous Media." J. Am. Chem. Soc. **2005** (125), 16760-16761.
- 21 B. Valeur, I. Leray "Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition." Coord. Chem. Rev. **2000** (205), 3-40.
- 22 S.E. Livingstone "Other sulfure-containing ligands", Compr. Coordi. Chem. Pergamon Press, **1987** (2), 633-659.

The background of the slide is a dark blue, blurred image of a microfluidic device. A central channel is illuminated with a bright, glowing light, creating a focal point of high contrast against the dark surroundings. The overall aesthetic is scientific and technical.

**Chapitre IV : Nouvelle sonde  
fluorescente dérivée du calixarène  
pour le dosage sélectif du plomb  
en milieu microfluidique**



# Chapitre IV : Nouvelle sonde fluorescente dérivée du calixarène pour le dosage sélectif du plomb en milieu microfluidique

## Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| Sommaire .....   | 101 |
| Introduction .....   | 103 |
| I. Présentation du fluoroionophore .....                                     | 104 |
| I.1. Le fluorophore: Dansyle amide .....                                     | 104 |
| I.2. L'ionophore: Calixarène .....   | 105 |
| II. Synthèse .....   | 107 |
| II.1. Synthèse du composé modèle DANS-1-OH .....                             | 107 |
| II.2. Synthèse du calixDANS-3-OH .....                                       | 108 |
| II.2.a. Monosubstitution du calixarène .....                                 | 109 |
| II.2.b. Tri-substitution et saponification du calixarène .....               | 110 |
| II.2.c. Sulfamidation du triacide <b>93</b> .....                            | 111 |
| II.2.d. Réduction de la fonction alcène <b>94</b> .....                      | 112 |
| III. Etudes photophysiques du CalixDANS-3-OH en solution .....               | 112 |
| III.1. Les composés modèles DANS-1 et DANS-1-OH .....                        | 112 |
| III.1.a. Le cas du composé modèle DANS-1 .....                               | 112 |
| III.1.b. Composé modèle DANS-1-OH .....                                      | 114 |
| III.2. Complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH .....                     | 115 |
| III.2.a. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à pH = 3 .....                | 116 |
| III.2.b. Selectivité du CalixDans-3-OH en solution .....                     | 119 |
| III.2.c. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à pH = 5 .....                | 120 |
| IV. Vers une utilisation du CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique .....   | 123 |
| IV.1. Le composé modèle DANS-1-OH greffé sur le PDMS .....                   | 124 |
| IV.1.a. Greffage du composé modèle DANS-1-OH sur les parois du circuit ..... | 124 |
| IV.1.b. Etudes spectroscopiques en circuit microfluidique .....              | 126 |
| IV.2. Le CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique .....                      | 128 |

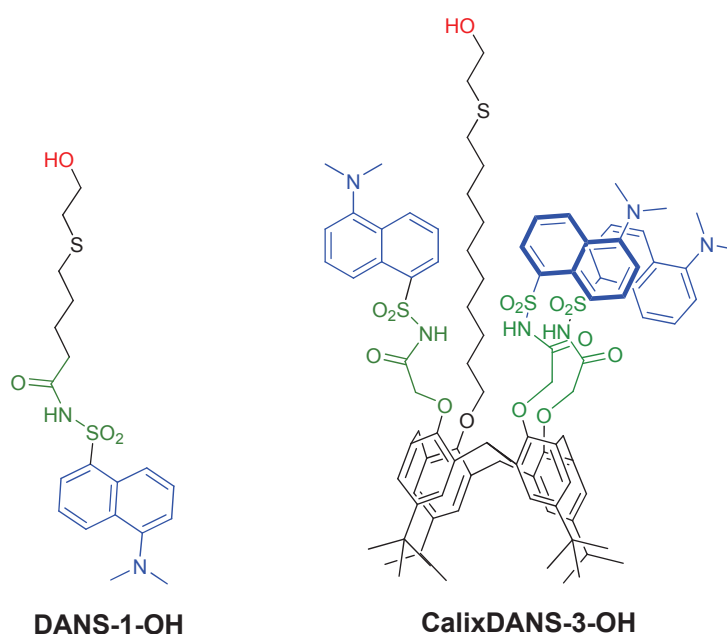
---

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| IV.2.a. | Greffage du CalixDANS-3-OH sur les parois du circuit microfluidique..... | 128 |
| IV.2.b. | Complexation du plomb en circuit microfluidique.....                     | 129 |
| IV.2.c. | Les cations interférents en circuit microfluidique .....                 | 132 |
|         | Conclusion.....  | 133 |
|         | Références Bibliographiques.....   | 135 |

## Introduction

Ce chapitre décrit le travail dont l'objectif principal est de développer une nouvelle stratégie de détection du plomb en circuit microfluidique. Dans le but d'élaborer un dispositif portable et donc réutilisable, il est nécessaire de mettre en place une ingénierie partant de l'architecture de la molécule jusqu'au dispositif de détection dans le circuit microfluidique. Nous avons ainsi décidé de greffer la sonde sur les parois du circuit microfluidique, ce qui devait entraîner une diminution de la consommation en sonde dans le cas de dosages répétitifs.

Dans la première partie de ce chapitre, nous décrirons la synthèse du composé modèle DANS-1-OH à partir duquel nous avons optimisé les conditions de greffage du ligand sur la surface du circuit microfluidique. Nous présenterons également l'étude des propriétés photophysiques du fluorophore DANS-1-OH à base de dansyle amide en fonction du pH du milieu. Nous nous intéresserons également à la synthèse du calixarène substitué par trois groupements dansyles amides et un alcool terminal (CalixDANS-3-OH) dans le but d'exploiter ses propriétés complexantes pour plomb. En ce qui concerne la chaîne porteuse de la fonction hydroxyle, nous avons opté pour une longue chaîne à douze atomes de carbone afin d'augmenter la flexibilité de la molécule. Ceci permettra d'avoir un meilleur accès au niveau de l'entité complexante du fluoroionophore greffé en surface. La Figure IV-1 dessous présente la structure du composé modèle DANS-1-OH et du CalixDANS-3-OH.



*Figure IV-1 : Molécules cibles DANS-1-OH et CalixDANS-3-OH.*

La deuxième partie du travail a consisté à étudier les propriétés photophysiques de nos dérivés à base de dansyle amide. Les propriétés émissives du composé modèle (DANS-1-OH)

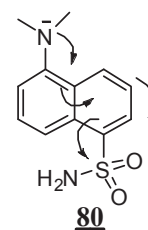
ont été d'abord étudiées en solution. En ce qui concerne le CalixDANS-3-OH, nous étudierons ses propriétés complexantes vis-à-vis plomb en milieu partiellement aqueux. La sensibilité ainsi que la sélectivité de la sonde vis-à-vis des cations interférents seront également présentées.

La troisième partie de ce chapitre est consacrée à la détection du plomb en circuit microfluidique. Dans un premier temps, les possibilités de fonctionnalisation de la sonde fluorescente sur les parois du circuit microfluidique ont été étudiées à partir du composé modèle DANS-1-OH. Pour finir, après optimisation des conditions de détection à partir du composé modèle, nous nous sommes intéressés à la détection du plomb par le ligand CalixDANS-3-OH greffé sur les parois du circuit microfluidique.

## I. Présentation du fluoroionophore

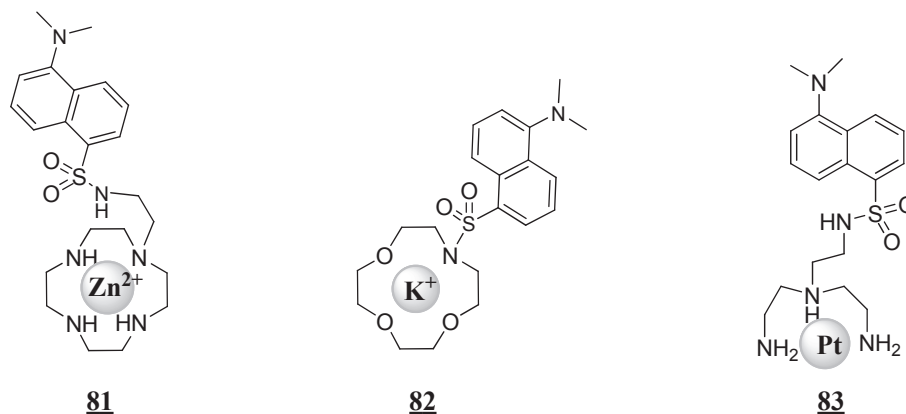
### I.1. Le fluorophore: Dansyle amide

Le fluorophore utilisé dans ce chapitre pour la détection du plomb est un dérivé proche du dansyle amide **80**. Le dansyle amide présente une absorption importante dans le proche ultraviolet et une intense fluorescence dans le domaine visible. Ses propriétés de transfert de charge ont été mises à profit dans de nombreux systèmes.<sup>1,2</sup> Les dérivés du dansyle amide ont été très utilisés en chimie de coordination pour la détection de cations toxiques.<sup>3</sup>



Des systèmes photoactifs basés sur des polymères,<sup>4</sup> dendrimères,<sup>5,6</sup> et des nanoparticules<sup>7</sup> sont également développés et relatés dans la littérature. Les fluorophores à base de dansyle amide sont d'excellentes sondes de polarité : leur déplacement de Stokes est d'autant plus important que le milieu est polaire d'où leur grande utilité en milieu biologique.<sup>8</sup> En effet, les interactions protéine-ligand sont très étudiées dans la reconnaissance des enzymes, l'action des hormones, et la communication cellulaire.<sup>8,9</sup> La plupart des protéines et ADN sont inactifs à l'état déshydraté. Cependant, l'étude du taux d'hydratation est particulièrement intéressante pour leur stabilité et la reconnaissance de certains sites de la protéine. Une voie d'étude des propriétés de la protéine consiste à y incorporer un fluorophore du type dansyle amide sensible à la polarité du milieu.<sup>10,11</sup>

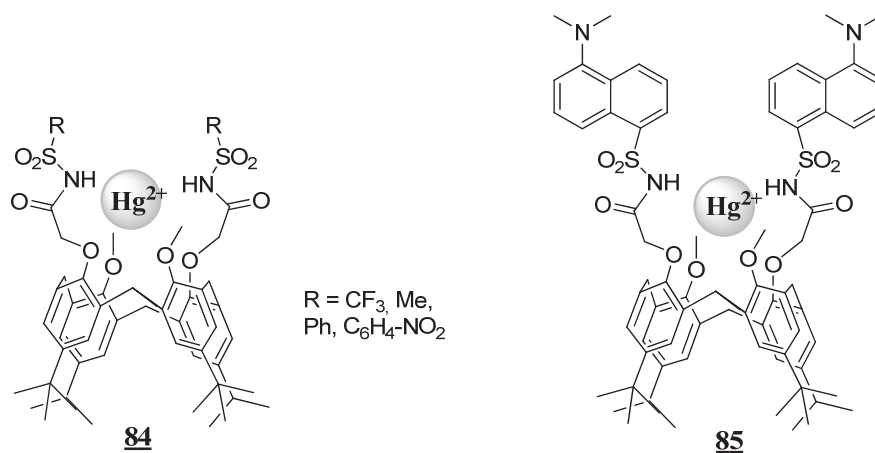
Les fluorophores à base de dansyle amide sont également utilisés pour la complexation des cations alcalins et des métaux lourds (Schéma IV-1). Le déplacement de Stokes, l'extinction ou l'exaltation de la fluorescence sont renforcés lorsque le cation est en interaction avec les fluorophores. Ce phénomène est observé lorsque le dansyle amide est associé à de nombreux ionophores à base de cyclame<sup>12</sup> **81** pour la complexation du Zinc, d'éther couronne<sup>13</sup> **82** pour le potassium et le zinc et de groupements cryptants<sup>14</sup> **83** pour la détection du platine en milieu biologique.



*Schéma IV-1 : Exemples de fluoroionophores à base de dansyle amide.*

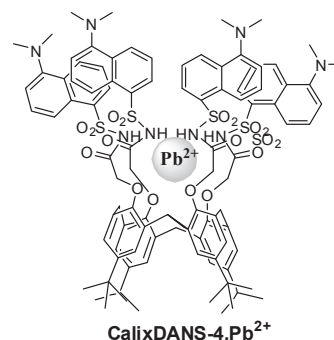
## I.2. L'ionophore: Calixarène

En 1998, Bartsch *et al.* ont été parmi les premiers à utiliser les structures à base de calixarène fonctionnalisé par des groupements N-(X) sulfonamide **84** pour l'extraction des métaux lourds (Schéma IV-2).<sup>15</sup> Une année plus tard, deux fluorophores du type dansyle amide sont fonctionnalisés sur les groupements N-(X) sulfonamides **85** par le même groupe pour l'extraction du mercure.<sup>16</sup>



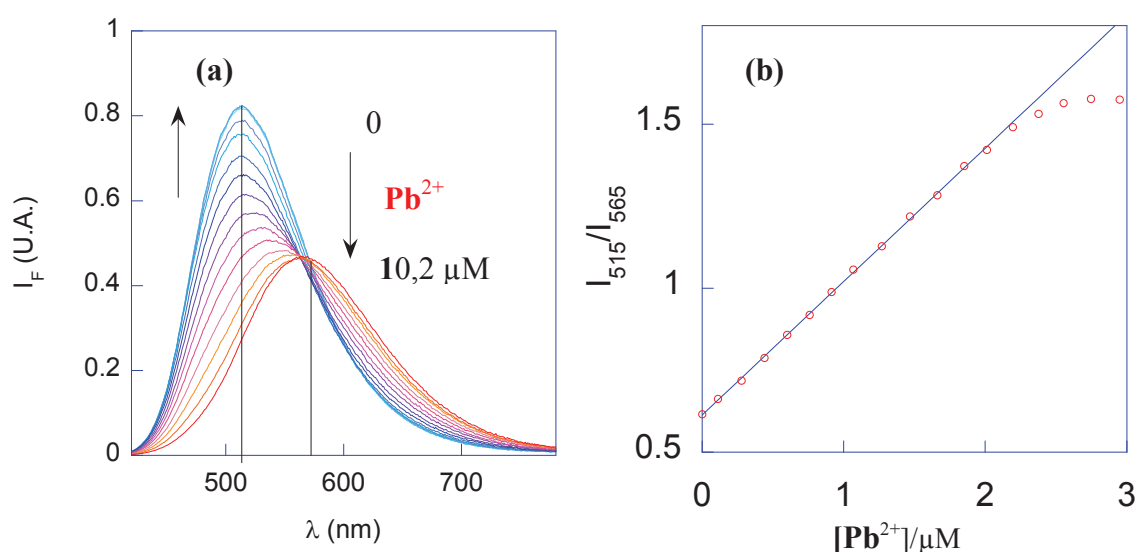
*Schéma IV-2 : Structures à base de calixarène fonctionnalisé par des groupements N-sulfonamides pour l'extraction des métaux lourds.*

Dans un projet d'élaboration de ligands spécifiques pour la détection du mercure, du plomb et du cadmium dans l'eau, le calixarène fonctionnalisé par quatre groupements dansyles amides (CalixDANS-4) a été étudié au laboratoire pour la détection du plomb (Figure IV-2).<sup>17</sup> La complexation du plomb par le CalixDANS-4 effectuée en milieu partiellement aqueux (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O 60 : 40) a conduit à des résultats particulièrement intéressants. L'ajustement numérique des



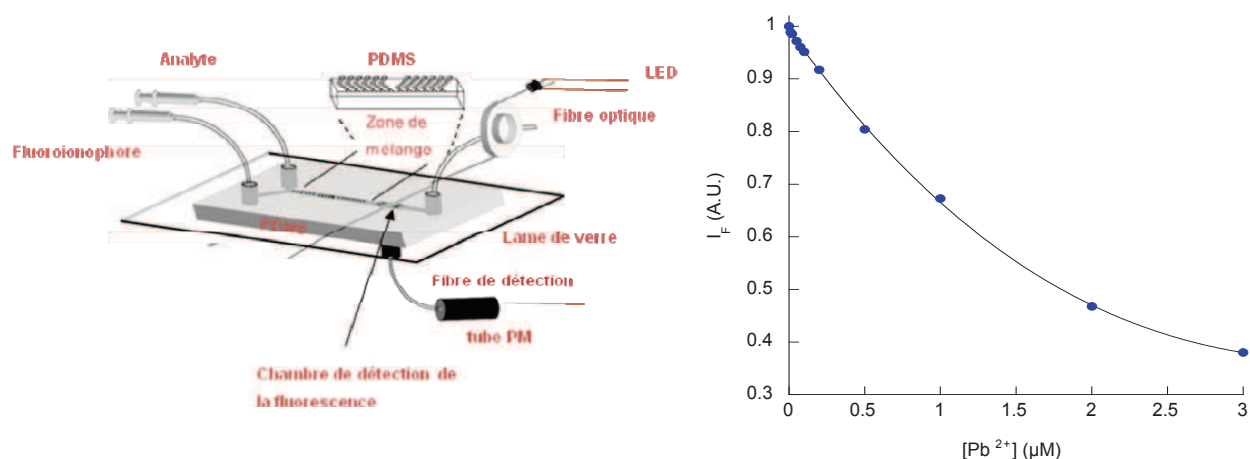


faisceaux de courbe de fluorescence est compatible avec la formation de deux complexes relativement stables. Deux atomes de plomb sont complexés par trois ligands pour conduire au complexe  $M_2L_3$  avec une constante de complexation apparente donnée par  $\log K_{2:3} = 33,5 \pm 1,5$ . A une concentration de métal plus élevée, un atome de plomb est complexé par un ligand ce qui conduit au complexe  $ML$  avec une constante de complexation apparente donnée par  $\log K_{1:1} = 10,0 \pm 0,5$ . Le rapport de sélectivité de la sonde vis-à-vis des cations interférents est supérieur à 1000. Une limite de détection de  $4,2 \mu\text{g/L}$  ( $0,024 \mu\text{mol/L}$ ), largement inférieure à la concentration maximale admissible dans les eaux de boisson en Europe est obtenue. Cette limite de détection est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle donnée pour les autres fluorophores répertoriés dans la littérature pour la détection du plomb.<sup>18,19,20</sup>



**Figure IV-2 :** Fluorescence (a) et courbe de calibration du CalixDANS-4 (b) par ajout croissant de plomb,  $[\text{ligand}] = 3,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ , solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40,  $\text{pH} = 5,2$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ .

Dans le but de répondre au besoin de l'industrie en termes de coût, de sensibilité mais aussi de sélectivité, la complexation du plomb par le CalixDANS-4 a été étudiée en circuit microfluidique.<sup>21</sup> Le dispositif présenté sur la Figure IV-3 ci-dessous rappelle le principe de la détection des métaux lourds en circuit microfluidique. Des études de complexation du plomb en fonction du pH ont permis de choisir le  $\text{pH} = 3,2$  comme pH de complexation dans le circuit microfluidique. Dans ces conditions, la source lumineuse est une diode de luminescente à 365 nm. Après optimisation de la taille, de la forme du circuit et de la vitesse d'injection des analytes une limite de détection de  $5 \mu\text{g/L}$  ( $2,41 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$ ) a été obtenue, toujours inférieure aux normes européennes.<sup>21,22</sup>



**Figure IV-3 :** Détection du plomb en circuit microfluidique par le CalixDANS-4 par ajout croissant de plomb,  $[\text{ligand}] = 5 \times 10^{-7} \text{ M}$ , solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60:40,  $\text{pH} = 3,2$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} > 515 \text{ nm}$ .

Le circuit microfluidique utilisé pour la détection du plomb est constitué d'une couche de PDMS (polydiméthylsiloxane) montée sur un substrat de résine comportant des microcanaux en relief et collée sur une lame de verre. Le PDMS qui est à la base inerte peut être activé pour donner des fonctions hydroxyles de la surface. La fonctionnalisation de la surface du PDMS hydroxylé présente de nombreuses applications dans le domaine de la biologie et de la chimie.<sup>23,24</sup> Dans la mesure où il a été montré au laboratoire que trois groupements dansyles amides participent à la complexation du plomb,<sup>25</sup> nous avons jugé judicieux de synthétiser le calixarène substitué par trois groupements dansyles amides et un groupement fonctionnel du type hydroxyle (CalixDANS-3-OH). Cette sonde est ensuite greffée sur les parois du circuit microfluidique. Cette approche présente l'avantage d'utiliser moins de quantité de sonde fluorescente, mais aussi d'avoir des systèmes réutilisables étant donné que le processus de décomplexation est prouvé en ajoutant une solution d'acide dans le complexe formé.

## II. Synthèse

### II.1. Synthèse du composé modèle DANS-1-OH

La synthèse du calixarène substitué par trois fluorophores et un groupement fonctionnel du type hydroxyle (CalixDANS-3-OH) est délicate. Afin d'étudier la faisabilité d'utiliser un ligand greffé sur les parois du circuit microfluidique, nous nous sommes d'abord intéressés à la synthèse du composé modèle DANS-1-OH. Le DANS-1-OH est constitué d'une entité fluorescente à base de dansyle amide et d'une chaîne fonctionnalisée avec un alcool primaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à étudier la réaction de couplage du groupement dansyle **80**. Le composé **87** est obtenu par réaction d'addition nucléophile de la dansylamine<sup>26</sup> préalablement déprotonée par l'hydrure de potassium dans le THF,<sup>27</sup> sur le

chlorure d'acyle<sup>16</sup> correspondant à l'acide hex-5-énoïque **86** (Schéma IV-3). Une fois le composé **87** obtenu avec un rendement modeste de 33 %, nous avons cherché à fonctionnaliser la fonction alcène terminale. Dans un premier temps, nous avons envisagé d'oxyder cet alcène en acide carboxylique. Les essais réalisés dans les conditions classiques d'oxydation ( $\text{OsO}_4$  et  $\text{RuO}_4$ )<sup>28</sup> des alcènes ont été très décevantes. D'une part, nous n'observons pas le produit attendu et d'autre part, le produit d'oxydation obtenu avait perdu sa fluorescence contrairement au composé de départ **87**. C'est pourquoi nous avons orienté notre étude vers la réduction de la fonction alcène tout en gardant l'idée de le fixer sur les parois du circuit microfluidique. Après l'échec d'une tentative d'hydroboration puis d'oxydation du borane,<sup>29</sup> nous avons réussi à réduire l'alcène en milieu radicalaire (AIBN) en présence de mercaptoéthanol **88** pour conduire au composé DANS-1-OH.<sup>30</sup> Le composé DANS-1-OH à base de dansyle amide et d'un alcool primaire obtenu avec un rendement de 46 % et une pureté suffisante pour l'étude de sa fluorescence en cuve, mais aussi permettre le greffage en circuit microfluidique.

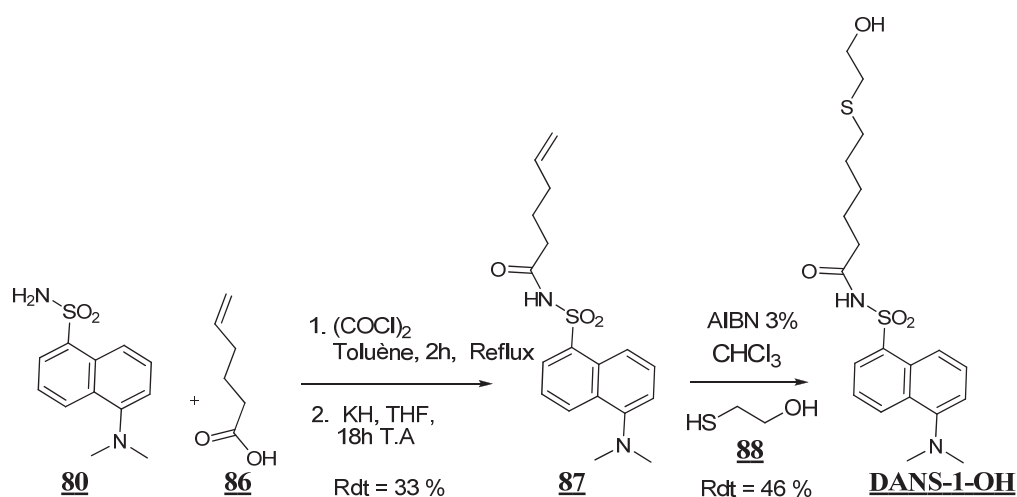
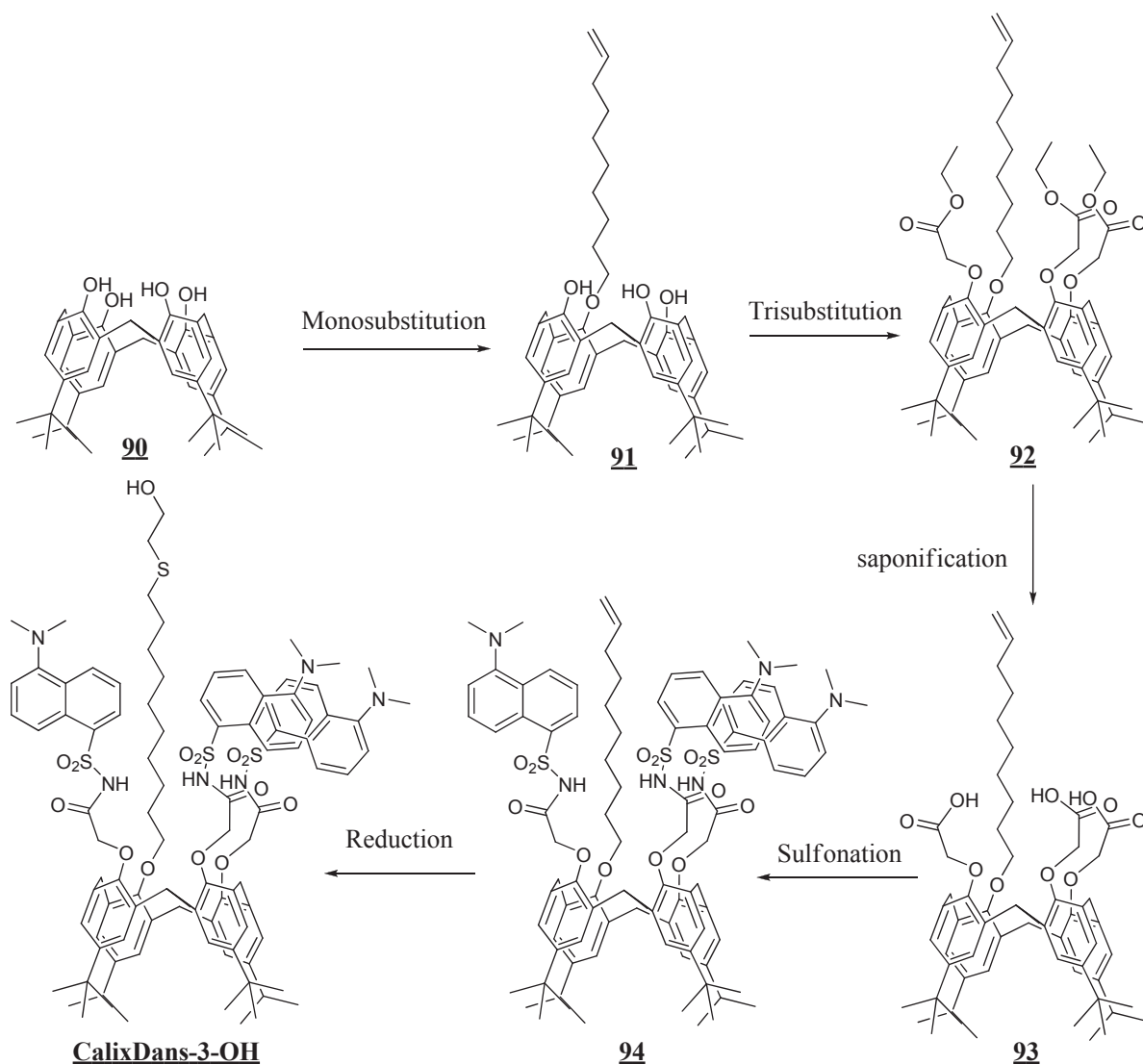


Schéma IV-3 : Synthèse du composé modèle DANS-1-OH.

## II.2. Synthèse du calixDANS-3-OH

Le but de cette partie est de synthétiser une nouvelle sonde fluorescente spécifique pour la détection du plomb en milieu aqueux. Dans le but d'élaborer un dispositif portable et réutilisable, donc facile d'emploi et peu coûteux, cette sonde doit aussi être fonctionnalisable pour pouvoir être greffée sur les parois du circuit microfluidique. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse du calixarène substitué par trois groupements dansyles amides et un alcool primaire. Nous nous sommes inspirés de la voie de synthèse décrite au laboratoire pour une sonde spécifique du mercure.<sup>31</sup> Celle-ci consistait à synthétiser le calixarène substitué par deux groupements dansyles amides et deux longues chaînes alcènes terminales destinées à être greffées sur de la silice mésoporeuse. Nous avons adopté la stratégie suivante (Schéma IV-4):



**Schéma IV-4** : Stratégie de synthèse du ligand CalixDANS-3-OH pour la détection du plomb.

### II.2.a. Monosubstitution du calixarène

Cette étape de la synthèse est très délicate. La grande difficulté de cette réaction est de substituer une seule fonction phénol parmi les quatre du calixarène qui peuvent toutes être substituées (Schéma IV-5).<sup>32,33</sup> Afin de minimiser la formation du produit de disubstitution, il a été nécessaire d'optimiser plusieurs paramètres, notamment travailler en milieu très dilué. Une autre difficulté de cette étape de synthèse intervient lors de la purification car les produits mono et disubstitués dans les conditions choisies ont une polarité très proche. Les produits mono et disubstitués sont distingués par RMN  $^1\text{H}$  (Schéma IV-4) grâce à la valeur de l'intégration du  $\text{CH}_2$  de la nouvelle liaison éther formée et par l'intégration des protons phénoliques. En effet, le produit monosubstitué est caractérisé par un singulet à 9,6 ppm qui intègre pour une fonction OH et d'un singulet à 10,2 ppm qui intègre pour deux fonctions OH. Par contre, pour le produit de disubstitution la molécule devient symétrique, ce qui conduit à

un seul type de fonctions OH qui se traduit par un seul singulet à 7,82 ppm qui intègre pour deux fonctions OH (Figure IV-4).

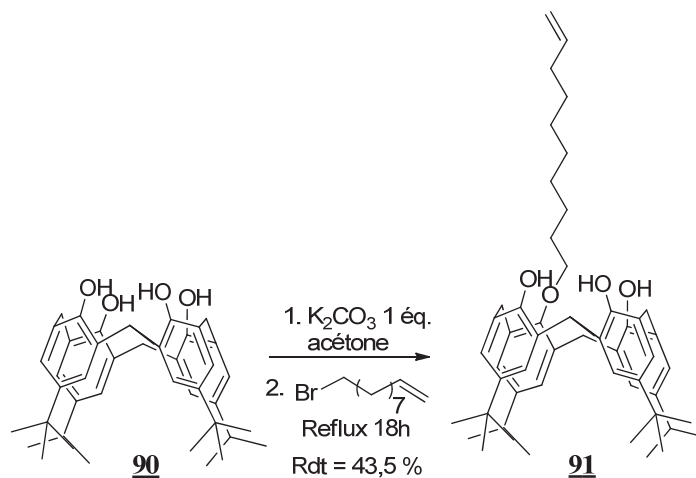


Schéma IV-5 : Monosubstitution du calixarène par le 1-bromodécène.

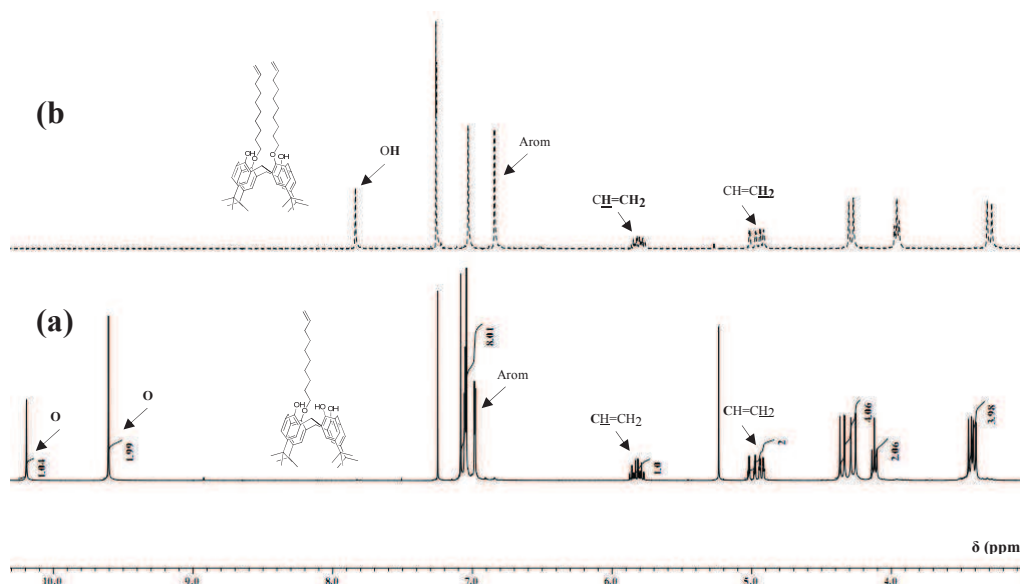


Figure IV-4 : Spectres RMN  $^1H$  du produit monosubstitué (a) et disubstitué (b).

### II.2.b. Tri-substitution et saponification du calixarène

Cette étape consiste à substituer les trois fonctions phénoliques restantes par le bromo-acétate d'éthyle (Schéma IV-6). La première tentative, utilisant  $K_2CO_3$  comme base au reflux de l'acétone<sup>34</sup> a conduit à une dégradation partielle du produit de départ et un rendement très faible d'environ 7 %. Cependant, en utilisant une base plus forte telle que NaH en milieu polaire mixte DMF / THF, nous avons réussi à isoler le composé **92** sans dégradation avec un bon rendement de 56 %.<sup>35</sup> L'étape suivante est une réaction de saponification classique. L'acide **93** est obtenu avec un excellent rendement de 97 % suffisamment pur pour passer à l'étape suivante.

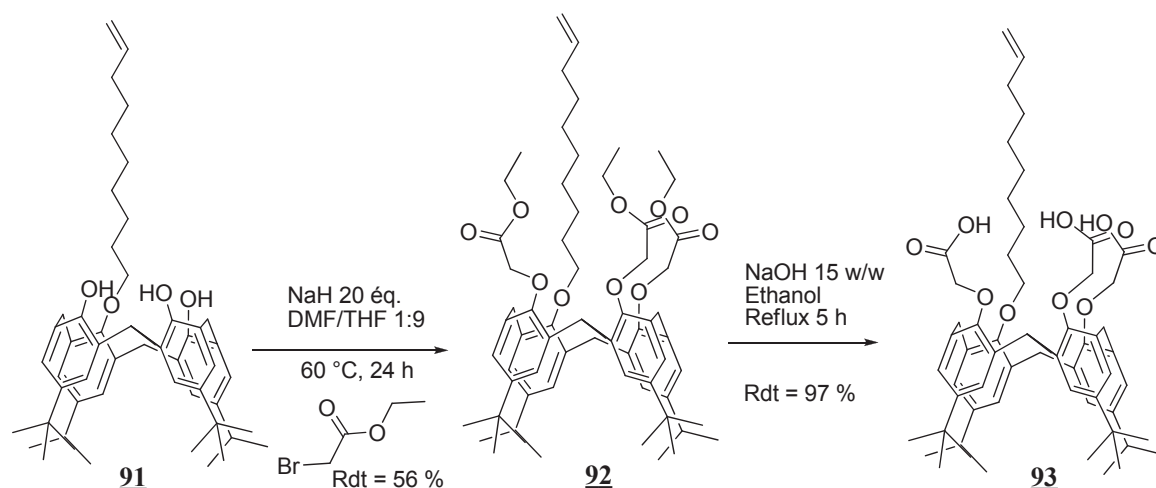


Schéma IV-6 : Tri-substitution et saponification

### II.2.c. Sulfamidation du triacide **93**

L'étape de sulfonation (Schéma IV-7) nécessite de travailler dans des conditions anhydres afin d'éviter des réactions parasites. La première étape consiste à former le chlorure d'acyle correspondant au composé **93**.<sup>31</sup> Après évaporation du solvant sous pression réduite, le chlorure d'acyle brut ainsi obtenu est mis en réaction avec la dansyle amine préalablement déprotonée en présence d'hydrure de potassium pour conduire au composé **94** (Schéma IV-7). La purification de ce produit est très délicate. En effet, en fonction du pH du milieu, le produit peut se protoner au niveau de la fonction amine ou se déprotoner sur la fonction sulfamide et conduire ainsi à différentes formes acido-basiques qui révèlent toutes à l'UV. De plus, lors de l'extraction, des cations tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , *etc...* contenus dans l'eau peuvent être complexés<sup>15</sup> au dérivé **94**, d'où l'utilité d'effectuer plusieurs lavages à l'eau Millipore. Après plusieurs purifications par chromatographie sur gel de silice, nous avons pu isoler le composé **94** avec un rendement de 33 %, en quantité suffisante pour passer à l'étape finale de la synthèse.

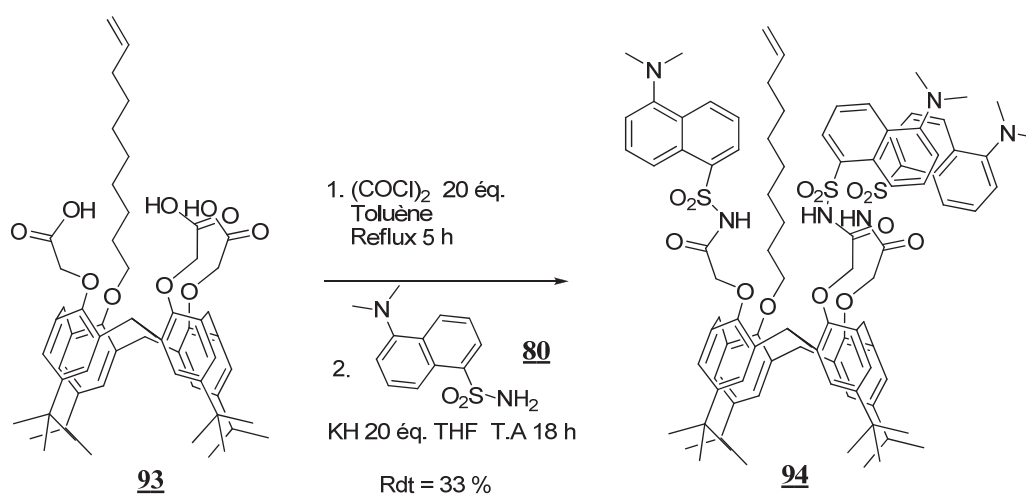


Schéma IV-7 : Sulfonation des groupements acides du calixarène.

### II.2.d. Réduction de la fonction alcène **94**

En ce qui concerne l'étape finale de la synthèse (Schéma IV-8), nous avons utilisé les conditions développées sur le composé modèle Dans-1-OH qui consiste à réduire l'alcène **94** par le mercaptoéthanol en milieu radicalaire.<sup>30</sup> Ainsi un nouveau ligand (Calix-Dans-3-OH), pour la détection du plomb est obtenu avec un excellent rendement de 98 %. Ce nouveau ligand sera d'abord utilisé pour la complexation du plomb en cuve. La sensibilité ainsi que la sélectivité de cette nouvelle sonde seront étudiées. Dans le but de fabriquer un prototype portable pour la détection du plomb, cette sonde sera également fixée sur les parois du circuit microfluidique.

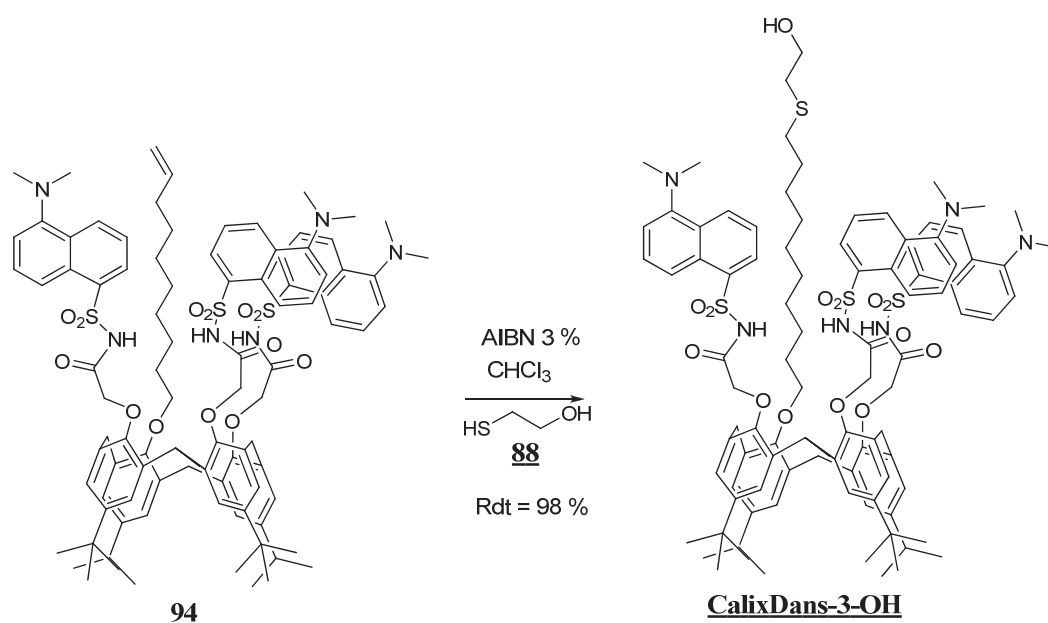


Schéma IV-8 : Réduction de l'alcène terminal en milieu radicalaire.

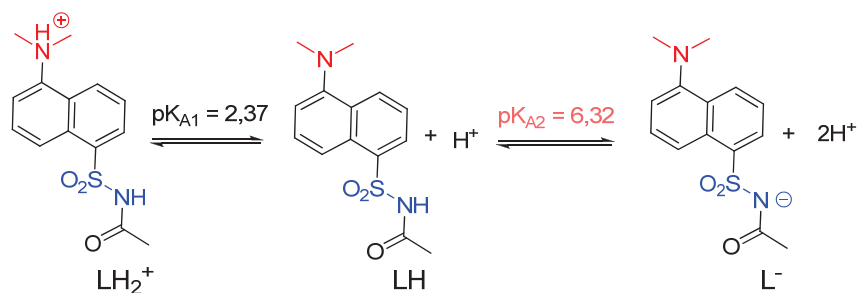
## III. Etudes photophysiques du CalixDANS-3-OH en solution

### III.1. Les composés modèles DANS-1 et DANS-1-OH

#### III.1.a. Le cas du composé modèle DANS-1

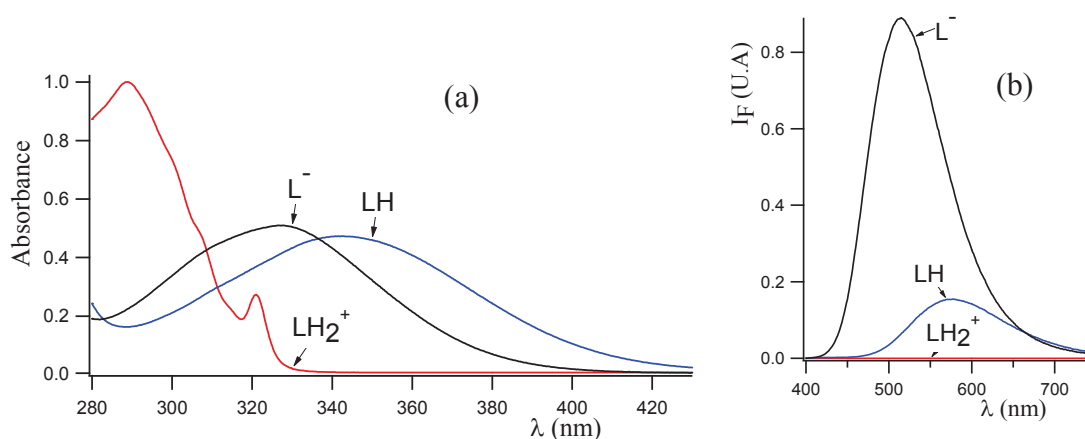
Le composé modèle DANS-1 synthétisé au laboratoire a servi de référence pour étudier les propriétés photophysiques du calixarène substitué par quatre groupements dansyles amides (CalixDANS-4) en absence et en présence de plomb. Les fluorophores à base de dansyle amide dépendent fortement de la polarité du solvant utilisé mais aussi du pH.<sup>36</sup> A partir de la variation de l'intensité de fluorescence du composé modèle dans un mélange

$\text{CH}_3\text{CN} / \text{Eau } 60 : 40$  en fonction du pH, les  $\text{pK}_A$  de celui-ci ont pu être déterminés (Figure IV-5).



**Figure IV-5 :** Les différentes formes acido-basiques du composé modèle DANS-1.

En milieu basique, l'état excité à fort caractère de transfert de charge de la forme déprotonée du groupement sulfamide ( $\text{L}^-$ ) est déstabilisé. Ceci entraîne un faible déplacement vers le bleu du spectre d'absorption et un déplacement important du spectre de fluorescence (Schéma IV-6). Par contre, en milieu acide, la protonation du groupement donneur diméthylamino supprime ce caractère donneur ce qui entraîne un changement radical des spectres d'absorption et de fluorescence du groupement dansyle amide. On observe un très large déplacement hypsochrome du spectre d'absorption (Figure IV-6-a) et une extinction de la fluorescence (Figure IV-6-b) à  $\text{pH} = 0,8$  correspondant à l'espèce  $\text{LH}_2^+$ . Ces différents phénomènes photophysiques observés sont dus à un phénomène photoinduit de type transfert de charge.



**Figure IV-6 :** Spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence (figure b) des différentes formes protonées du DANS-1,  $[\text{DANS}] = 2,2 \times 10^{-5} \text{ M}$  dans un solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O } 60 : 40$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ .

Le caractère électroattacteur du groupement carbonyle située en  $\alpha$  de ce groupe sulfonamide favorise la déprotonation du fluorophore.<sup>15</sup> Cette forme ( $\text{SO}_2\text{N}^-$ ) joue un rôle essentiel dans le processus de complexation du plomb par le calixarène substitué par des groupements dansyles amides.<sup>27</sup> Une étape préliminaire consiste à observer si ces différentes formes acido-basiques existent aussi pour le composé modèle DANS-1-OH.



### III.1.b. Composé modèle DANS-1-OH

Après avoir présenté les propriétés photophysiques du composé modèle DANS-1 étudié au laboratoire lors de la complexation du plomb par le CalixDANS-4, il convient de déterminer les pKa du composé modèle DANS-1-OH (Figure IV-7). Ceci ce nous permettra d'étudier la variation de l'intensité de fluorescence du DANS-1-OH greffé sur les parois du circuit microfluidique en fonction du pH, mais aussi d'optimiser le pH à utiliser pour la complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH.

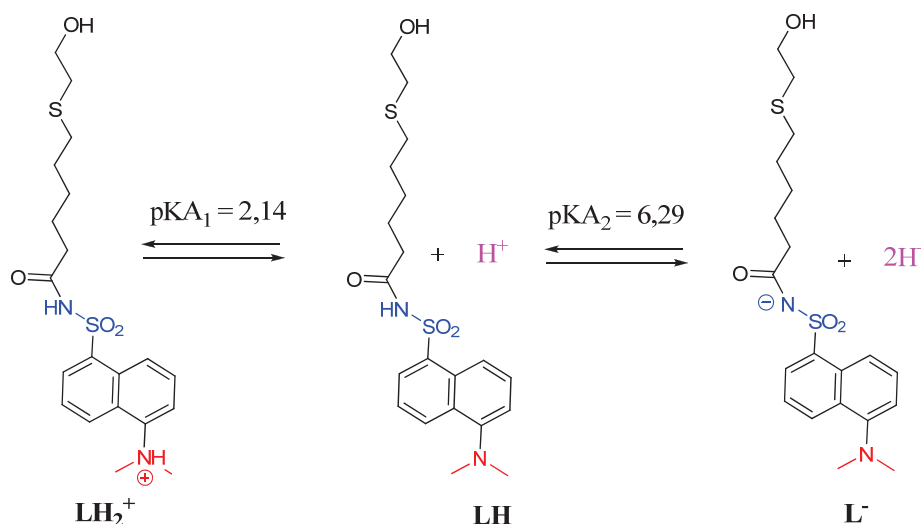


Figure IV-7 : Les diverses formes acido-basiques du composé modèle DANS-1-OH.

L'évolution des spectres d'absorption et de fluorescence du DANS-1-OH avec le pH est présentée sur la Schéma IV-8 ci-dessous. A un pH croissant, on observe une exaltation de l'intensité de fluorescence en émission (Figure IV-8-a) comme en absorption (Figure IV-8-b).

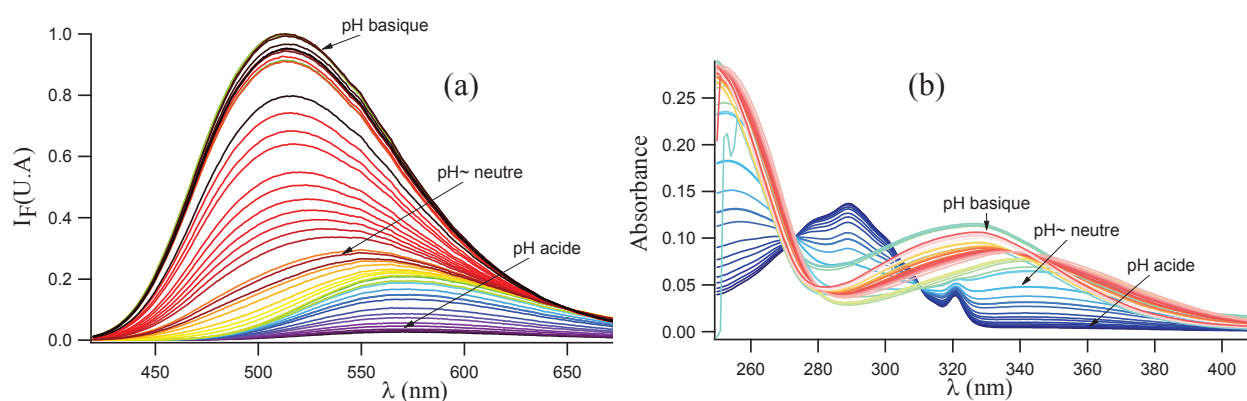
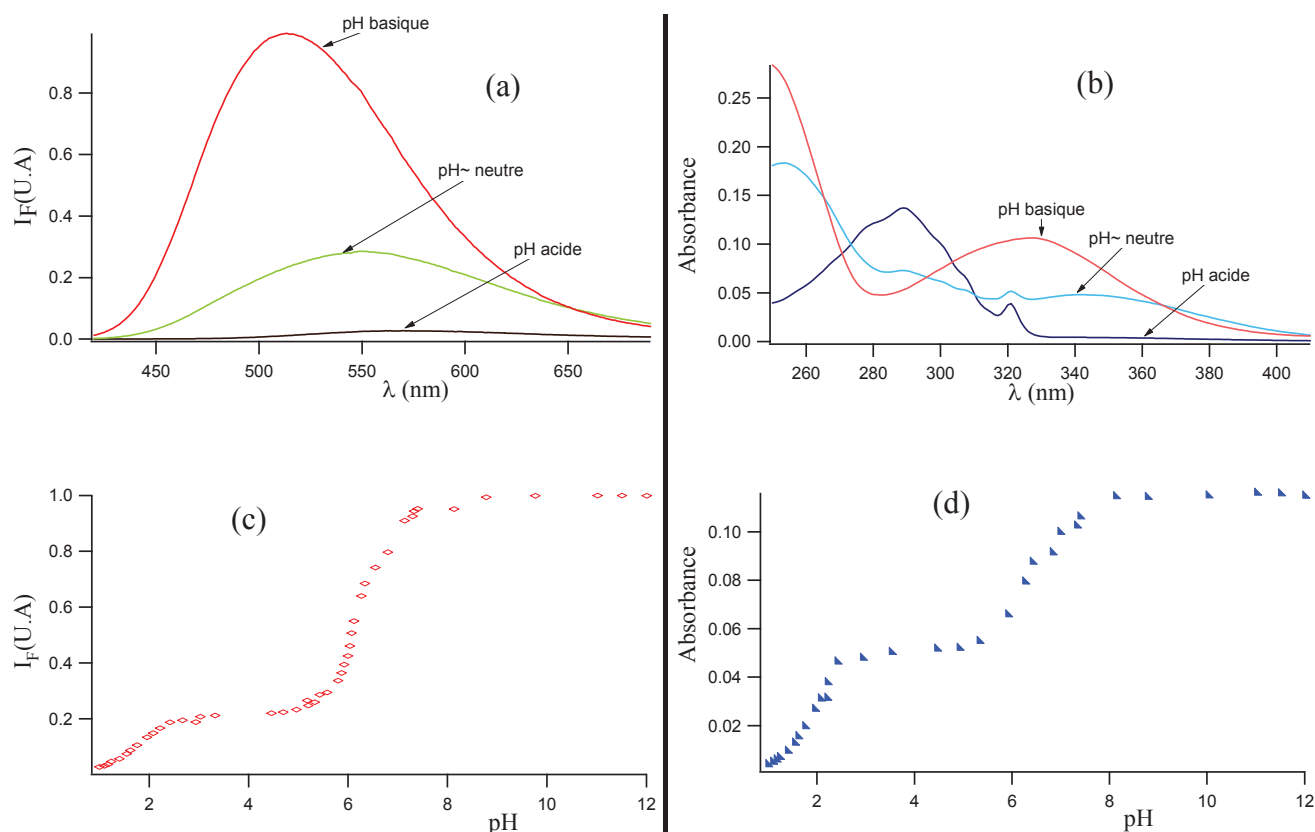


Figure IV-8 : Evolution des spectres de fluorescence (figure a) et d'absorption (figure b) du DANS-1-OH en fonction du pH ( $[DANS-1-OH] = 8,8 \times 10^{-5} M$ ) dans un solvant  $CH_3CN / H_2O$  6 : 4  $\lambda_{exc} = 350$  mn.

A pH basique on observe un déplacement hypsochrome des spectres d'émission de 47 nm (Figure IV-9-a). Ce comportement de l'espèce basique ( $L^-$ ) est similaire à celui observé

pour le composé de référence DANS-1. Cette variation observée en absorption et en fluorescence est due à un processus de transfert de charge du groupement sulfamide déprotoné vers le groupement naphthalène du dansyle amide. En milieu acide, la forme protonée ( $LH_2^+$ ) montre un changement radical du spectre d'absorption et de fluorescence en excitant toujours à une longueur d'onde de 350 nm. A partir de l'ajustement numérique des maxima des faisceaux de courbe de fluorescence (Figure IV-9-d) et d'absorption (Figure IV-9-c) en fonction du pH, nous avons pu déterminer la valeur des  $pK_A$  ( $pK_{A1} = 2,14$  et  $pK_{A2} = 6,29$ ). Les valeurs de  $pK_A$  obtenues sont très proches de celles du composé modèle DANS-1. D'une manière générale, nous observons une bonne corrélation entre les spectres d'absorption et d'émission du composé de référence DANS-1 et le composé modèle DANS-1-OH. L'étape suivante est donc de fonctionnaliser le DANS-1-OH sur les parois du circuit microfluidique et d'étudier la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH.



**Figure IV-9 :** Les différentes formes acido-basiques, en fluorescence (figure a), en absorption (figure b) et visualisation de l'ajustement en numérique des maxima (figure c et c) du composé modèle DANS-1-OH,  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$  dans un mélange  $CH_3CN / H_2O$  6 : 4 à  $pH = 3,2$ .

## III.2. Complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH

Les études de déclin de fluorescence effectuées sur le CalixDANS-4 à un milieu tamponné à  $pH = 5,2$  montrent que trois fluorophores sont sous la forme neutre et un

fluorophore est sous la forme basique. Ceci laisse supposer que seuls les fluorophores neutres participent à la complexation du plomb par le CalixDANS-4.<sup>25</sup> La complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH (Schéma IV-11) est étudiée simultanément par absorption et par fluorescence stationnaire. Les spectres d'absorption et de fluorescence du composé dans un solvant CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O 60 : 40 (v/v) sont enregistrés pour différentes concentrations en cations Pb<sup>2+</sup> à l'aide d'ajouts croissants d'une solution de thiocyanate de plomb Pb(SCN)<sub>2</sub>. La concentration du ligand CalixDANS-3-OH est maintenue constante tout au long du dosage. Aucune variation significative du pH n'est observée au fur et à mesure que l'on ajoute du plomb. L'équation IV-1 ci-dessous permet de déterminer le pH réel du milieu obtenu dans le mélange de solvant acétonitrile / eau :<sup>37</sup>

$$\text{pH}_{\text{réel}} = 0,23 + \text{pH}_{\text{mes}} \quad \text{éq. IV-1}$$

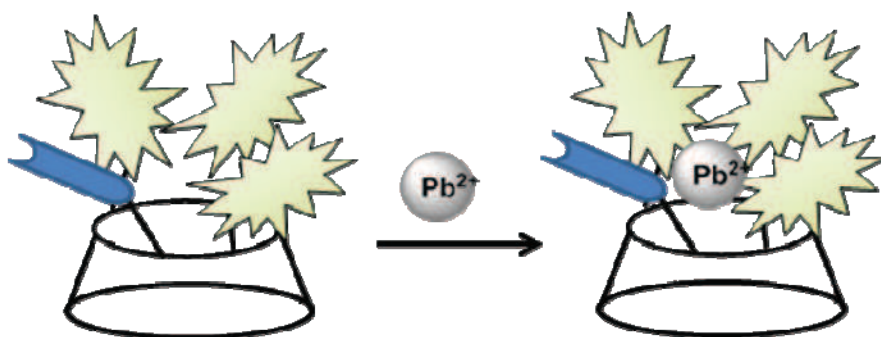
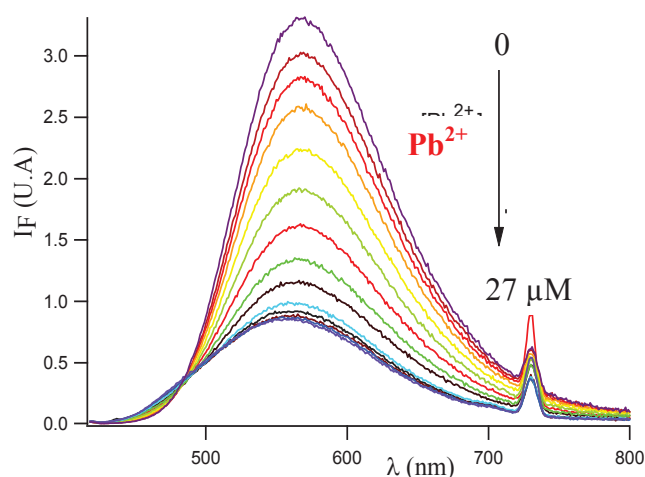


Figure IV-10 : Complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH.

### III.2.a. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à pH = 3

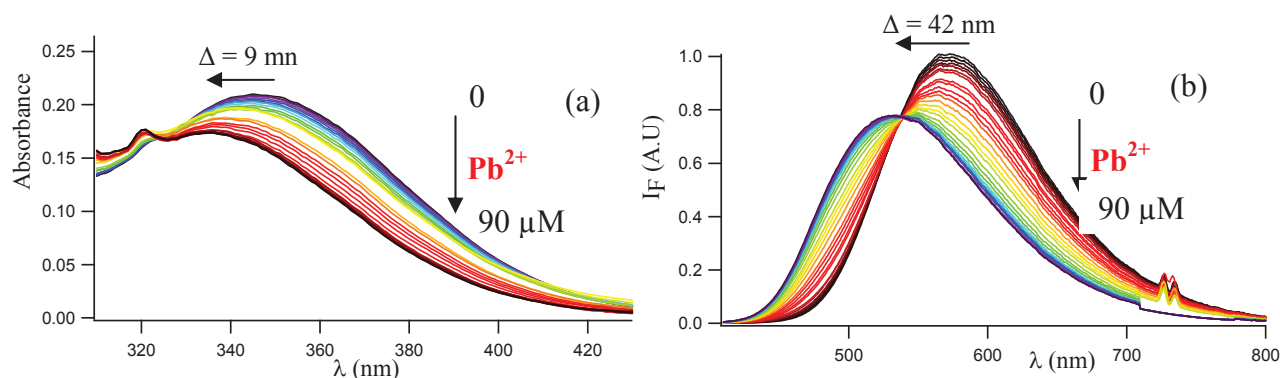
La complexation du plomb par le CalixDANS-4 en solution a été étudiée au laboratoire.<sup>17</sup> A pH = 5,2, en présence d'une quantité croissante d'une solution de thiocyanate de plomb, un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption est observé, ceci est dû à une déprotonation partielle des groupements sulfonamides. Pour doser le plomb à ce pH en circuit microfluidique, il est nécessaire d'utiliser une source lumineuse (LED) à une courte longueur d'onde de 350 nm, qui est peu lumineuse, d'où la nécessité d'optimiser le pH pour pouvoir utiliser une LED à 365 nm qui est très émissive et peu onéreuse. L'étude des propriétés complexantes du plomb par CalixDANS-4 à pH = 3,2 effectuée en cuve (Figure IV-11) a conduit à des résultats particulièrement intéressants. En présence d'une quantité croissante de plomb un « quenching » de la fluorescence est observé. L'ajustement des faisceaux de courbe de fluorescence est compatible avec un seul type de complexe: un atome de plomb est complexé par un ligand ce qui correspond au complexe ML relativement stable ( $\log K_{\text{apparente}}(\text{ML}) = 6,82 \pm 0,35$ ). Une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents est obtenue.<sup>21</sup>



**Figure IV-11** : Dosage du plomb par le CalixDANS-4,  $C = 5 \cdot 10^{-7} M$ ,  $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$  dans un mélange  $CH_3CN / H_2O$  6 : 4 à  $pH = 3,2$ .

Etant donné que seuls trois fluorophores participeraient à la complexation du plomb, nous avons comparé l'efficacité de complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH par rapport au CalixDANS-4. Les études sont effectuées à  $pH = 3,2$  à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm.

En présence d'une quantité croissante de thicyanate de plomb, nous observons une modification des propriétés photophysiques en absorption comme en émission. La Figure IV-12 ci-dessous représente l'évolution des spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence (figure b) du CalixDANS-3-OH. Les effets photophysiques de notre nouvelle sonde (CalixDANS-3-OH) sont comparables<sup>21</sup> à ceux observés pour son analogue CalixDANS-4. Nous observons une légère variation du coefficient d'absorption molaire et un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption de 9 nm. En revanche, une extinction de la fluorescence, suivie d'un déplacement vers le bleu d'environ 42 nm sont mis en évidence lors de la complexation du plomb.



**Figure IV-12 :** Evolution des spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence corrigée (figure b) du CalixDANS-3-OH,  $C = 2,14 \times 10^{-5} M$ , avec des ajouts croissants de thiocyanate de plomb à  $pH = 3$ ,  $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ .

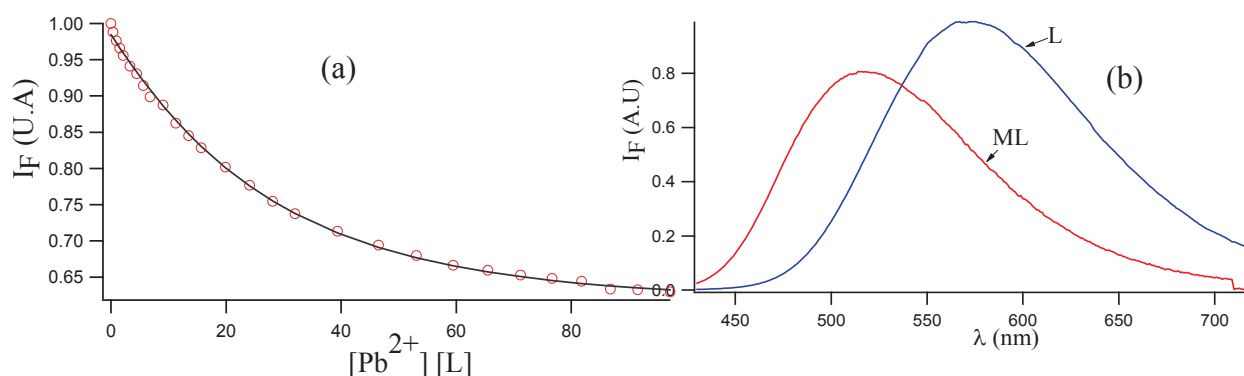
Le Tableau IV-1 ci-dessous présente les caractéristiques photophysiques du calixarène substitué par trois groupements dansyles amides (CalixDANS-3-OH) et quatre groupements dansyles amides (CalixDANS-4) étudiés pour la complexation du plomb. On remarque que le rendement quantique de fluorescence des ces deux composés est quasi identique. Le coefficient d'extinction molaire mesuré pour le CalixDANS-3-OH est inférieur à celui de Calix-DANS-4, un accord avec la diminution du nombre de groupements dansyles amides.

|                | $\lambda_{\max} \text{ Abs (nm)}$ | $\lambda_{\max} \text{ em (nm)}$ | $\Phi_F$ | $\epsilon (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$ | $\text{Log} (\beta_{1:1})$ |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------|-------------------------------------|----------------------------|
| CalixDANS-3-OH | 347                               | 572                              | 0,11     | 9793                                | $4,74 \pm 0,05$            |
| CalixDANS-4    | 341                               | 576                              | 0,12     | 15341                               | $6,82 \pm 0,05$            |

**Tableau IV-1 :** Paramètres photophysiques des composés CalixDANS-3-OH et CalixDANS-4 à  $pH = 3$  dans un mélange de solvant  $CH_3CH / H_2O$  60 : 40.

En regardant de près l'évolution des spectres d'absorption, on observe l'apparition d'un point isobestique à 325 nm. La complexation du plomb par le calixarène fonctionnalisé par des groupements dansyles amides implique une déprotonation partielle des sulfonamides. Le proton libéré dans le milieu est capté par le groupement diméthylamino du dansyle ceci est caractérisé par l'apparition du point isobestique observé. En ce qui concerne l'évolution des spectres d'émission, il convient de souligner l'apparition d'un point isoémisif à 538 nm. Ce phénomène observé est caractéristique d'un équilibre entre le ligand et le complexe formé lors du dosage. D'une manière générale, les phénomènes photoinduits observés sur le calixarène fonctionnalisé avec des groupements dansyles amides sont du type transfert de charge (TC). A  $pH = 3,2$ , la protonation partielle du groupement diméthylamino diminue le caractère de transfert vers le groupement électroattracteur N-sulfonamide, ce qui justifie le « quenching » de la fluorescence observé.

Les évolutions des spectres d'absorption et de fluorescence avec les ajouts successifs de plomb permettent d'accéder à la constante de stabilité des complexes formés.<sup>38</sup> Les faisceaux de courbes de fluorescence obtenus sont traités avec le logiciel SPECFIT™, les résultats de l'ajustement numérique obtenu sont mentionnés en Figure IV-13 ci dessous. La courbe obtenue (Figure IV-13-a) est compatible avec la présence d'un unique complexe. Un ion  $Pb^{2+}$  est complexé par un ligand ce qui conduit au complexe ML de stœchiométrie 1:1 (Figure IV-13-b). La constante de stabilité apparente associée est de  $\log K_{apparente} = 4,74 \pm 0,05$ . La constante de complexation estimée ne représente pas la réaction de complexation théorique mais correspond bien à l'équilibre apparent suivant (éq IV-2):



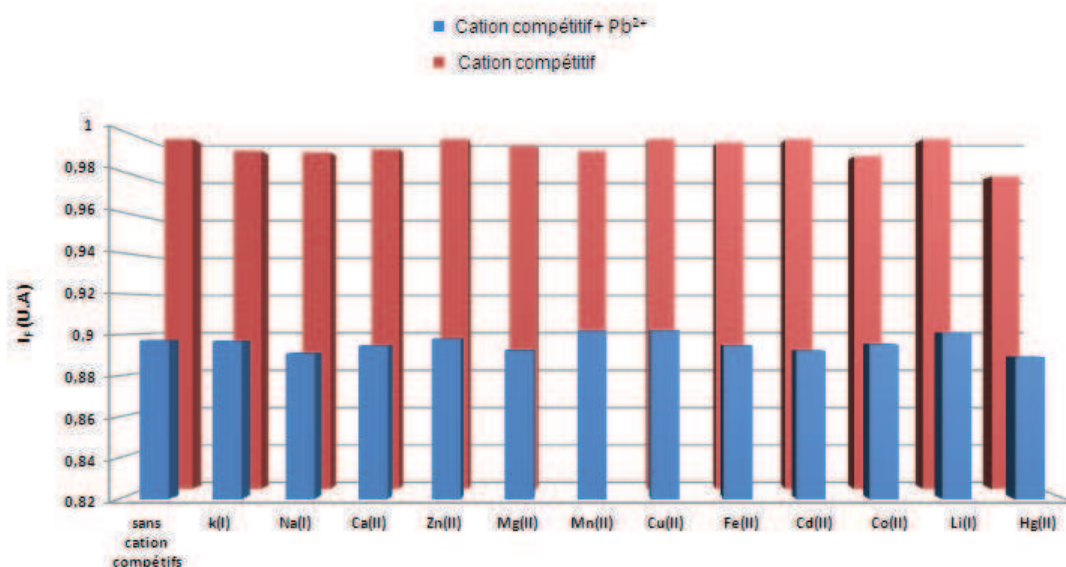
**Figure IV-13 :** Résultats de l'ajustement numérique de l'intensité de fluorescence à 572 nm (figure a) et spectres de fluorescence du ligand L et du complexe ML (figure b) à pH = 3 reconstruits par le logiciel SPECFIT™,  $[L] = 2,14 \times 10^{-5} M$ .

Une limite de détection de l'ordre de  $10,6 \mu\text{g/L}$  ( $4,82 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ) est obtenue, cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le CalixDANS-4 ( $4,2 \mu\text{g/L}$ ,  $2,03 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ). Dans la mesure où il avait été montré que seuls trois fluorophores participent à la complexation du plomb, le complexe formé avec le CalixDANS-3-OH devrait être au moins aussi stable que celui obtenu avec le CalixDANS-4. Cependant, la constante de stabilité du complexe obtenu de stœchiométrie 1:1 ( $\log K_{apparente} = 4,74 \pm 0,05$ ) est plus faible que celle du complexe formé avec le calixarène substitué par quatre groupements dansyles amides<sup>21</sup> ( $\log K_{apparente} = 6,23 \pm 0,05$ ). On peut donc dire que la substitution du calixarène par quatre groupements dansyles amides permet d'avoir une meilleure complexation du plomb.

### III.2.b. Sélectivité du CalixDANS-3-OH en solution

Pour accéder à la sélectivité de notre nouvelle sonde (CalixDANS-3-OH) vis-à-vis du plomb, il est nécessaire d'étudier l'interférence de certains cations susceptibles d'être complexés par le CalixDANS-3-OH. Pour cela, une série de dosages en fluorescence a été

effectuée à  $\text{pH} = 3$  dans un mélange  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40. La concentration des cations compétitifs étudiés est 10 fois supérieure à celle du ligand CalixDANS-3-OH utilisé. La Figure IV-14 ci-dessous présente la réponse de l'intensité de fluorescence du complexe formé avec le plomb en présence de quelques cations compétitifs. Comme on peut le voir, aucune interférence notable de ces cations n'est observée s'ils sont introduits à 10 équivalents. Il faut également signaler que l'interférence de ces cations (pour un équivalent) a été étudiée au laboratoire avec le Calix-DANS-4 ; une interférence des ions  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  a été observée ce qui n'est pas le cas avec le CalixDANS-3-OH.



**Figure IV-14** : Réponse de l'intensité de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 572 \text{ nm}$ ) du CalixDANS-3-OH à une concentration de  $[C] = 10^{-6} \text{ M}$  en présence de quelques cations compétitifs  $[M^{2+}] = 10^{-5} \text{ M}$  et  $\text{Pb}^{2+}] = 10^{-6} \text{ M}$  dans un solvant  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 à  $\text{pH} = 3$ .

Les conditions utilisées ci-dessus permettent une détection sélective du plomb par le CalixDANS-3-OH. Cependant des études préalables utilisant 100 équivalents de cations interférents ont montré une interférence des cations alcalins  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  mais aussi un important « quenching » de la fluorescence en présence d'ions  $\text{Hg}^{2+}$ .

### III.2.c. Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH à $\text{pH} = 5$

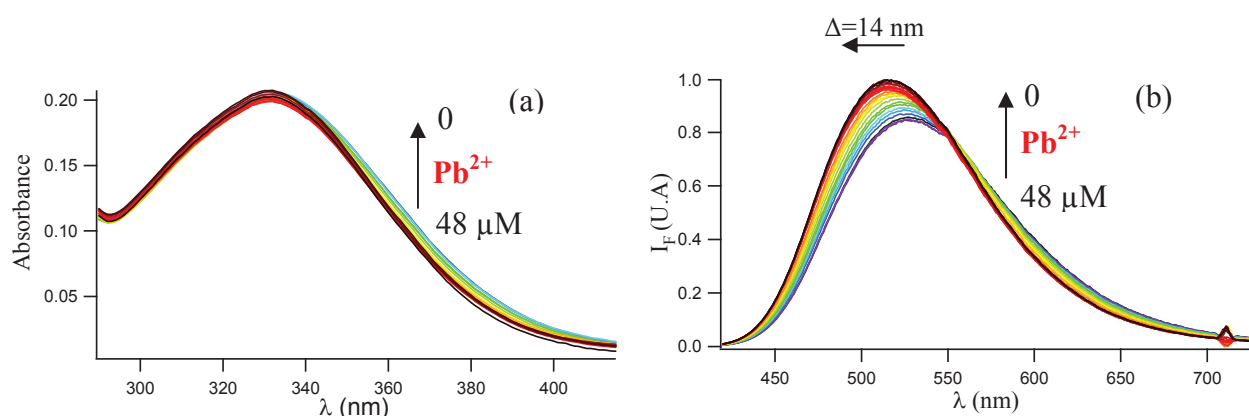
La complexation du plomb par le CalixDANS-4 dans un mélange  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 à  $\text{pH} = 5,2$  tamponné par la lutidine a conduit à des résultats très intéressants (voir paragraphe I.2 p.105). Les constantes de complexation apparentes associées sont relativement stables ( $\log K_{2,3} = 33,5 \pm 1,5$  et  $\log K_{1,1} = 10,0 \pm 0,5$ ). Une très bonne sélectivité ainsi qu'une limite de détection de  $4,2 \mu\text{g/L}$  inférieure aux normes européennes ont été obtenues.

Dans le but de comparer l'efficacité de la complexation du plomb par le CalixDANS-4 et le CalixDANS-3-OH, nous avons effectué le dosage à  $\text{pH} = 5,2$  (Figure IV-15). L'ajout d'une quantité croissante d'une solution de thiocyanate de plomb montre un très faible

déplacement des spectres d'absorption vers le bleu (Figure IV-15-a). Les variations des phénomènes photophysiques sont plus importantes en émission ; on observe un déplacement hypsochrome de 14 nm et une exaltation de la fluorescence (Figure IV-15-b). L'exaltation de la fluorescence observée à  $\text{pH} = 5,2$  est due à un fort caractère de transfert de charge du groupement électrodonneur diméthylamine vers le groupement électroattracteur sulfonamide déprotoné. En observant de près l'évolution des spectres d'émission, deux régimes particulièrement intéressants attirent l'attention :

- Entre 0 et 0,8 équivalent de plomb ajouté, un point isoémissif apparaît à 549 nm (Figure IV-15-b). L'apparition de ce point isoémissif explique que dans les conditions utilisées le ligand et le complexe formé sont présents à des proportions variables.

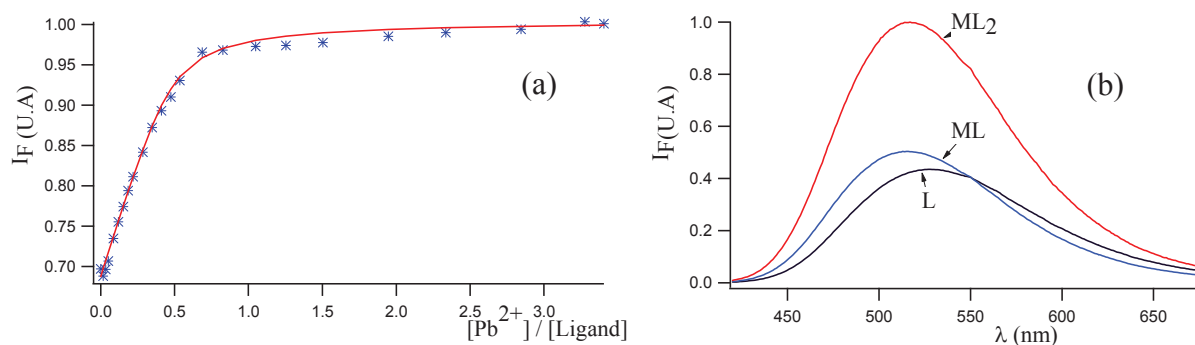
- Au delà de 0,8 équivalent, les changements spectraux observés sont beaucoup plus modérés. On observe une légère variation de l'intensité de fluorescence, et le point isoémissif disparaît. Cette progression observée en émission démontre l'existence d'une espèce supplémentaire dans des domaines de concentration en plomb plus élevés.



**Figure IV-15 :** Evolution des spectres d'absorption (figure a) et de fluorescence corrigée (figure b) ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ) du CalixDANS-3-OH,  $C = 1,71 \times 10^{-5} \text{ M}$  avec des ajouts croissants d'une solution de thiocyanate de plomb  $\text{pH} = 5,2$ .

Pour expliquer l'évolution des spectres d'émission en présence d'une quantité croissante de plomb, on peut envisager l'hypothèse suivante : le dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH fait intervenir deux types de complexes (Figure IV-16). Les complexes formés sont suffisamment séparés à l'échelle des concentrations et leur point de rupture serait aux alentours de 0,85 éq. On peut donc envisager un complexe de stœchiométrie 1:2 (le plomb complexé par deux ligands  $\text{ML}_2$ ) et un complexe 1:1 (le plomb complexé par un ligand  $\text{ML}$ ).





**Figure IV-16 :** Résultats de l'ajustement numérique de l'intensité de fluorescence à 515 nm (figure a) et spectres de fluorescence du ligand L et des complexes  $ML_2$ , ML,  $C = 1,71 \times 10^{-5} M$ ,  $pH = 5,2$  (figure b) reconstruits par le logiciel SPECFIT<sup>TM</sup>.

Un ajustement numérique des faisceaux de courbes de fluorescence à une longueur d'onde d'émission de 515 nm (Figure IV-16-a) effectué grâce au logiciel SPECFIT<sup>TM</sup> est tout à fait compatible avec l'apparition de deux complexes successifs  $ML_2$  et ML. Le complexe  $ML_2$  est formé à des concentrations faibles de métal avec une constante de  $\log K_{apparente} (ML_2) = 12,01 \pm 0,59$ . Le complexe ML est formé en fin de dosage avec une constante de  $\log K_{apparente} (ML) = 6,36 \pm 0,35$ .

La Figure IV-16-b présente les spectres de fluorescence des trois espèces L, ML et  $ML_2$  reconstruits par le logiciel SPECFIT<sup>TM</sup>. Celle-ci montre que les domaines d'existence des deux complexes ML et  $ML_2$  sont cohérents avec les deux régimes observés en émission.

D'une manière générale, les spectres obtenus sont comparables à ceux du CalixDANS-4 à  $pH = 5,2$ . Il convient de souligner quelques différences. D'une part, une très faible variation des spectres d'absorption est observée. D'autre part, en émission, une exaltation de fluorescence d'environ 15 % est obtenue alors que celle-ci est de 50 % pour la CalixDANS-4. Si on compare la constante de stabilité des complexes formés de stœchiométrie 1:1, celle obtenue pour la CalixDANS-3-OH est nettement inférieure à celle du CalixDANS-4 ( $\log K_{apparente} = 6,36 \pm 0,35$  vs  $K_{apparente} = 10,0 \pm 0,5$ ). Cette différence observée à  $pH = 3$  comme à  $pH = 5,2$  montre que pour la détection du plomb, le CalixDANS-4 est plus sensible que le CalixDANS-OH.

Des tentatives de dosage du plomb par le calixarène substitué par deux groupements dansyles amides ont été effectuées au laboratoire. La constante de complexation de stœchiométrie 1:1 obtenue est de  $\log K_{apparente} = 4,02 \pm 0,50$ . Cette valeur est inférieure à celle obtenue pour le CalixDANS-3-OH. Donc à partir de ces informations, on peut dire que l'efficacité de la complexation dépend en partie du nombre de groupements sulfonamides fonctionnalisés sur le calixarène.

Le Tableau IV-2 ci-dessous présente les caractéristiques photophysiques du calixarène substitué par deux groupements dansylamides (CalixDANS-2), trois groupements dansyles

amides (CalixDANS-3-OH) et quatre groupements dansyles amides (CalixDANS-4) étudiés pour la complexation du plomb. D'une manière générale, les complexes formés avec le CalixDANS-3-OH sont moins stables que ceux formés avec le CalixDANS-4. En comparant les dosages du plomb par le CalixDANS-3-OH effectués en cuve à pH = 3 avec ceux à pH = 5,2, on constate que la variation des phénomènes photophysiques est plus importante à pH = 3. Par conséquent, pour étudier la complexation du plomb en circuit microfluidique, les mesures seront réalisées à pH = 3.

|                | $\lambda_{\max}$<br>Abs (nm) | $\lambda_{\max}$<br>em (nm) | $\Phi_F$ | $\epsilon$<br>( $M^{-1}cm^{-1}$ ) | Log ( $\beta_{1:2}$ ) | Log ( $\beta_{2:3}$ ) | Log ( $\beta_{1:1}$ ) |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|----------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| CalixDANS-2    | 328                          | 574                         | 0,084    | 6960                              | -                     | -                     | 4,02 ± 0,3            |
| CalixDANS-3-OH | 331                          | 514                         | 0,26     | 12431                             | 12,01 ± 0,5           | -                     | 6,36 ± 0,3            |
| CalixDANS-4    | 338                          | 566                         | 0,12     | 16230                             | -                     | 33,5 ± 0,5            | 10,0 ± 0,5            |

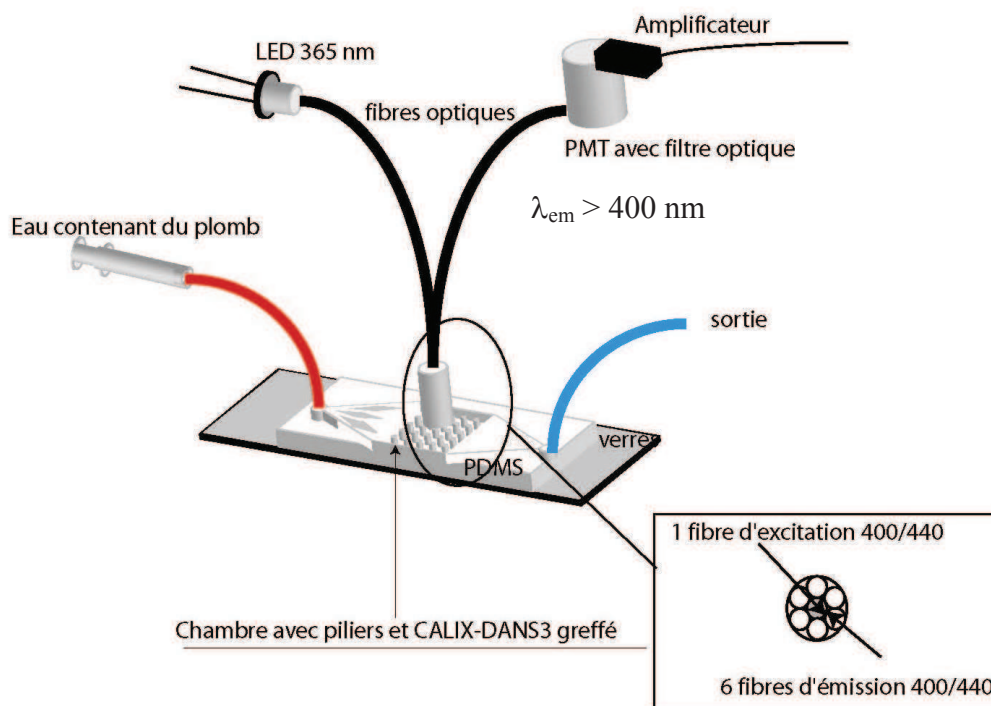
*Tableau IV-2 : Paramètres photophysiques de divers composés du calixarène substitués par des dansyles amides à pH = 5,2 dans un mélange CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O 60 : 40.*

Les conditions utilisées montrent une bonne réponse de notre nouveau ligand CalixDANS-3-OH vis-à-vis du plomb. Donc, dans la suite du travail, les études de la complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique seront effectuées à pH = 3 avec une longueur d'onde d'excitation de 365 nm. Le taux de greffage du ligand sur les parois du circuit, la vitesse injection de l'analyte, ainsi le dispositif de détection seront également étudiés.

## IV. Vers une utilisation du CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique

Depuis le développement des premiers circuits microfluidiques<sup>39,40</sup> dans les années 1990, l'utilisation de la microfluidique dans le domaine de la chimie ne cesse de se développer. Cette technique a été utilisée au laboratoire<sup>21,22</sup> dans le cadre de la détection du plomb par le CalixDANS-4. Un dispositif microfluidique adapté à la détection sensible et sélective du plomb par le CalixDANS-4 a été décrit au paragraphe I.2. La plupart des substrats utilisés pour fabriquer les circuits sont à base de polydiméthylsiloxane (PDMS). L'utilisation du PDMS a pour avantage d'être facile à mettre en œuvre, transparent et la surface de celui-ci peut facilement être modifiée pour des applications chimiques ou biologiques.<sup>41</sup> Nous avons donc décidé d'étudier les performances de la microfluidique en

fonctionnalisant le ligand CalixDANS-3-OH sur les parois du circuit (voir dispositif ci-dessous).



**Figure IV-17 :** Principe de détection du plomb à partir du circuit microfluidique fonctionnalisé par le CalixDANS-3-OH.

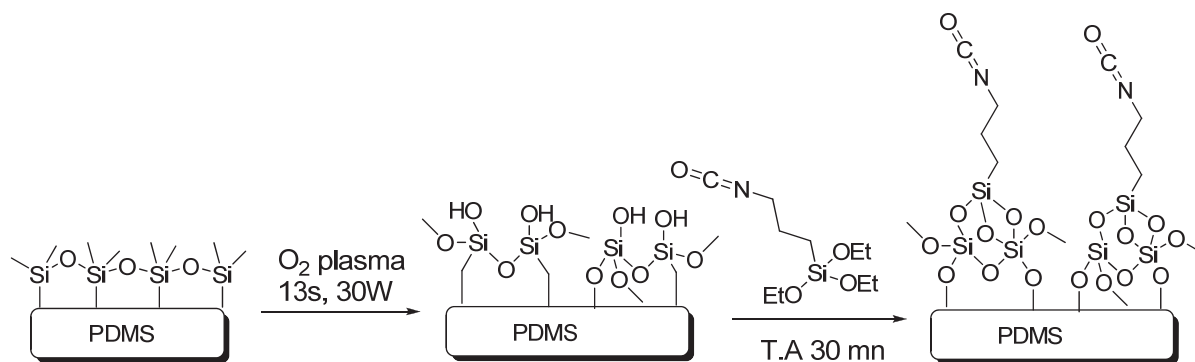
Cette nouvelle approche présente l'avantage d'utiliser moins de ligand. Par ailleurs, le dispositif peut être réutilisé dans le cadre des analyses de routine et pourrait également être adapté à la détection de plusieurs cations en greffant plusieurs sondes spécifiques. Une première partie du travail consiste à partir du composé modèle DANS-1-OH. Après optimisation des conditions de greffage et de détection à partir du composé modèle, une étude détaillée de la complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH fonctionnalisé sur les parois du circuit sera effectuée.

## IV.1. Le composé modèle DANS-1-OH greffé sur le PDMS

### IV.1.a. Greffage du composé modèle DANS-1-OH sur les parois du circuit

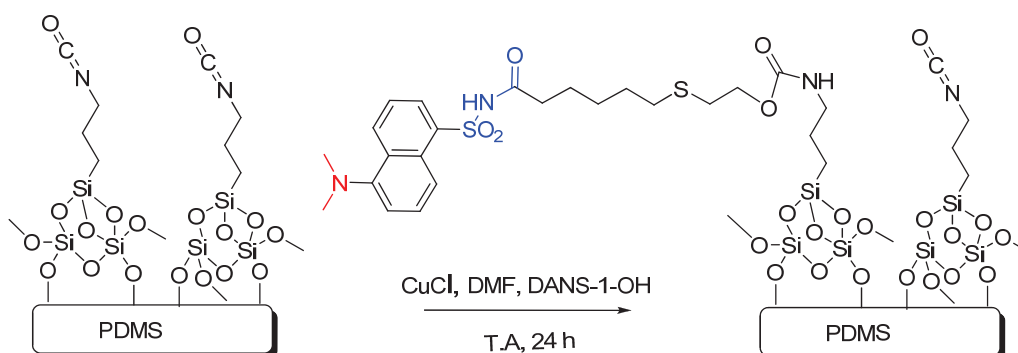
La surface du PDMS est constituée par des groupements siloxanes qui sont de nature inerte. Plusieurs approches d'activation de la surface du PDMS ont déjà été décrites dans la littérature. Parmi celles-ci, on peut citer les réactions oxydatives en milieu acide à partir de l'eau oxygénée<sup>42</sup> ou le traitement sous plasma oxygène.<sup>43</sup> En traitant la surface du PDMS avec

un plasma oxygène, les ponts siloxanes sont ouverts, ce qui conduit à des fonctions OH libres à la surface du PDMS (Schéma IV-9). L'étape suivante consiste à fonctionnaliser la surface avec un composé possédant des groupements fonctionnels pouvant réagir avec la fonction hydroxyle de notre composé modèle, le CalixDANS-1-OH. Notre choix s'est porté sur les structures à base de triéthoxysilane et d'isocyanate à cause de leur grande réactivité. Par une réaction de substitution nucléophile à partir d'une solution pure de triéthoxysilane propylisocyanate, le PDMS modifié est prêt à être fonctionnalisé par le composé modèle (DANS-1-OH).



**Schéma IV-9 :** Activation et fonctionnalisation de la surface du PDMS par un dérivé silylé.

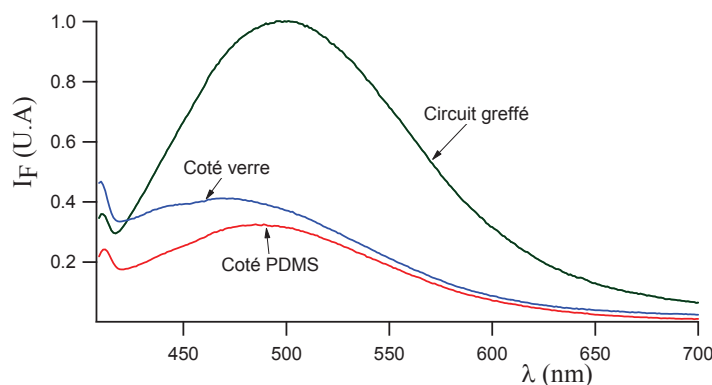
L'étape suivante consiste à greffer le fluorophore à la surface du PDMS hydroxylé. L'une des principales difficultés est le choix du solvant adéquat pour cette réaction. La plupart des conditions décrites dans la littérature ne conviennent pas pour notre cas. Les solvants utilisés pour cette réaction sont le toluène ou la triéthylamine, or ces derniers entraînent le gonflement du PDMS.<sup>44</sup> En s'inspirant de la stratégie développée par Appella *et al.*<sup>45</sup>, le composé modèle (DANS-1-OH) est greffé sur le substrat en utilisant des conditions relativement douces, c'est à dire catalysée par du cuivre à température ambiante (Schéma IV-10). Pour éviter toute réaction d'hydrolyse partielle des isocyanates, la réaction est effectuée dans du DMF anhydre.



**Schéma IV-10 :** Greffage du composé modèle DANS-1-OH sur les parois du circuit microfluidique.

Il faut également signaler que notre circuit microfluidique est obtenu en collant le dispositif PDMS sur un substrat de verre par traitement au plasma oxygène. Etant donné que

le verre est constitué aussi de groupements siloxane, la possibilité de fonctionnaliser la sonde sur celui-ci n'est pas à exclure.



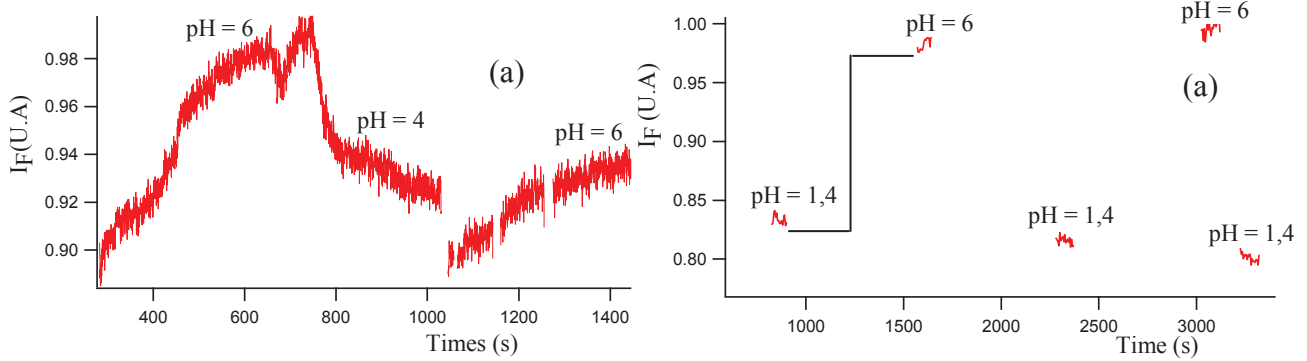
**Figure IV-18 :** Etudes du taux de greffage du DANS-1-OH sur le substrat de Verre et de PDMS dans le circuit microfluidique.

Pour avoir une idée sur l'efficacité du greffage sur les deux substrats, nous avons effectué la fonctionnalisation du composé modèle DANS-1-OH sur les parois du circuit microfluidique. Les deux compartiments sont ensuite séparés en décollant le circuit. L'analyse des spectres de fluorescence correspondants montre que le composé modèle DANS-1-OH s'est greffé sur les deux substrats (verre et PDMS), mais le greffage est légèrement plus important sur la partie verre du circuit (Figure IV-18). De ce fait, calculer le taux de greffage dans le circuit microfluidique nous paraît difficile. La forme du circuit utilisé, ainsi que la fonctionnalisation sur les deux substrats ne nous permettent pas de déterminer le nombre de groupements dans les amides greffés sur le circuit microfluidique.

#### IV.1.b. Etudes spectroscopiques en circuit microfluidique

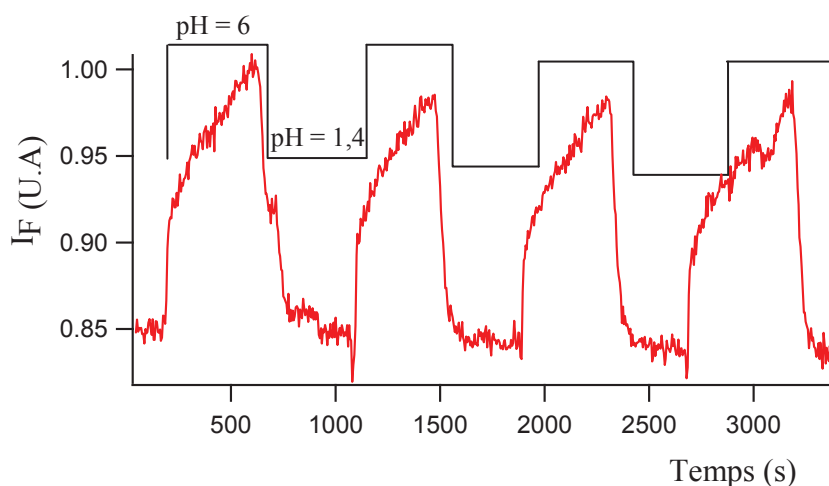
Notre circuit microfluidique ainsi fonctionnalisé avec le composé modèle DANS-1-OH est incorporé dans le compartiment cellule du spectrofluorimètre *Fluorolog*. Ce dispositif permet de transposer les conditions de détection en circuit microfluidique à la spectroscopie par fluorescence. La source lumineuse diode lumineuse (LED) est remplacée par une lampe deutérium. Comme nous l'avons observé précédemment en cuve (paragraphe III.1.b), le but est d'avoir une sensibilité de la surface fonctionnalisée en fonction du pH du milieu. Pour cela, une inhibition de la fluorescence devrait être observée en faisant passer une solution acide dans le circuit et une exaltation de celle-ci en milieu basique. En faisant passer une solution d'acide à  $\text{pH} = 1,4$  à un débit de  $0,25 \text{ mL/h}$  dans le circuit microfluidique, on observe un « quenching » de la fluorescence. Cependant, aucune exaltation de la fluorescence n'est obtenue en faisant circuler une solution à  $\text{pH} = 6$ . Ce phénomène est vraisemblablement dû à une photo-dégradation du fluorophore greffé sur les parois du circuit, ce qui constitue une limite de notre approche. En diminuant la puissance de la source excitatrice par réduction de la taille des fentes d'excitation jusqu'à  $3 \text{ nm}$  et en augmentant celles d'émission jusqu'à  $10$

nm, une réversibilité du système est obtenue en irradiant le circuit de manière continue. On observe toujours une dégradation partielle du produit qui se manifeste par une diminution de l'intensité de fluorescence entre deux mesures à pH identique (voir Figure IV-19-a). Cependant, en enregistrant l'intensité de la fluorescence en fonction du pH, par irradiation discontinue du circuit microfluidique, la réversibilité du système est obtenue et une dégradation quasi nulle du fluorophore est observé (Figure IV-19-b).



**Figure IV-19 :** Influence de la taille des fentes d'excitation, mode d'excitation continue (figure a), mode « shutter » (figure b) sur la fluorescence du DANS-1-OH,  $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$ .

En incorporant un filtre atténuateur dans le dispositif, la réversibilité du système a pu être obtenue par irradiation continue du circuit. Une meilleure reproductibilité de la variation de l'intensité en fonction du pH est observée en utilisant un filtre de  $DO = 1$  (Figure IV-20). On observe une exaltation de la fluorescence à  $\text{pH} = 6$  suivie d'une extinction à  $\text{pH} = 1,4$ . La réversibilité est obtenue jusqu'à une heure d'excitation continue à travers le circuit microfluidique. Dans le cas de la détection du plomb par le CalixDANS-3-OH, les paramètres utilisés seront les suivants : fentes d'excitation 3 nm, fente d'émission 10 nm, avec un filtre de  $DO = 1$  placé sur le faisceau d'excitation.

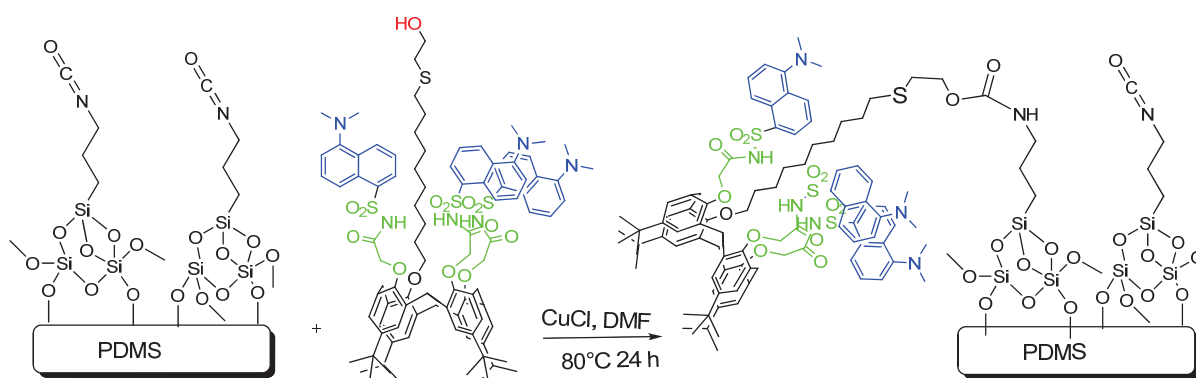


**Figure IV-20 :** Influence du pH sur la fluorescence du composé *DANS-1-OH* greffé sur les parois du circuit microfluidique, ( $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 478 \text{ nm}$ ), fentes ( $exc = 3 \text{ nm}$ ,  $em = 10 \text{ nm}$ ) et filtre  $DO = 1$ .

## IV.2. Le CalixDANS-3-OH en circuit microfluidique

### IV.2.a. Greffage du CalixDANS-3-OH sur les parois du circuit microfluidique

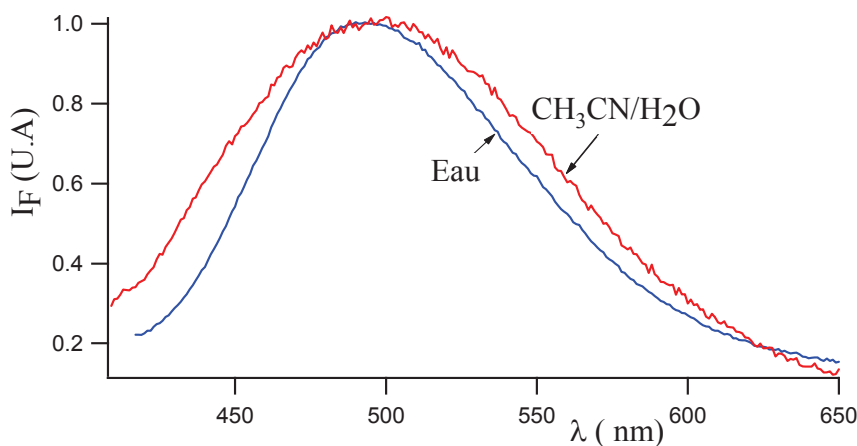
Le CalixDANS-3-OH est fonctionnalisé sur les parois du circuit microfluidique selon les conditions utilisées pour la fonctionnalisation du composé modèle *DANS-1-OH* (Schéma IV-11). Cependant, on remarque une meilleure fonctionnalisation en chauffant le système à  $80^\circ\text{C}$ . Le catalyseur utilisé ( $\text{CuCl}$ ) peut être complexé par les groupements sulfonamides du calixarène, ce qui diminue la sensibilité de notre système de détection. Pour s'affranchir de toute interférence, le circuit est rincé plusieurs fois avec le solvant utilisé (DMF), avec une solution acide à  $\text{pH} = 2$  pour décomplexer tous cations interférents, puis avec de l'eau Millipore. Le circuit ainsi obtenu est prêt à être utilisé pour la complexation du plomb.



**Schéma IV-11 :** Greffage du ligand CalixDANS-3-OH sur les parois du circuit microfluidique.

*IV.2.b. Complexation du plomb en circuit microfluidique*

Dans cas de la complexation du plomb par le CalixDANS-3-OH, comme dans le cas du composé modèle, le circuit est maintenu fixe dans le spectrofluorimètre *Fluorolog* pendant toute la durée des mesures pour éviter toute variation de l'intensité de fluorescence en fonction de l'orientation. Afin de collecter le maximum de fluorescence, nous avons travaillé en mode «front face», c'est-à-dire que le circuit est orienté à un angle de  $90^\circ$  par rapport au faisceau d'excitation, la fluorescence est recueillie selon un axe faisant  $22,5^\circ$  par rapport au faisceau d'excitation. Comme nous venons de le voir lors du dosage du plomb en solution, le CalixDANS-3-OH est plus sensible au plomb à  $\text{pH} = 3$ , donc ce  $\text{pH}$  est utilisé pour la détection du plomb en circuit microfluidique. L'avantage de greffer le ligand sur les parois du circuit microfluidique est que le plomb peut être dosé en solution aqueuse. L'étude de l'influence du solvant sur la position du spectre d'émission montre une faible variation de 4 nm vers le bleu en faisant circuler un mélange  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40 puis de l'eau à  $\text{pH} = 3$  (Figure IV-21). Cependant, en comparant les spectres d'émission en circuit avec ceux en cuve dans le même mélange de solvants  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40, on observe un large déplacement hypsochrome de 66 nm. Cette variation observée pourrait s'expliquer par l'environnement différent du fluorophore à la surface du substrat.



**Figure IV-21** : Influence du solvant sur le déplacement du spectre en circuit microfluidique à  $\text{pH} = 3$ .

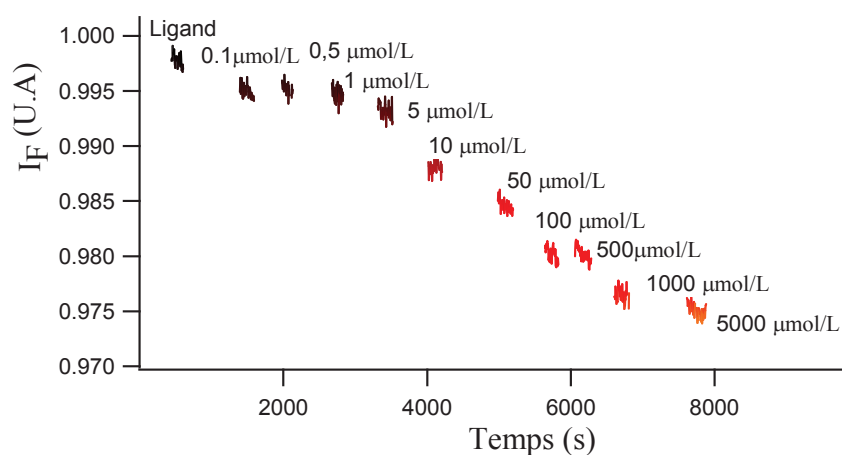
Le tableau ci-dessous présente les maxima des spectres de fluorescence du CalixDANS-3-OH en cuve et greffé sur les parois du circuit microfluidique en fonction du solvant.



|                                      | $\lambda_{\max}$ em dans CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O<br>60:40 | $\lambda_{\max}$ em dans H <sub>2</sub> O |
|--------------------------------------|---|---|
| CalixDANS-3-OH<br>en cuve            | 572 nm  | -   |
| CalixDANS-3-OH<br>greffé sur circuit | 496 nm  | 492 nm                                    |

**Tableau IV-3 :** Position des maxima du spectre d'émission du CalixDANS-3-OH en cuve et en circuit microfluidique en fonction du solvant utilisé.

Pour doser le plomb à l'aide du CalixDANS-3-OH fonctionnalisé sur les parois du circuit microfluidique, nous avons fait l'hypothèse d'un équilibre du complexe formé entre le métal et le ligand. Le dosage du plomb est effectué après avoir conditionné le circuit; ceci est effectué en faisant circuler une solution acide à pH = 3 jusqu'à ce qu'aucune variation de la fluorescence ne soit observée. En faisant circuler une solution de plomb à une concentration fixe à un débit de 3 mL/h, l'intensité de fluorescence est enregistrée ponctuellement. La Figure IV-22 décrit l'évolution de la fluorescence dans le circuit en fonction de la concentration de plomb introduite. Pour une concentration de plomb donnée, l'intensité de fluorescence est enregistrée jusqu'à ce qu'aucune variation ne soit observée.



**Figure IV-22 :** Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH fonctionnalisé sur les parois du circuit microfluidique PDMS-Verre à pH = 3.

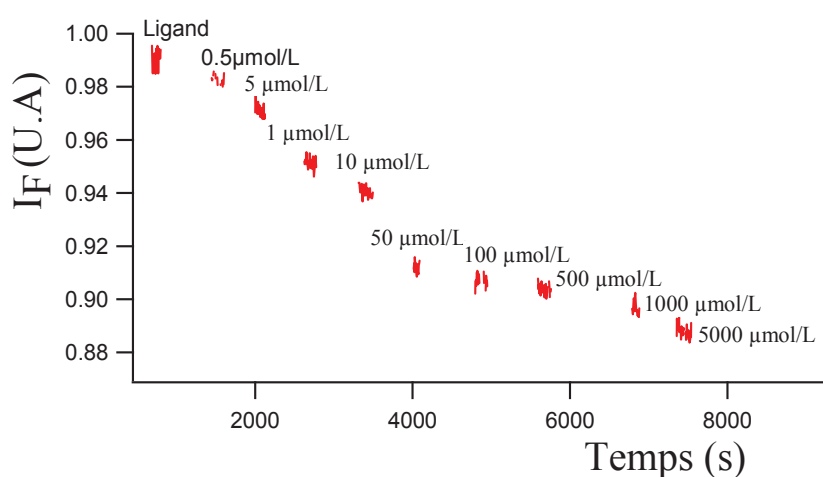
Comme on peut le voir, d'une manière générale, en présence d'une quantité croissante de thiocyanate de plomb on observe un « quenching » de l'intensité de fluorescence. Contre toute attente, en injectant dans le circuit une solution de thiocyanate de plomb allant jusqu'à 5 mmol/L on n'observe que 3 % de variation de l'intensité de fluorescence. Quelque soit le taux de greffage de la sonde sur les parois du circuit, cette valeur nous paraît très faible pour un ligand qui s'est révélé sensible au plomb lorsque le dosage est effectué en cuve. Une cause possible de ce manque de sensibilité pourrait être une adsorption non sélective des ions Pb<sup>2+</sup> sur le substrat de verre, ces ions s'accumulant au fur et à mesure du dosage.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé un nouveau circuit appelé PDMS-PDMS, en déposant un film de PDMS sur le substrat de verre. Le canal microfluidique a alors une surface entièrement recouverte de PDMS.

Nous avons étudié la complexation du plomb dans le circuit PDMS-PDMS en adoptant la stratégie développée précédemment (PDMS-Verre). En présence d'une quantité croissante de plomb, on observe un « quenching » de la fluorescence (Figure IV-23). Deux régimes attirent principalement notre attention sur la cinétique de complexation du plomb :

- Entre 0,1 et 50  $\mu\text{mol/L}$  d'une solution de thiocyanate de plomb, on observe un « quenching » en continu de la fluorescence, on n'observe pas de plateau pour une concentration de plomb donnée. Il n'y a donc pas d'équilibre entre le complexe formé et le milieu. Pour une solution de thiocyanate de plomb à 50  $\mu\text{M}$ , une inhibition de la fluorescence de 10 % est obtenue alors que celle-ci est seulement de 1,5 % dans le circuit PDMS-Verre.

- A partir de 100  $\mu\text{mol/L}$ , un plateau caractéristique de l'équilibre entre le complexe et la solution qui circule dans le canal commence à se former. En augmentant au fur et à mesure la concentration en plomb dans le circuit, on observe un « quenching » de la fluorescence suivi d'un équilibre jusqu'à saturation de tous les sites de complexation du plomb à partir d'une concentration de 5 mmol/L. La variation de l'intensité de fluorescence en fin de dosage est de 12 % nettement supérieure à celle obtenue dans le circuit PDMS-Verre (3 %, Figure IV-22).

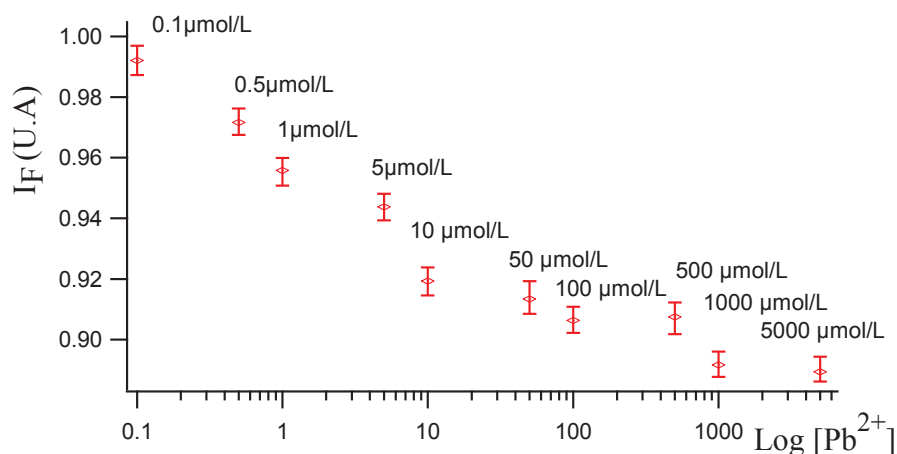


**Figure IV-23 :** Dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH fonctionnalisé sur les parois du circuit microfluidique PDMS-PDMS à pH = 3.

Malgré une nette augmentation de la sensibilité de la sonde, nous n'avons pas atteint les 23 % d'extinction de la fluorescence observés lors du dosage en cuve. Cette différence ne serait pas due à la réduction des degrés liberté de la molécule greffée sur les parois du circuit, car le complexe obtenu en cuve est de stœchiométrie ML. La formation de ce dernier est aussi

favorisée sur le ligand greffé à la surface du circuit microfluidique. Par contre, la formation de complexes de stœchiométrie  $M_2L$  pourrait être empêchée.

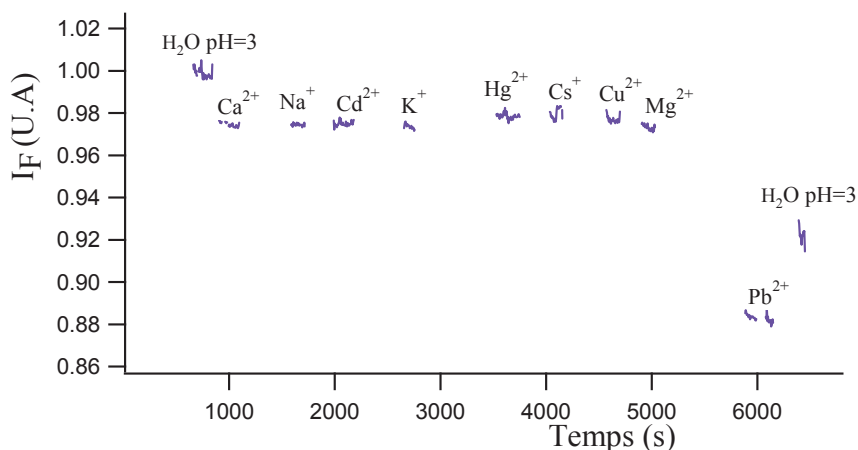
L'intensité de fluorescence varie linéairement en fonction du logarithme de la concentration de métal (Figure IV-24). Une limite de détection de l'ordre de  $42 \mu\text{g/L}$  ( $0,2 \mu\text{mol/L}$ ) est obtenue dans le dispositif microfluidique PDMS-PDMS.



**Figure IV-24 :** Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de plomb injectée dans le circuit microfluidique PDMS-PDMS à  $\text{pH} = 3$ .

#### IV.2.c. Les cations interférents en circuit microfluidique

Afin d'évaluer la sélectivité effective du plomb, l'interférence des cations  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  pour une concentration de  $1 \mu\text{M}$  à  $\text{pH} = 3$  a été étudiée. Comme dans le cas du dosage du plomb dans le circuit microfluidique, pour chaque cation interférent, l'intensité de fluorescence est enregistrée jusqu'à ce qu'aucune variation significative ne soit observée. La décomplexation est effectuée en faisant passer dans le circuit une solution acide à  $\text{pH} = 3$ . La Figure IV-25 ci-dessous présente la variation de l'intensité de fluorescence des cations interférents étudiés. Comme dans le cas de l'étude en solution, on n'observe aucune interférence significative des différents cations testés. L'ajout d'une solution de thiocyanate de plomb entraîne une inhibition de l'intensité de fluorescence et la réversibilité du système est obtenue par décomplexation en milieu aqueux à  $\text{pH} = 3$ . Nous n'avons pas pu étudier un grand nombre de cations interférents à cause d'une faible dégradation du ligand. Une étude réalisée pour une concentration de cation de l'ordre de  $1 \text{ mM}$  montre l'interférence des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ .



**Figure IV-25 :** Variation de l'intensité de fluorescence en présence de cations compétitifs à une concentration de  $10^{-6}$  M et  $Pb^{2+}$  à  $C = 10^{-4}$  M dans l'eau à pH = 3.

## Conclusion

Au cours de cette partie principalement consacrée à la chimie de surface, nous avons réussi à synthétiser une nouvelle sonde spécifique pour la détection du plomb (CalixDANS-3-OH) pouvant être greffée à la surface du canal microfluidique. Afin d'optimiser les conditions de détection des ions  $Pb^{2+}$  à partir de du CalixDANS-3-OH greffé en surface, nous avons synthétisé le composé modèle DANS-1-OH.

Les études de dosage du plomb par le CalixDANS-3-OH ont d'abord été effectuées en cuve. Celles-ci montrent une meilleure sensibilité de la sonde au plomb si le dosage est effectué à pH = 3 plutôt qu'à pH = 5.2. Une limite de détection de l'ordre de 10  $\mu$ g/L est obtenue. Cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le CalixDANS-4 (4,2  $\mu$ g/L). Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par la stabilité du complexe formé avec les ions  $Pb^{2+}$  : la constante obtenue pour le CalixDANS-3-OH est de  $\text{Log } \beta_{1:1} = 4,74$  et celle du CalixDANS-4 est de  $\text{Log } \beta_{1:1} = 6,82$ .

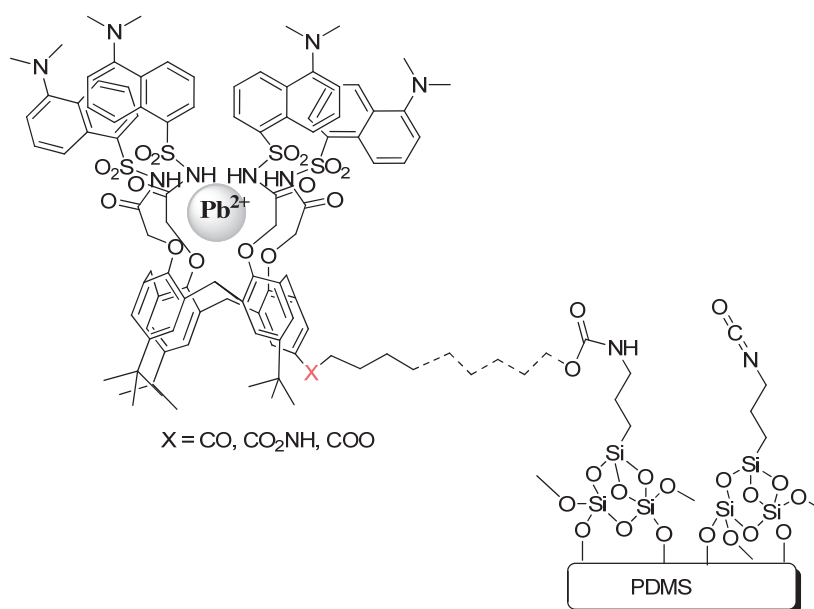
A partir du composé modèle DANS-1-OH, nous avons fonctionnalisé la surface du PDMS par voie chimique. En adaptant le circuit microfluidique dans un spectrofluorimètre, nous avons pu enregistrer la variation de l'intensité de fluorescence du DANS-1-OH greffé en fonction du pH du milieu. Après optimisation des conditions de détection, une sensibilité réversible en fonction du pH est obtenue.

Le ligand spécifique CalixDANS-3-OH a été greffé sur la surface d'un circuit microfluidique constitué de PDMS. En faisant circuler des solutions d'ions  $Pb^{2+}$  à concentration croissante un « quenching » de l'intensité de fluorescence est observé. Cette variation est plus importante sur le circuit PDMS-PDMS que sur le circuit PDMS-Verre, ce qui laisse supposer une adsorption du plomb sur le substrat de verre. La limite de détection obtenue à partir du circuit microfluidique PDMS-PDMS est de l'ordre de 42  $\mu$ g/L. Aucune

interférence significative des cations testés n'est observée sur le CalixDANS-3-OH greffé sur les parois du circuit microfluidique.

Ce dispositif de dosage du plomb est original dans la mesure où la sonde a été greffée sur les parois du circuit microfluidique, ce qui permet un usage répétitif du même circuit. A notre connaissance, il n'a pas été encore démontré la faisabilité de détection des ions  $Pb^{2+}$  par microfluidique à partir d'une sonde greffée dans le canal du circuit. Toutefois, la sensibilité est encore décevante par rapport au dispositif équivalent utilisant la sonde CalixDANS-4 en solution.<sup>22</sup>

Pour poursuivre cette stratégie de détection des métaux lourds, la synthèse d'un ligand plus photosensible sera nécessaire. Afin d'augmenter la sensibilité de notre nouveaux système de détection des ions  $Pb^{2+}$ . On pourrait envisager de greffer un groupement fonctionnel sur le CalixDANS-4. Une structure possible est présentée sur le Schéma IV-12 ci-dessous.



**Schéma IV-12 :** Nouvelle stratégie de greffage du ligand spécifique de plomb sur canal du circuit microfluidique.

Dans le but d'avoir un système de détection simultanée de plusieurs métaux lourds, on pourrait envisager de greffer sur surface du PDMS plusieurs ligands spécifiques qui sont excitables à des longueurs d'ondes différentes.

## Références Bibliographiques

- 1 A.J. Parola, J.C. Lima, F. Pina, J. Pina, J.S. Melo, C. Soriano, E. García-España, R. Aucejo, J. Alarcón "Synthesis and photophysical properties of dansyl-based polyamine ligands and their Zn(II) complexes." *Inorg. Chim. Acta* **2007** (360), 1200-1208.
- 2 H. Warmke, W. Wiczak, T. Ossowski "Interactions of metal ions with monoaza crown ethers A15C5 and A18C6 carrying dansyl fluorophore as pendant in acetonitrile solution." *Talanta* **2000** (52), 449-456.
- 3 Y. Higuchi, M. Narita, T. Niimi, N. Ogawa, F. Hamada, H. Kumagai, N. Iki, S. Miyano, C. Kabuto "Fluorescent chemo-sensor for metal cations based on thiacalix 4 arenes modified with dansyl moieties at the lower rim." *Tetrahedron* **2000** (56), 4659-4666.
- 4 C.N. Fleming, K.A. Maxwell, J.M. DeSimone, T.J. Meyer, J.M. Papanikolas "Ultrafast Excited-State Energy Migration Dynamics in an Efficient Light-Harvesting Antenna Polymer Based on Ru(II) and Os(II) Polypyridyl Complexes." *J. Am. Chem. Soc.* **2001** (123), 10336-10347.
- 5 V. Balzani, P. Ceroni, S. Gestermann, M. Gorka, C. Kauffmann, F. Vogtle "Effect of protons and metal ions on the fluorescence properties of a polylysine dendrimer containing twenty four dansyl units." *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.* **2000** (21), 3765-3771.
- 6 C.M. Cardona, J. Alvarez, A.E. Kaifer, T.D. McCarley, S. Pandey, G.A. Baker, N.J. Bonzagni, F.V. Bright "Dendrimers functionalized with a single fluorescent dansyl group attached "off center": Synthesis and photophysical studies." *J. Am. Chem. Soc.* **2000** (122), 6139-6144.
- 7 M. Montalti, L. Prodi, N. Zacheroni, A. Zettoni, P. Reschiglian, G. Falini "Energy transfer in fluorescent silica nanoparticles." *Langmuir* **2004** (20), 2989-2991.
- 8 S.K. Pal, A.H. Zewail "Dynamics of Water in Biological Recognition." *Chem. Rev.* **2004** (104), 2099-2124.
- 9 C.E. Lyon, E.S. Suh, C.M. Dobson, P.J. Hore "Probing the Exposure of Tyrosine and Tryptophan Residues in Partially Folded Proteins and Folding Intermediates by CIDNP Pulse-Labeling." *J. Am. Chem. Soc.* **2002** (124), 13018-13024.
- 10 J.A. Rupley, G. Cateri "Protein hydration and function", *Adv. Protein Chem.* **1991** (41), 37-172.
- 11 J.A. Kornblatt, M.J. Kornblatt "Water as it applies to the function of enzymes", *Int. Rev. Cytol.* **2002** (215), 49-73.
- 12 T. Koike, T. Watanabe, S. Aoki, E. Kimura, M. Shiro. "A Novel Biomimetic Zinc(II)-Fluorophore, Dansylamidoethyl-Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen)", *J. Am. Chem. Soc.* **1996** (118), 12696-12703.
- 13 H. Warmke, W. Wiczak, T. Ossowski "Interactions of metal ions with monoaza crown ethers A15C5 and A18C6 carrying dansyl fluorophore as pendant in acetonitrile solution." *Talanta* **2000** (52), 449-456.
- 14 A.M. Christoforou, P. A. Marzilli, L.G. Marzilli "The Neglected Pt-N(sulfonamido) Bond in Pt Chemistry. New Fluorophore-Containing Pt(II) Complexes Useful for Assessing Pt(II) Interactions with Biomolecules." *Inorg. Chem.* **2006** (45), 6771-6781.

- 15 G.G. Talanova, H.S. Hwang, V.S. Talanov, R.A. Bartsch. "Calix[4]arenes with hard donor groups as efficient soft cation extractants. Remarkable extraction selectivity of calix[4]arene *N*-(*X*)sulfonylcarboxamides for HgII", Chem. Commun **1998** 1329-1330.
- 16 G.G. Talanova, N.S.A. Elkarim, V.S. Talanov, R. Bartsch "A calixarene-based fluorogenic reagent for selective mercury(II) recognition", Analytical Chemistry **1999** (71), 3106-3109.
- 17 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "A highly sensitive and selective fluorescent molecular sensor for Pb(II) based on a calix 4 arene bearing four dansyl groups", Chem. Commun **2003** (8), 996-997.
- 18 C.T. Chen, W.P. Huang. "A Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Lead Ions", J. Am. Chem. Soc **2002** (124), 6246-6247.
- 19 E. Ranyuk, C.M. Douaihy, A. Bessmertnykh, F. Denat, A. Averin, I. Beletskaya, R. Guilard "Diaminoanthraquinone-Linked Polyazamacrocycles: Efficient and Simple Colorimetric Sensor for Lead Ion in Aqueous Solution", Org. Lett. **2009** (11), 987-990.
- 20 J.Y. Kwon, Y.J. Jang, Y.J. Lee, K.M. Kim, M.S. Seo, W. Nam, J. Yoon "A highly selective fluorescent chemosensor for Pb<sup>2+</sup>", J. Am. Chem. Soc. **2005** (127), 10107-10111.
- 21 T. Wu, L. Zhao, J.-P. Lefevre, I. Leray, J.A. Delaire. "Fluorimetric lead detection in a microfluidic device", Lab. Chip. **2009** (9), 2818-2823.
- 22 T. Wu, I. Leray, V. Génot, J.-P. Lefèvre, A. Korovitch, N.T. Ha-Duong, J.M. El Hage Chahine, J.A. Delaire "Thermodynamics and Kinetics of the Complexation Reaction of Lead by Calix-DANS4", Chem. Phys. Chem. **2010** (11), 3355-3362.
- 23 A.R. Abate, D. Lee, T. Do, C. Holtze, D.A. Weitz "Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods", Lab. Chip. **2008** (8), 516-518.
- 24 G. Sui, J. Wang, C.C. Lee, W. Lu, S.P. Lee, J.V. Leyton, A.M. Wu, H.R. Tseng "Solution-Phase Surface Modification in Intact Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels", Anal. Chem. **2006** (78), 5543-5551.
- 25 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "Photophysics of calixarenes bearing two or four dansyl fluorophores: charge, proton and energy transfers", Photochem. Photobiol. Sc **2004** (3), 374-380.
- 26 Q. He, E.W. Miller, A.P. Wong, C.J. Chang "A Selective Fluorescent Sensor for Detecting Lead in Living Cells", J. Am. Chem. Soc. **2006** (128), 9316-9317.
- 27 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "Lead and mercury sensing by calixarene-based fluoroionophores bearing two or four dansyl fluorophores." Chem.-A Eur. J. **2004** (10), 4480-4490.
- 28 .C.D. Whitehead, B.R. Travis, B. Borhan "The OsO<sub>4</sub>-mediated oxidative cleavage of olefins catalyzed by alternative osmium sources", Tetrahedron. **2006** (47), 3797-3800.
- 29 R.L. Blankespoor, T.D. Eric Hansen, J.M. Kallemeyn, A.M. Klooster, A. Jason, R.P.S. Mulder, D.A. Vander Griend "Photochemical Synthesis of Aldehydes in the Solid Phase", J. Org. Chem. **2002** (67), 2677-2681.
- 30 G. Elena, K. Haupt, K. Mosbach, W. Lindner "Analyte Templating: Enhancing the Enantioselectivity of Chiral Selectors upon Incorporation into Organic Polymer Environments", Anal. Chem. **2005** (77), 5009-5018.

- 31 R. Metivier, I. Leray, B. Valeur "A mesoporous silica functionalized by a covalently bound calixarene-based fluoroionophore for selective optical sensing of mercury(II) in water." J. Mater. Chem. **2005** (15), 2965-2973.
- 32 H.M. Dibama, I. Clarot, S. Fontanay, A.B. Salem, M. Mourer, C. Finance, R.E. Duval, J.B. Regnouf-de-Vains "Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct", Bioorg. Med. Chem. Lett. **2009** (19), 2679-2682.
- 33 X.S. Zeng, L.H. Weng, L.X. Chen, X.B. Leng, Z.Z. Zhang, X.W. He, X.W. Zeng, L.H. Weng "Improved silver ion-selective electrodes using novel 1,3-bis(2-benzothiazolyl)thioalkoxy-p-tert-butylcalix-4-arenes", Tet. Lett. **2000** (41), 4917-4921.
- 34 D. Zhang, X. Cao, D.W. Purkiss, R.A. Bartsch, D. Zhang, X. Cao "Di-ionizable p-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-3 ligands in cone and 1,2-alternate conformations: synthesis and metal ion extraction", Org. Biomol. Chem. **2007** (5), 1251-1259.
- 35 N. Sabbatini, A. Casnati, C. Fischer, R. Girardini, M. Guardigli, I. Manet, G. Sarti and R. Ungaro. "Luminescence of  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$  complexes of new macrobicyclic ligands derived from p-tert-butylcalix[4]arene", Inorg. Chim. Acta **1996** (252), 19-24.
- 36 Y.H. Li, L.M. Chan, L. Tyer, R.T. Moody, C.M. Himel, D.M. Hercules. "Study of Solvent Effectson the Fluorescence of 1-(Dimethylamino)-5-naphtalenesulfonic Acid and Related Compounds", J. Am. Chem. Soc. **1975** (97), 3118-3126.
- 37 F. Arnaud-Neu, G. Barrett, S.J. Harris, M. Owens, M.A. McKervey, M.J. Schwing-Weill, P. Schwinte "Cation Complexation by Chemically-Modified Calixarenes 5. Protonation Constants for Calixarene Carboxylates and Stability-Constants of Their Alkali and Alkaline-Earth Complexes", Inorg. Chem. **1993** (32), 2644-2650.
- 38 K.A. Connors. "Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability", **1987**, John Wiley & Sons: New York.
- 39 D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer, "Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip", Anal. Chem. **1992** (64), 1926-1932.
- 40 D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz "Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip", Science **1993** (261), 895-897.
- 41 J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss "Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds", Prog. Polym. Sci. **2007** (32), 698-725.
- 42 K. Kim, S. Park, S. Yang "The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer", BioChip J. **2010** (4), 148-154.
- 43 M.-E. Vlachopoulou, A. Tserepi, P. Pavli, P. Argitis, M. Sanopoulou, K. Misiakos "A low temperature surface modification assisted method for bonding plastic substrates", J. Micromech. Microeng **2009** (19), 015007
- 44 J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides "Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices", Anal. Chem. **2003** (75), 6544-6554.



- 45 E.A. Englund, H.N. Gopi, D.H. Appella *"An Efficient Synthesis of a Probe for Protein Function: 2,3-Diaminopropionic Acid with Orthogonal Protecting Groups"*, Org. Lett. **2003** (6), 213-215.

**Chapitre V : Ligands greffés sur  
un polymère bloc en vue d'une  
détection par microcavités laser**



# Chapitre V : Ligands greffés sur un polymère bloc en vue d'une détection par microcavités laser

## Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| Sommaire.....  | 139 |
| Introduction.....  | 141 |
| I. Le principe de la détection par microcavité laser.....                          | 143 |
| I.1. Les microcavités laser.....   | 143 |
| I.2. La détection par microcavités laser.....                                      | 145 |
| II. Synthèse des ligands pour la détection du mercure.....                         | 147 |
| II.1. Analyse rétrosynthétique.....  | 147 |
| II.2. Synthèse du ligand spécifique de $\text{Hg}^{2+}$ .....                      | 148 |
| II.2.a. Préparation du précurseur <b>102</b> .....                                 | 148 |
| II.2.b. Sulfuration de l'intermédiaire <b>102</b> .....                            | 149 |
| II.2.c. Fonctionnalisation du composé <b>101</b> .....                             | 150 |
| III. Synthèse du ligand pour la détection du plomb.....                            | 153 |
| III.1. Analyse rétrosynthétique.....   | 154 |
| III.2. Synthèse du ligand spécifique du $\text{Pb}^{2+}$ .....                     | 155 |
| III.2.a. Synthèse du précurseur <b>110</b> .....                                   | 155 |
| III.2.b. Synthèse du sulfonamine protégé <b>111</b> .....                          | 155 |
| III.2.c. Accès au ligand <b>109</b> .....  | 156 |
| IV. Greffage des ligands <b>100c</b> et <b>109</b> sur le copolymère PS-b-PAA..... | 157 |
| IV.1. Le choix du polymère.....  | 157 |
| IV.2. Quantification des amines greffées sur le PS-b-PAA.....                      | 159 |
| IV.2.a. Amines greffées dans la masse.....   | 159 |
| IV.2.b. Amines greffées à la surface du film PS-b-PAA.....                         | 163 |
| IV.3. Fonctionnalisation des ligands sur le PS-b-PAA.....                          | 164 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| IV.3.a. | Fonctionnalisation du ligand $\text{Hg}^{2+}$ dans la masse .....   | 164 |
| IV.3.b. | Fonctionnalisation du ligand spécifique de $\text{Pb}^{2+}$ dans la masse .....                               | 165 |
| V.      | Etude des propriétés optiques des films .....   | 166 |
| V.1.    | Les films de copolymère PS-b-PAA .....  | 166 |
| V.1.a.  | Le choix du colorant laser .....  | 166 |
| V.1.b.  | La stabilité des colorants dans la matrice PMMA .....   | 167 |
| V.1.c.  | Stabilité des colorants laser dans la matrice du PS-b-PAA .....   | 168 |
| V.1.d.  | Preuve de principe de sensibilité de la microcavité laser.....  | 169 |
| V.2.    | Les films de copolymères blocs pour la détection du mercure et du plomb .....                                 | 170 |
| V.2.a.  | Solubilité du copolymère bloc élaboré pour la détection du mercure.....                                       | 170 |
| V.2.b.  | Solubilité du copolymère pour la détection du plomb .....   | 172 |
| V.2.c.  | Ligand spécifique <b>100c</b> greffé à la surface du film de polymère.....                                    | 173 |
|         | Conclusion .....  | 175 |
| VI.     | Fonctionnalisation des ligands $\text{Hg}^{2+}$ et $\text{Pb}^{2+}$ à la surface des microcavités laser ..... | 176 |
| VI.1.   | Détection du mercure en surface par les groupements thiols.....   | 177 |
| VI.2.   | Fonctionnalisation de la surface du PMMA.....   | 178 |
| VI.3.   | Fonctionnalisation de la surface du PHEMA-b-PMMA .....  | 180 |
| VI.4.   | Fonctionnalisation des groupements thiols à la surface du PHEMA-b-PMMA .....                                  | 181 |
|         | Conclusion .....  | 184 |
| VII.    | Fabrication des microcavités par polymérisation à deux photons (2PP) .....                                    | 185 |
| VII.1.  | Microcavités réalisées à partir d'un acrylate.....  | 186 |
| VII.2.  | Microcavités réalisées à partir d'un ormosil .....  | 187 |
|         | Conclusion et perspectives .....  | 190 |
|         | Références bibliographiques.....  | 193 |

## Introduction

Ce projet de détection des métaux lourds par microcavités laser organiques est une collaboration avec nos collègues physiciens du laboratoire LPQM de l'ENS Cachan. L'utilisation de la lumière transmise par un faisceau nécessite des éléments optiques à savoir des lentilles, des prismes et des miroirs pour collecter le signal correspondant. La refocalisation de la lumière devient délicate pour des longs trajets ou pour des systèmes optiques compliqués. La technologie de l'optique guidée est une solution apportée par les physiciens pour le transport ou la transmission de la lumière donc de l'information à travers des conduits. L'utilisation des microrésonateurs (microcavités) est une technique qui consiste à contraindre la lumière à se propager dans des directions bien définies. La lumière est confinée dans un espace restreint par réflexion totale sur les interfaces avec les milieux environnants (substrat de verre, polymère organique). Le matériau de polymère est dopé avec un colorant laser organique qui possède un potentiel important en vue de la réalisation de sources laser compactes et intégrables. Lorsque le matériau dopé d'un colorant laser est excité par une source d'énergie externe, les molécules de colorant peuvent engendrer une onde lumineuse par émission stimulée. Cette lumière est distribuée dans la cavité résonante et elle s'amplifie au cours du trajet, éventuellement rallongé par un dispositif de contre réaction. Le colorant laser utilisé est une molécule fluorescence dont la structure électronique peut être présentée sous deux niveaux  $S_0$  et  $S_1$  dont chacun possède une sous structure vibrationnelle (Figure V-1). Donc, ils forment un système laser « à quatre niveaux » grâce au temps de relaxation suffisamment rapide entre les niveaux des bandes vibrationnelles. Les durées de vie des différents états électronique sont indiquées sur le diagramme de Jablonski de la Figure V-1 ci-dessous.

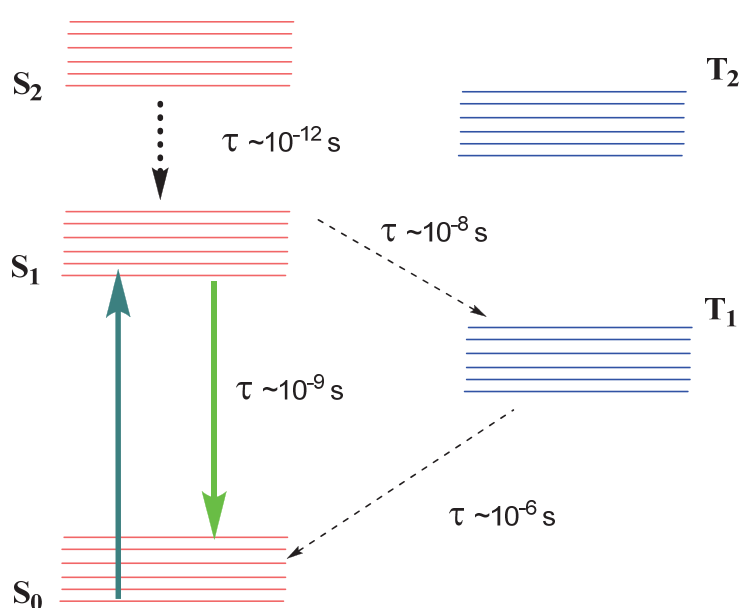
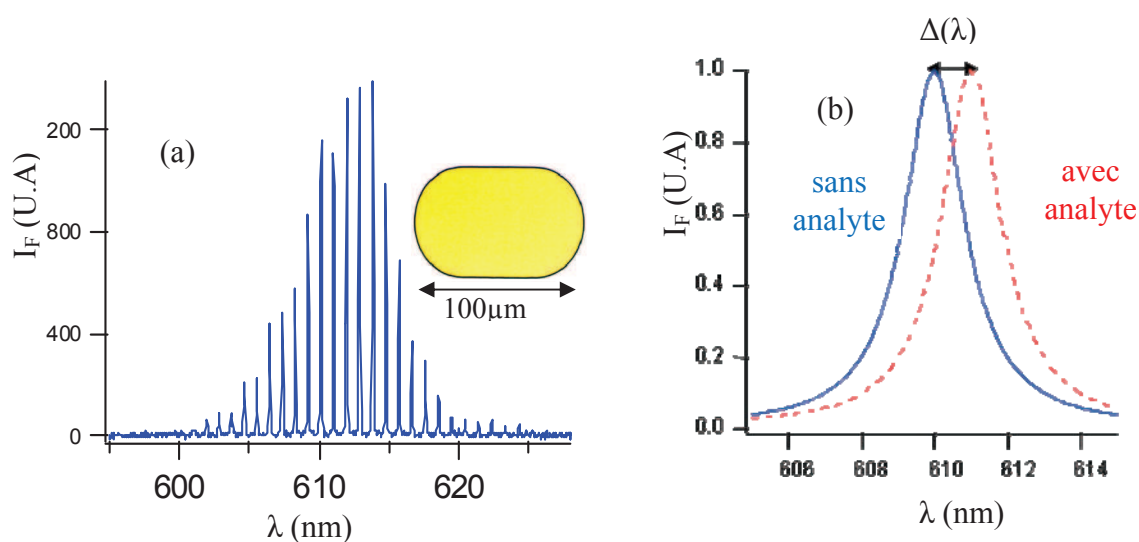


Figure V-1 : Diagramme de Jablonski de la molécule de DCM.

Le laboratoire LPQM travaille depuis un certain nombre d'années sur ces microsystèmes optiques basés sur des systèmes organiques.<sup>1,2</sup> Ces microrésonateurs sont fabriqués par lithographie (voir le principe sur la Figure V-3). Leur spectre d'émission spontanée (ASE) est constitué par des raies très fines bien structurées dont l'espacement et l'enveloppe dépendent à la fois de la forme et de la taille de la microcavité. La Figure V-2-a ci-dessous présente le spectre d'émission laser d'une microcavité organique en forme de stade dopé d'un colorant laser le DCM.

La position du spectre d'émission laser est très sensible à l'indice de réfraction du milieu environnant. Ce phénomène physique peut être mis à profit pour la détection de métaux après fixation d'un ligand spécifique sur la matrice de polymère constituant les microcavités organiques. On espère avoir une variation de la position du spectre d'émission en présence d'analyte dans la matrice du polymère (Figure V-2-b).



**Figure V-2 :** Spectre d'émission laser d'une microcavité laser (PMMA dopée avec 5b % de DCM) en forme de stade (figure a), schéma montrant le déplacement d'un pic en présence d'un analyte (figure b).

L'intégration de la microcavité laser organique en circuit microfluidique peut présenter de nombreuses applications dans le domaine de la chimie et de la biologie.<sup>3,4</sup> En incorporant la microcavité laser organique fonctionnalisée avec le ligand spécifique pour la détection des métaux lourds ( $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ) dans la matrice du polymère, il devrait être possible d'utiliser le décalage des bandes d'émission laser pour quantifier la présence des métaux lourds.

La première partie de ce travail consiste à synthétiser les ligands spécifiques pour la détection du plomb et du mercure. Ces ligands seront ensuite greffés sur le polymère choisi, le poly(styrene-b-acide acrylique), (PS-b-PAA). Après avoir étudié la stabilité de quelques colorants laser dans la matrice du polymère, les microcavités seront fabriquées. Pour finir, les microcavités laser seront incorporées dans le canal du circuit microfluidique dans le but d'en faire des sondes spécifiques pour la détection des métaux lourds cibles.

# I. Le principe de la détection par microcavités laser

## I.1. Les microcavités laser

D'une manière générale, on peut définir les microcavités laser comme des microrésonateurs. Celles-ci sont obtenues par gravure sur film de polymère déposé sur un substrat de silicium. Il existe deux grandes catégories de microcavités optiques. Les microcavités passives sont basées sur la modification des propriétés d'optique linéaire : dans ce cas, le matériel utilisé ne présente pas de propriétés d'optique non linéaire.<sup>5</sup> Les microcavités actives, quant à elles, sont constituées par des colorants laser<sup>6</sup> ou des semi-conducteurs inorganiques.<sup>7</sup>

La fabrication de microcavités actives à base de polymère organique présente l'avantage d'être plus facile que celle à base de semi-conducteurs inorganiques. La plupart des polymères utilisés ont un indice de réfraction inférieur à celui des semi-conducteurs ( $n \approx 1,5$  vs  $n \approx 3$ ). Les microcavités laser peuvent être fabriquées par ablation laser à partir d'un polymère,<sup>8</sup> par polymérisation à deux photons d'un monomère<sup>9</sup> ou par lithographie,<sup>2</sup> qui constitue la technique la plus utilisée. La fabrication des microcavités laser par lithographie est une technique relativement simple. La première étape de ce processus consiste à étaler un film de polymère dopé d'un colorant laser sur un substrat de silicium par « spin coating ». La couche polymère active ainsi obtenue est ensuite recouverte d'une résine positive photosensible (S1805), toujours par « spin-coating ». A l'aide d'un masque optique sur lequel sont dessinées les microcavités, on insole l'échantillon à la lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. Le temps d'exposition dépend de l'épaisseur du substrat. Le développement est effectué en plongeant le substrat insolé dans le développeur chimique (Microposit 351) pendant 1 mn puis celui-ci est rincé à l'eau déminéralisée. Les motifs imprimés dans la photorésine sont transférés dans l'épaisseur du film du polymère dopé avec le colorant laser par gravure ionique. Cette étape consiste à bombarder la surface de l'échantillon par les ions accélérés d'un plasma de sorte que l'impact des ions arrache les atomes de la surface de l'échantillon. La Figure V-3 présente les étapes de fabrication des microcavités organiques par lithographie et attaque au plasma oxygène.



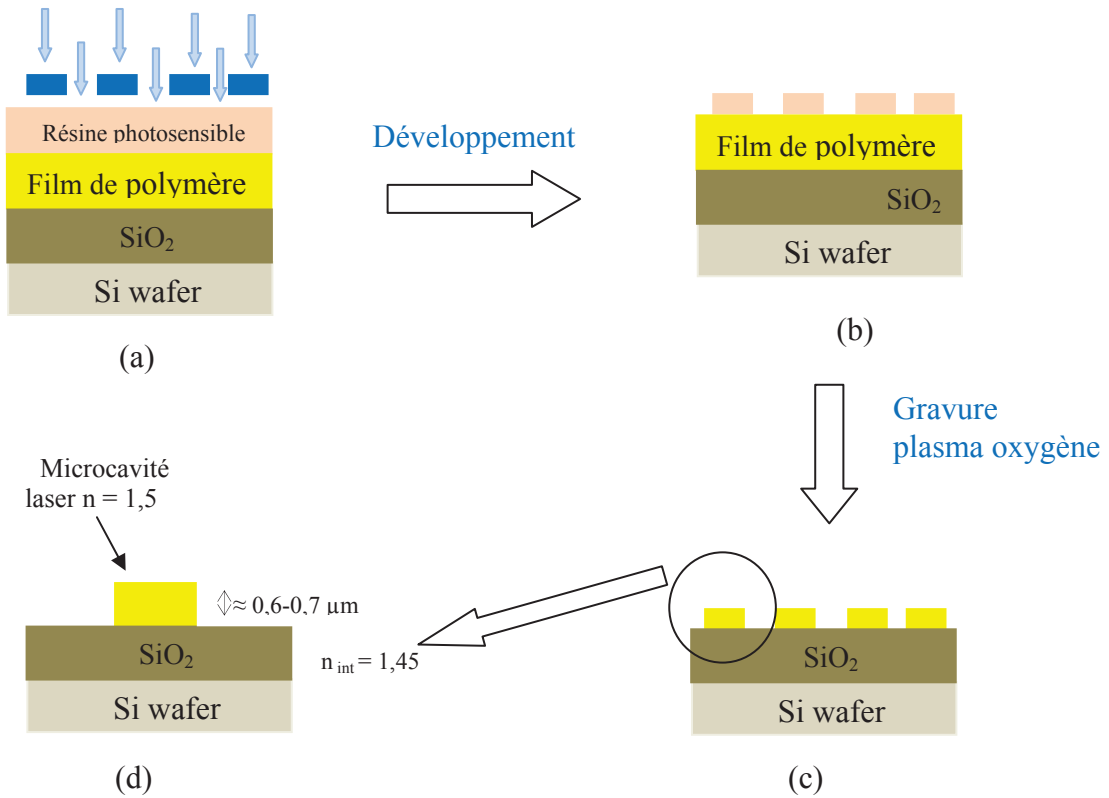


Figure V-3 : Principe de fabrication des microcavités laser par lithographie à partir d'un film de polymère organique.

La forme de la microcavité est en grande partie responsable de la répartition du champ magnétique à l'intérieur de la matrice du polymère. Suivant la nature du masque utilisé, plusieurs microcavités de géométrie variable (du type spirale, circulaire, polygonale, carré, etc...) peuvent être obtenues. La structure de la microcavité doit être parfaite ; la forme des contours, ainsi que les défauts sur la microcavité peuvent être visualisés à l'aide d'un microscope optique. Pour avoir des microcavités de bonne qualité optique, un défaut de contour de 10 nm peut être toléré. La Figure V-4 ci-dessous présente quelques exemples de microcavités organiques réalisées en PMMA dopé avec le colorant laser DCM.

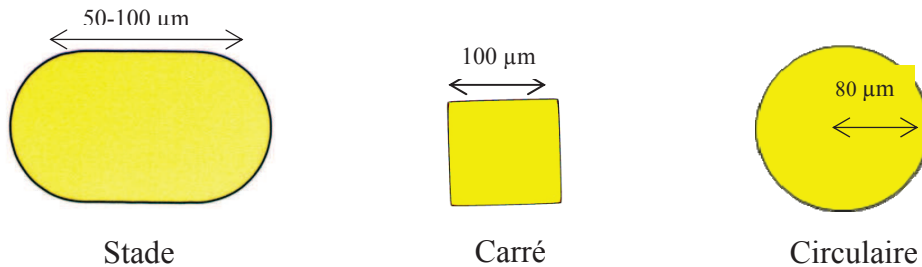


Figure V-4 : Images de quelques exemples de microcavités laser organiques dopées avec un colorant laser.

## I.2. La détection par microcavités laser

De nombreux systèmes optofluidiques basés sur les microcavités laser ont été décrits dans la littérature. Armani *et al.* ont développé un nouveau système de détection optique de D<sub>2</sub>O en milieu aqueux par microcavités laser.<sup>10</sup> Cette technique est basée sur la différence de l'absorption optique entre H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O. Par différence de résonance, ils ont réussi à détecter une très faible proportion de D<sub>2</sub>O présente dans l'eau allant jusqu'à 0,000001 %. La plupart des applications des systèmes optofluidiques sont orientées vers la biologie.<sup>11</sup> Cependant, ces systèmes peuvent être mis à profit pour la détection des métaux lourds et ce, grâce à la sensibilité de la microcavité laser aux variations de l'indice de réfraction du milieu environnant. Cette approche consiste à incorporer le ligand spécifique dans le milieu microcavité laser. A partir de la variation de la position du spectre d'émission laser, on peut déterminer la quantité d'analyte présente dans le milieu. Cette approche de détection par microcavité laser présente l'avantage d'améliorer le rapport signal/bruit en raison de l'absence de signal incident.

Notre objectif est de fabriquer des microcavités à partir d'un polymère organique dopé d'un colorant laser et fonctionnalisé avec un ligand spécifique pour la détection du plomb ou du mercure (Figure V-5-a). Les microcavités laser organiques sont ensuite incorporées dans le dispositif microfluidique de la Figure V-5-b. Celui-ci est fabriqué selon le protocole détaillé du paragraphe VII.2 p237 de la partie expérimentale. La fixation de métaux lourds dans le matériau va provoquer une augmentation de l'indice de réfraction du milieu. Le décalage en longueur d'onde ( $\Delta\lambda$ ) est inversement proportionnel à l'indice de réfraction  $n$  du milieu environnant la cavité. Cet indice dépend de la concentration d'espèces dans le milieu et donc il y a une relation entre ce décalage spectral et la concentration en métaux que l'on peut décrire par l'équation V-1 ci-dessous :

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda^2 N}{2\pi n L} \Delta\phi \quad \text{éq V-1}$$

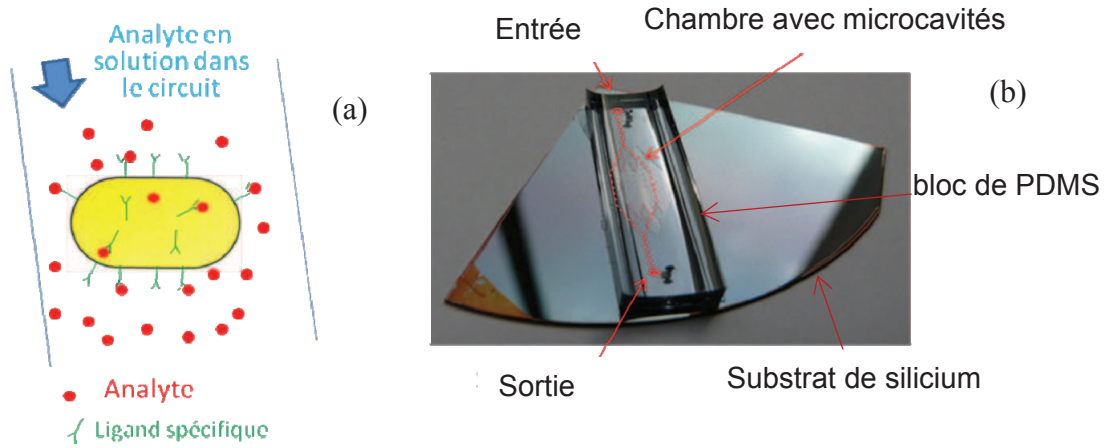
$\lambda$  est la longueur d'onde

$n$  est l'indice de réfraction du milieu environnant, dépendant de la concentration d'analyte

$L$  est le chemin optique du rayon dans la cavité

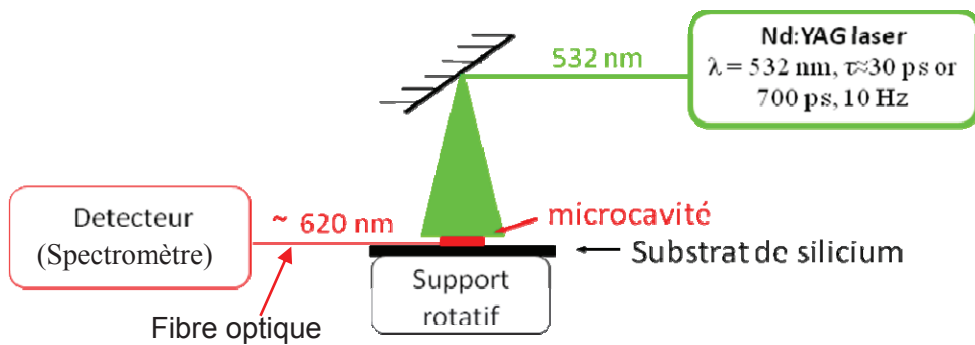
$\phi$  est le déphasage introduit au cours des réflexions du rayon lumineux

$N$  nombre de réflexions sur les parois de la microcavité



**Figure V-5 :** Microcavité laser organique fonctionnalisée avec un ligand spécifique (figure a), et dispositif microfluidique utilisé pour la détection des métaux lourds par microlaser (figure b).

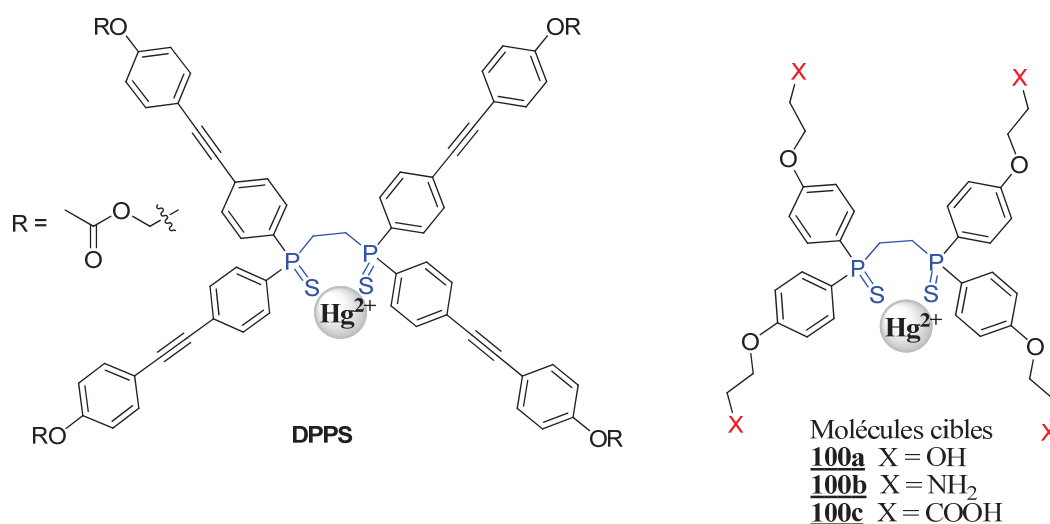
Le dispositif expérimental décrit sur la Figure V-6 ci-dessous présente le principe de détection des métaux lourds à partir de microcavités laser incorporées dans un circuit microfluidique. L'échantillon est placé sur un support rotatif et à l'aide d'un microscope, la microcavité ciblée est visualisée. Le pompage de l'échantillon est effectué à l'aide d'un laser doublé (532 nm) de type Nd : YAG avec des impulsions de 700 ps. En général le taux de répétition utilisé est de 10 Hz.<sup>12</sup> L'énergie de pompage est contrôlée à l'aide de polariseurs et d'une lame demi-onde. Une lentille de collimation de diamètre 25 mm placée à environ 15 cm de la microcavité laser collecte le signal émis. La focalisation est effectuée à l'aide d'une fibre optique connectée à un système de détection constitué par un spectromètre de résolution 0,1 nm opérant dans une gamme de 500 à 749 nm et une caméra CCD (1340 pixels).



**Figure V-6 :** Principe de la détection des métaux lourds par microcavités laser incorporées dans un circuit microfluidique.

## II. Synthèse des ligands pour la détection du mercure

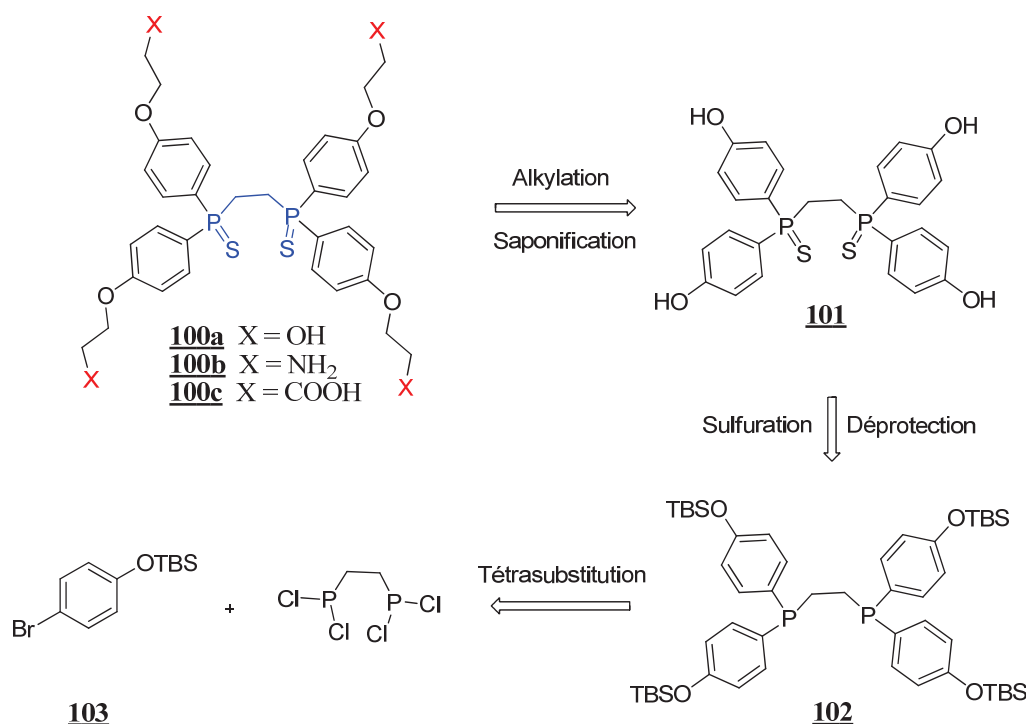
Du fait de l'affinité du mercure pour le soufre, les structures à base de sulfure de phosphine sont très étudiées pour la détection du mercure. Le composé fluorescent à base de sulfure de phosphine **DPPSc** (Schéma V-1) a été étudié au laboratoire pour la complexation du mercure.<sup>13</sup> Une limite de détection de 0,75 µg/L inférieure aux normes européennes sur la qualité de l'eau a été obtenue.<sup>14</sup> Une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents a aussi été observée. Afin de doser le mercure par microcavités laser, notre choix s'est porté sur le composé **100**. Notre molécule cible **100** possède la même entité complexante que le **DPPSc**, celle-ci est constituée par un groupement phosphinoéthane. Cependant, notre molécule cible n'est pas fluorescente et est constituée par des groupements fonctionnels libres (OH ou CO<sub>2</sub>H) qui peuvent être greffés sur une matrice de polymère.



*Schéma V-1 : Structures du composé DPPSc étudié pour la complexation du mercure et des molécules cibles **100**.*

### II.1. Analyse rétrosynthétique

La stratégie envisagée pour accéder aux composés **100** (a, b, c) est présentée sur le Schéma V-2. L'accès aux molécules cibles **100** pourra s'effectuer par alkylation de l'intermédiaire tétrasubstitué **101**, lui-même obtenu après sulfuration et déprotection du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBS) sur le composé **102**. Le dérivé **103** quant à lui peut être obtenu par une réaction de protection du 4-bromophénol par le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBSCl).



*Schéma V-2 : Analyse rétrosynthétique de la synthèse du ligand pour la détection du mercure par microcavités laser.*

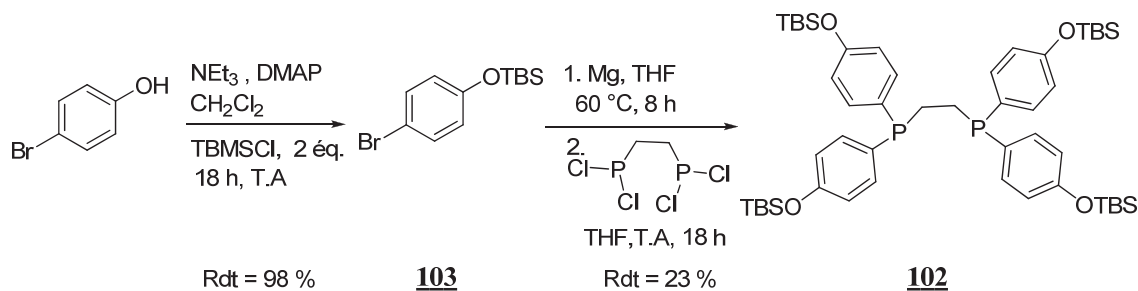
## II.2. Synthèse du ligand spécifique de Hg<sup>2+</sup>

### II.2.a. Préparation du précurseur **102**

La première étape de la synthèse commence par une réaction de protection du 4-bromophénol par le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBSCl) en présence de triéthylamine et du diméthyle aminopyridine (DMAP). Après 18 h de réaction à température ambiante, le composé **103** est isolé avec un rendement excellent de 98 % et une pureté suffisante pour passer à l'étape suivante.

Le composé **102** est obtenu par alkylation du bis(dichlorophosphino)éthane (Schéma V-3).<sup>13</sup> En effet, le magnésien du dérivé (4-bromophenoxy)*tert*-butyldiméthylsilane **103** est formé en présence de magnésium au reflux du THF, puis mis à réagir avec le bis(dichlorophosphino)éthane pour conduire à la bisphosphine tétrasubstituée intermédiaire **102** avec un rendement acceptable de 23 %.<sup>15</sup> Le rendement modeste de cette étape peut s'expliquer par la difficulté de substituer les groupements chlores par le dérivé phénol. Il faut également signaler que cette étape de la synthèse est particulièrement délicate. En effet, elle nécessite des conditions draconiennes, au risque d'hydrolyser la phosphine (1,2-bis(dichlorophosphino)éthane) ; il est donc nécessaire de s'assurer que le solvant ainsi que les réactifs de départ sont anhydres. Il est à noter que l'organomagnésien correspondant au composé

**103** se forme plus facilement en condition plus concentrée. De plus, au contact de l'air, le composé **102** peut très facilement s'oxyder pour donner l'oxyde de phosphine correspondant.

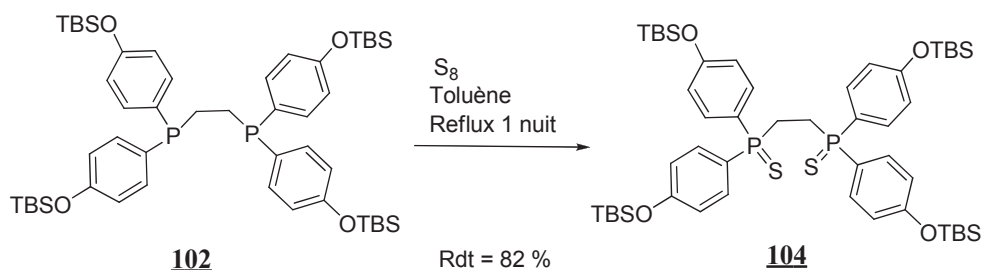


*Schéma V-3 : Protection du phénol et tetrasubstitution du bis(dichlorophosphino)éthane.*

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  montre que le produit obtenu est suffisamment pur pour passer à l'étape d'oxydation. Le composé **102** ainsi obtenu est donc mis très rapidement dans les conditions de sulfuration des phosphines.

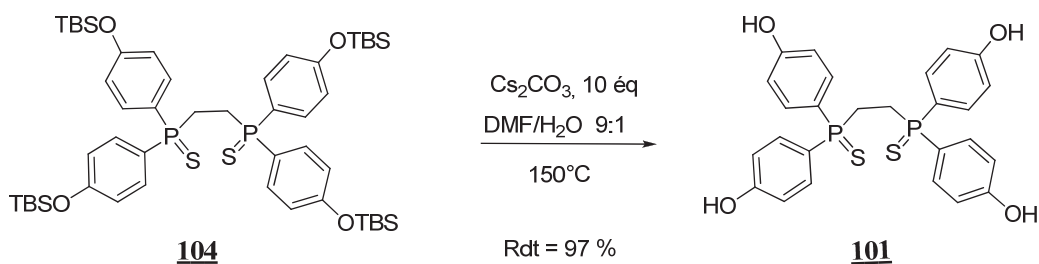
### II.2.b. Sulfuration de l'intermédiaire **102**

Le composé **102** est donc oxydé en présence de soufre élémentaire  $\text{S}_8$  au reflux du toluène pour conduire au sulfure de bisphosphine **104** (Schéma V-4). Il est nécessaire de s'assurer que l'analyse RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  du phosphore montre un seul type de phosphore à 41,96 ppm (le sous-produit correspond au produit d'oxydation à l'air). Le composé **104** est isolé avec un très bon rendement de 82 %.



*Schéma V-4 : Réaction d'oxydation du composé **102** par le soufre élémentaire.*

Les réactions de déprotection des dérivés silylés se font généralement à partir de composés à base de fluorures. Après plusieurs tentatives de déprotection sans succès utilisant différentes conditions décrites dans la littérature telles que TBAF<sup>16</sup> ou  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ <sup>17</sup>, nous avons envisagé de la réaliser dans des conditions basiques. En effet, en présence de carbonate de césium ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) à reflux d'un mélange DMF/eau, nous avons pu accéder au composé déprotégé **101** avec un excellent rendement de 97 % (Schéma V-5).<sup>18</sup>

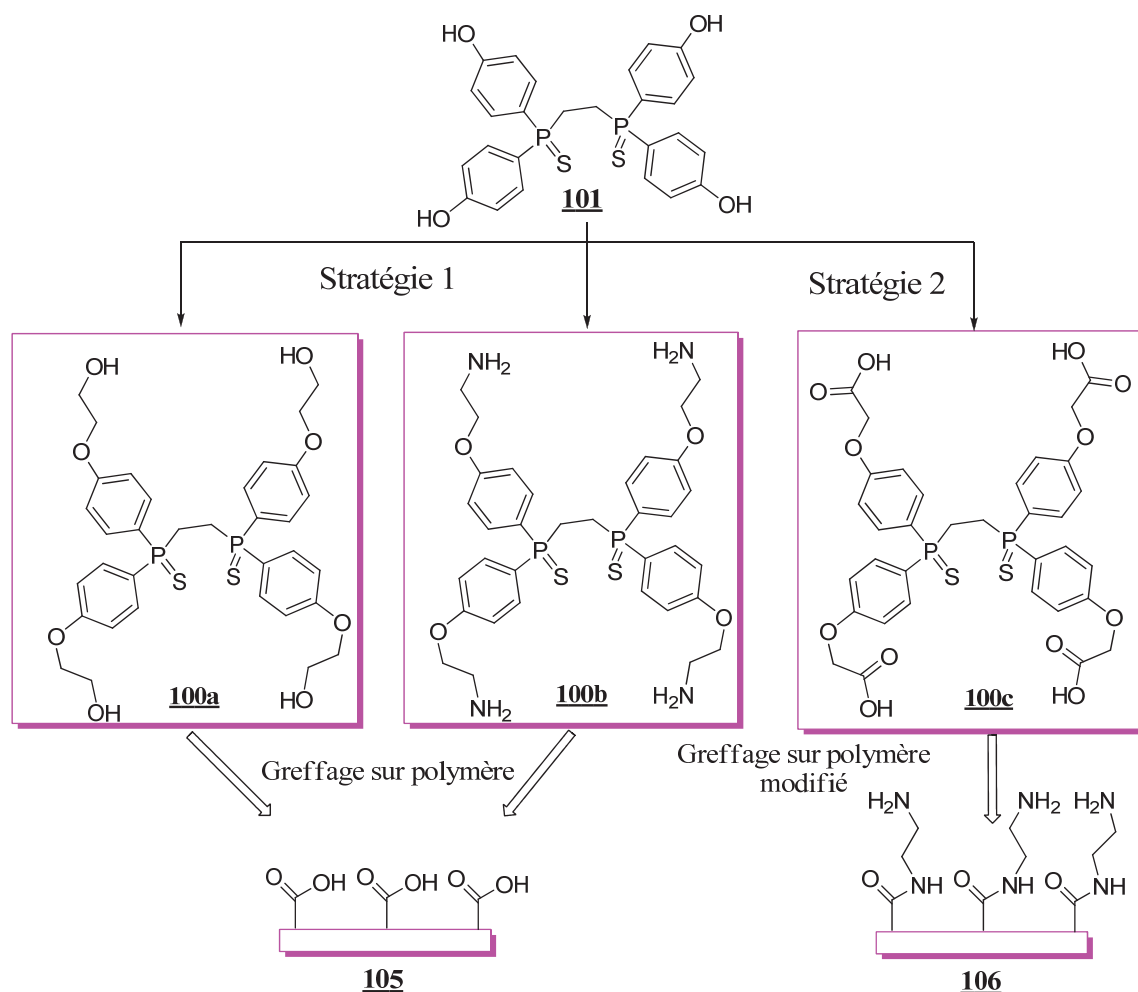


*Schéma V-5 : Déprotection des groupements phénols en milieu basique.*

L'étape finale de la synthèse du ligand spécifique pour la détection du mercure consiste à ramifier la molécule. Cette ramification permet de fixer le ligand sur le polymère mais aussi d'augmenter sa flexibilité.

### II.2.c. Fonctionnalisation du composé **101**

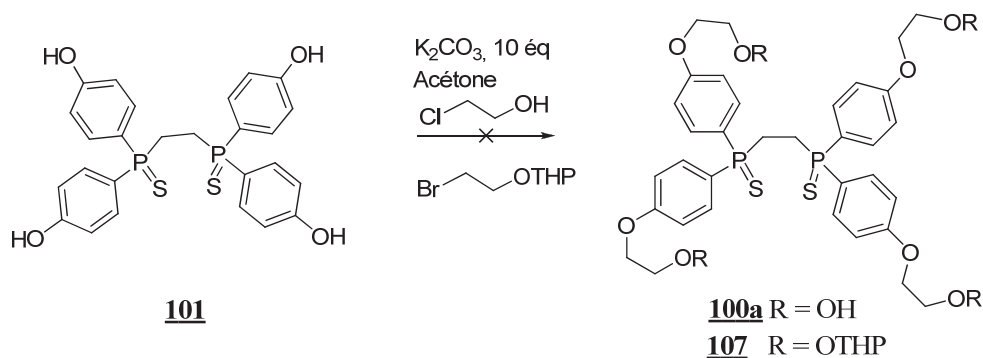
Pour greffer notre ligand sur le polymère, nous avons envisagé les stratégies décrites sur la Schéma V-6. Nous avons envisagé différents types d'espaceurs tels que les chaînons éthanol, éthylamine qui conduiraient respectivement aux composés **100a**, **100b** (stratégie 1). La deuxième stratégie consiste à ramifier le composé **101** par le bromoacétate d'éthyle (composé **100c**). Cette stratégie nécessite une modification préalable du polymère **105** pour former le composé **106**.



*Schéma V-6 : Stratégies de ramification du composé **101**.*

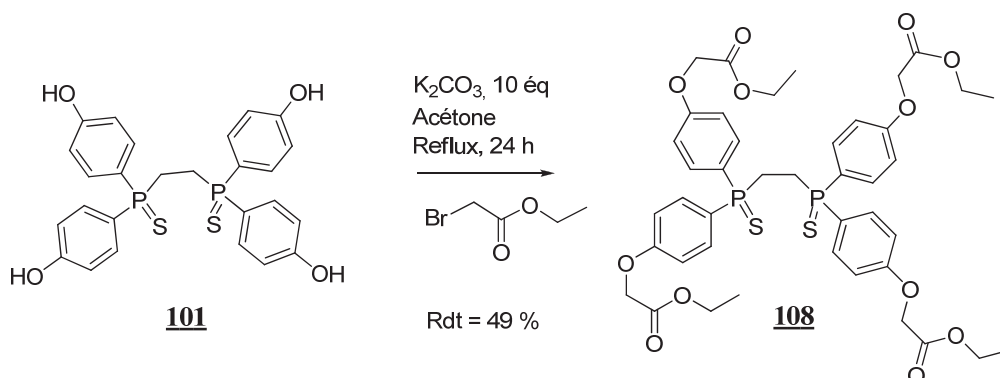
La fonctionnalisation du composé **101** par un groupement possédant une fonction alcool ou amine terminale nous permet de s'affranchir de la modification du copolymère bloc poly(styrene-b-acrylique acide) (stratégie 1). Des tentatives de substitution des groupements phénols du composé **101** en milieu basique en présence de  $K_2CO_3$  au reflux de l'acétone par le chloro-éthanol (dérivé **100a**), puis par le 2-(2-bromoethoxy)tetrahydro-2H-pyrane (dérivé **100b**) n'ont pas été concluantes (Figure V-7). L'analyse RMN  $^1H$  du milieu réactionnel ne montre aucune évolution de réaction. Dans le cas de la réaction de substitution des phénols avec le 2-(2-bromoethoxy)tetrahydro-2H-pyran, une déprotection du groupement protecteur tétrahydropyran a été observée.





*Schéma V-7 : Tentatives de substitution du composé **101** par le chloroéthanol et bromoéthanol protégé par le tétrahydropyrane.*

Devant les difficultés rencontrées lors de la substitution des groupements phénols du composé **101**, nous nous sommes orientés vers la stratégie 2 en synthétisant le composé **100c**. La réaction d'alkylation du composé **101** avec le bromoacétate d'éthyle en présence de carbonate de potassium nous a permis d'accéder à l'intermédiaire tétraalkylé **108** avec un rendement de 49 % (Schéma V-8).<sup>19</sup>



*Schéma V-8 : Alkylation du composé **101** par le bromoacétate d'éthyle.*

Le dérivé **100c** est obtenu par une réaction de saponification classique des fonctions esters de l'intermédiaire tétraalkylé **108** avec un rendement de 67 % (Schéma V-9). L'analyse RMN <sup>1</sup>H montre que le composé **100c** ainsi obtenu est suffisamment pur pour être greffé sur le copolymère bloc PS-b-PAA. Comme nous l'avons déjà signalé, pour fonctionnaliser le composé **100c** sur le polymère, une modification préalable de celui-ci est nécessaire (voir la stratégie 2).

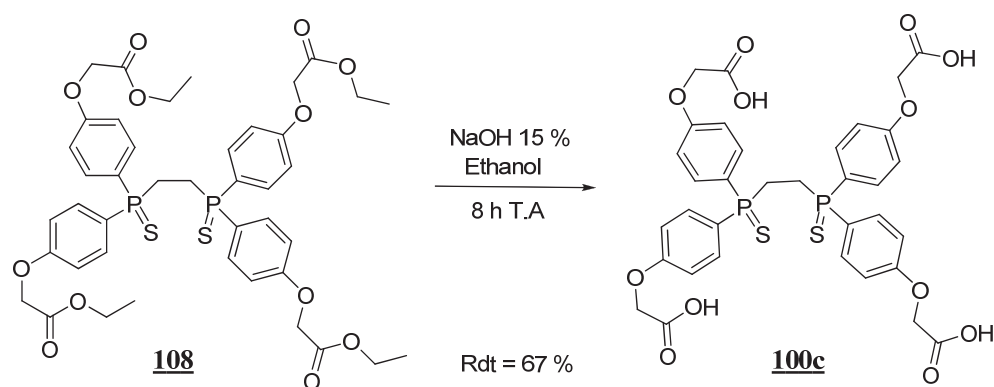
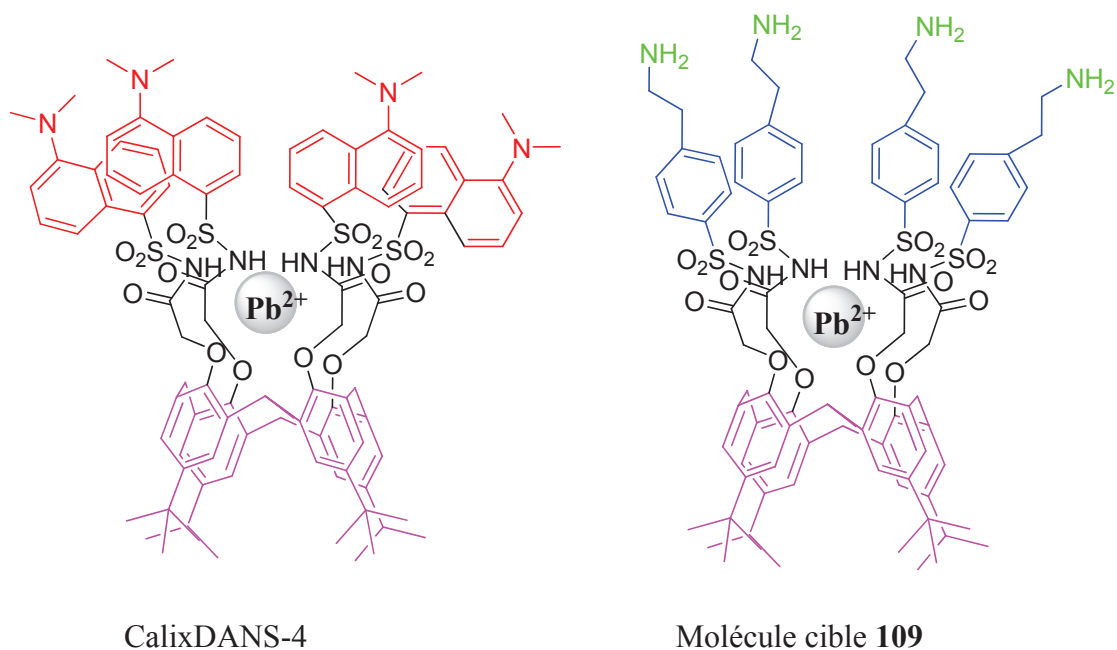


Schéma V-9 : Réaction de saponification du composé **108**.

### III. Synthèse du ligand pour la détection du plomb

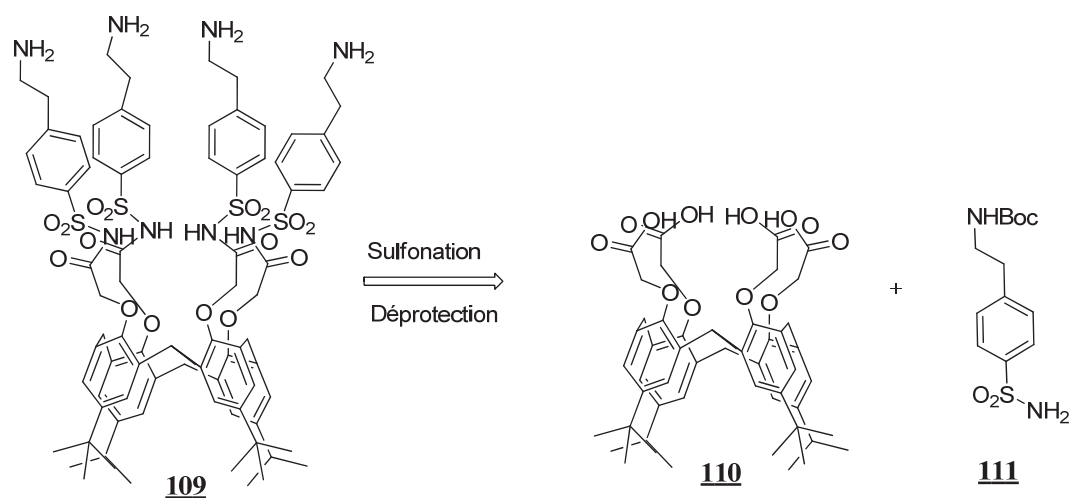
Les structures à base de calixarène sont très rigides, elles sont utilisées pour l'extraction des métaux lourds<sup>20</sup> et leur détection par fluorescence.<sup>21</sup> Le calixarène substitué par quatre fluorophores constitués par des groupements sulfonamides (CalixDANS-4) a été étudié au laboratoire pour la complexation du plomb (voir chapitre IV).<sup>22</sup> Cette sonde s'est révélée très sensible au plomb : une limite de détection de 4,2 µg/L a été obtenue. Une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents a été observée. Dans le but de synthétiser une sonde spécifique pour la détection du plomb par microcavité laser, notre choix s'est porté sur l'analogue **109**. Le composé **109** est non fluorescent ; la structure de l'entité complexante est identique à celle du CalixDANS-4 (Schéma V-10). Grâce aux groupements fonctionnels amines terminaux, la sonde peut être greffée sur le copolymère bloc PS-b-PAA. Ce polymère bloc est choisi pour la fabrication des microcavités laser.



*Schéma V-10 : Structures du CalixDANS-4 étudié pour la complexation du plomb et de la molécule cible **109**.*

### III.1. Analyse rétrosynthétique

Afin d'accéder à notre sonde spécifique pour la détection du plomb à l'aide de microcavités laser, nous avons opté pour la stratégie développée ci-dessous. Cette stratégie est comparable à celle utilisée au laboratoire pour la synthèse du CalixDANS-4.<sup>22</sup> Une première étape consiste à synthétiser le synthon **110** à base de calixarène trétrasubstitué par des groupements de type acide acétique et le synthon **111** constitué par le benzène sulfonamide substitué en para par un groupement éthylamine protégé par un Boc. Dans la seconde étape, par une réaction de sulfonation, le composé **109** peut être obtenu (Schéma V-11).



*Schéma V-11 : Analyse rétrosynthétique de la synthèse du ligand spécifique du plomb pour la détection par microcavités laser.*

## III.2. Synthèse du ligand spécifique du Pb<sup>2+</sup>

### III.2.a. Synthèse du précurseur **110**

Dans une première étape, les quatre fonctions phénols du calixarène **90** sont substituées par réaction avec le bromoacétate d'éthyle en présence de carbonate de potassium au reflux de l'acétone (Schéma V-12). Le calixarène substitué par quatre fonctions acétate d'éthyle **112** est obtenu pur avec un rendement de 75 %. La difficulté de cette étape est de se séparer du bromoacétate d'éthyle excédentaire ; ce dernier n'est pas révélé à l'UV et migre parfois avec le composé **112**.

La réaction de saponification du composé **112** est réalisée dans l'éthanol avec une solution de soude à 15 % (w : w). Le tétraacide ainsi obtenu avec un rendement de 94 % est suffisamment pur pour passer à l'étape suivante qui consiste à synthétiser le synthon **111**.

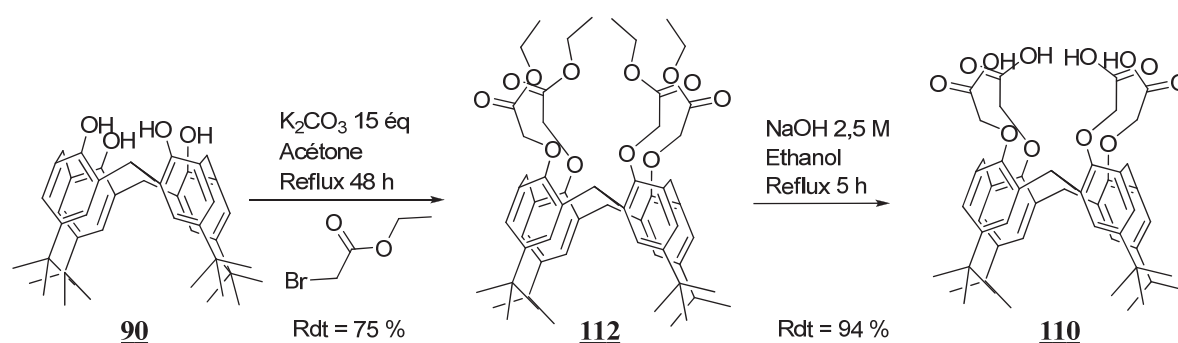


Schéma V-12 : Tétrastitution du calixarène par le bromoacétate d'éthyle.

### III.2.b. Synthèse du sulfonamine protégé **111**

Le sulfonamine **111** protégé par un groupement Boc est obtenu par réaction entre le dérivé 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonamide **113** et le di-*tert*-butyldicarbonate dans le *tert*-butanol à température ambiante.<sup>23</sup> Le composé **111** est obtenu avec un excellent rendement de 95 %. Il faut également signaler qu'aucune protection du groupement sulfonamine par le Boc n'est observée dans les conditions choisies (Schéma V-13).

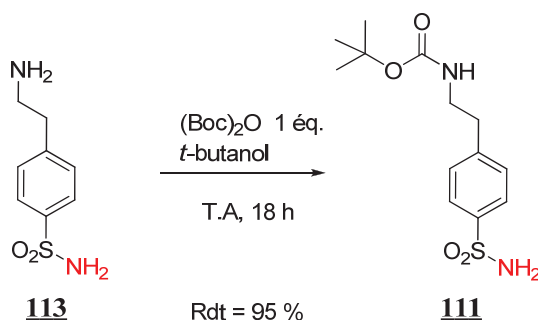
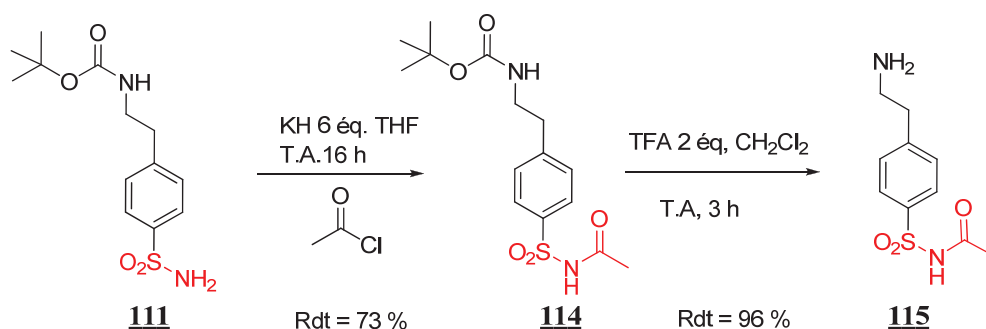


Schéma V-13 : Protection de l'amine primaire par le di-*tert*-butyldicarbonate.

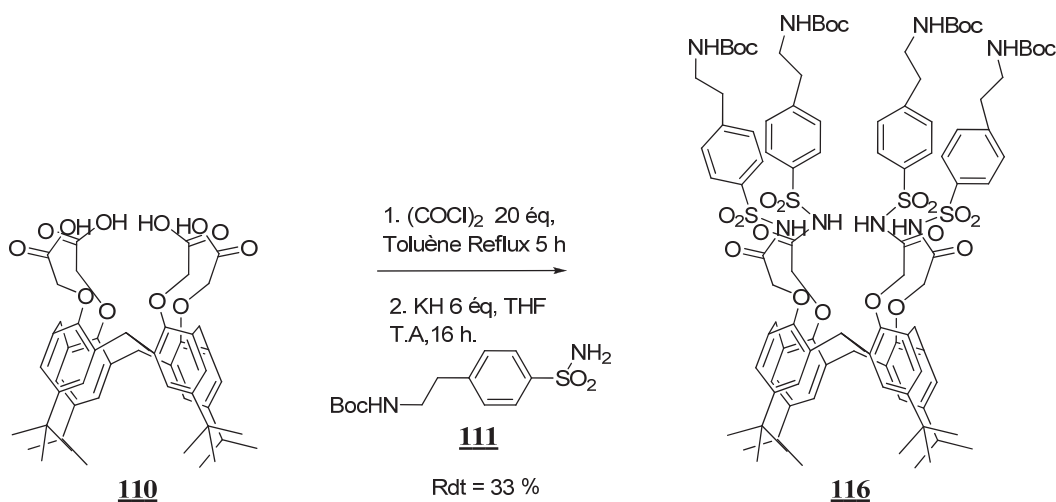
Afin de tester la déprotection du groupement Boc sur le produit final, nous avons réalisé une étude à partir d'un composé modèle. Pour ce faire, nous avons synthétisé le composé modèle **114** (Schéma V-14) correspondant à l'acylation du précurseur **111** par le chlorure d'acétyl après déprotonation préalable, en présence d'hydrure de potassium.<sup>24</sup> Le composé **114** est obtenu avec un rendement de 73 %. Nous avons ensuite étudié la coupure du groupement protecteur *t*-butyloxycarbamate en présence de deux équivalents d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane.<sup>25</sup> Ces conditions nous ont permis d'obtenir le composé déprotégé **115** avec un rendement de 96 % sans toucher à la fonction acétylsulfonamide.



*Schéma V-14 : Déprotection du groupement carbamate (Boc) à partir d'un composé modèle **111**.*

### III.2.c. Accès au ligand **109**

Le calixarène tétraacide **110** est ensuite traité avec le chlorure d'oxalyle dans le toluène sous argon pour former quatre fonctions de type chlorure d'acyle (Schéma V-15). Sans aucune purification, le produit est immédiatement mis en contact avec l'anion du sulfonamide **111**, obtenu dans le THF en présence de l'hydrure de potassium.<sup>26</sup> Un lavage en milieu acide est nécessaire pour éliminer le potassium de l'entité complexante du calixarène. Le produit de sulfonation **116** obtenu avec un rendement de 33 % est suffisamment pur pour passer à la déprotection du Boc.



*Schéma V-15 : Sulfonation du calixarène par le dérivé **111**.*

Le groupement protecteur *t*-butyloxycarbamate du calixarène **116** (Schéma V-16) a ensuite été clivé dans les conditions décrites pour le composé modèle **115**, c'est-à-dire en présence de deux équivalents d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Ces conditions nous ont permis d'obtenir le composé déprotégé **109** avec un rendement de 86 % après recristallisation dans le cyclohexane. L'entité complexante N-sulfonamide est débarrassée de tous cations interférents après plusieurs lavages à l'eau Millipore. Notre ligand spécifique pour la détection du plomb ainsi obtenu est prêt à être greffé sur le copolymère bloc PS-*b*-PAA.

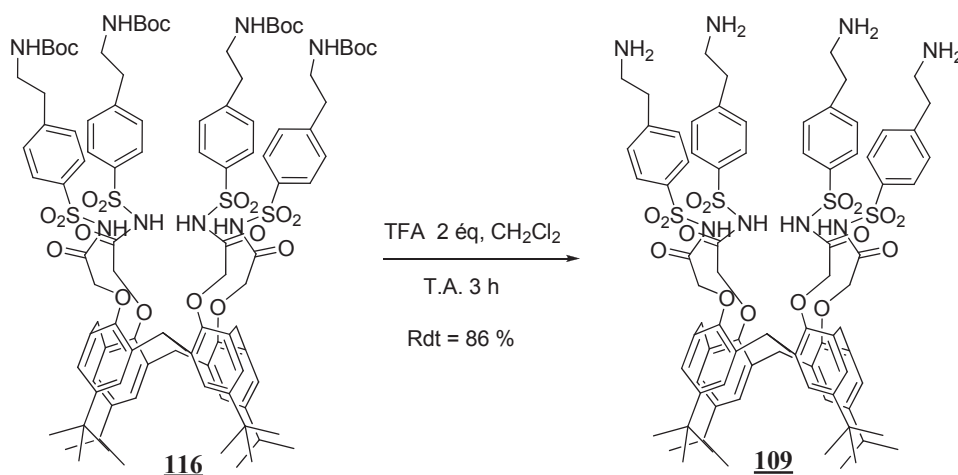


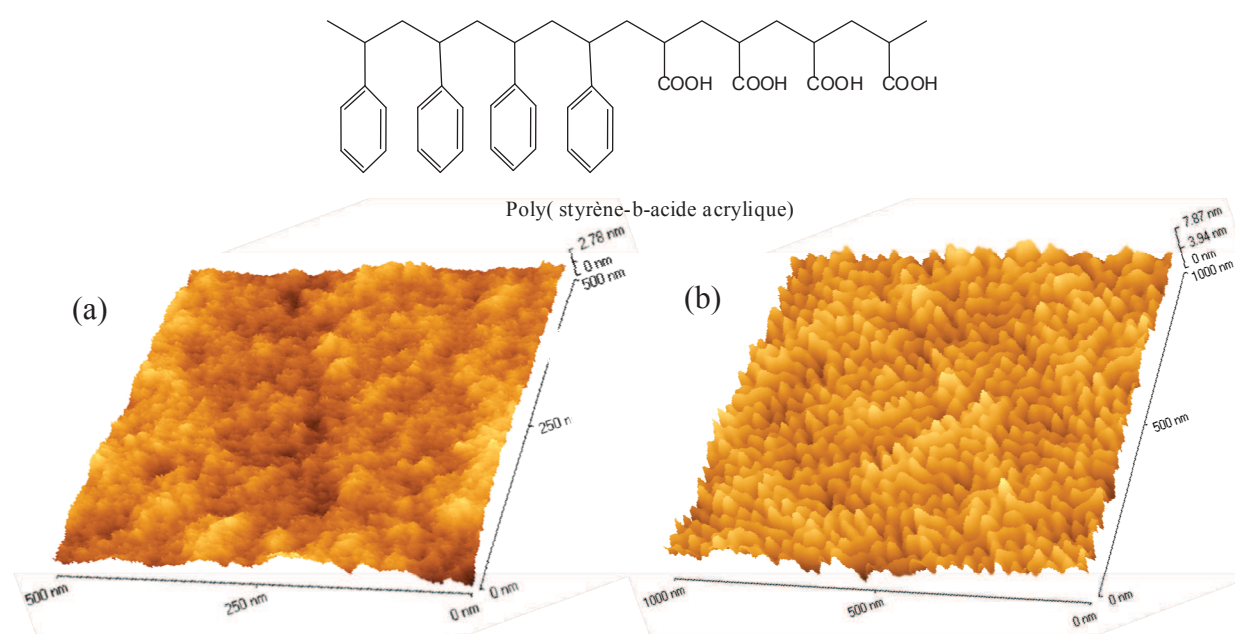
Schéma V-16 : Déprotection du groupement protecteur Boc par l'acide trifluoroacétique.

## IV. Greffage des ligands **100c** et **109** sur le copolymère PS-*b*-PAA

### IV.1. Le choix du polymère

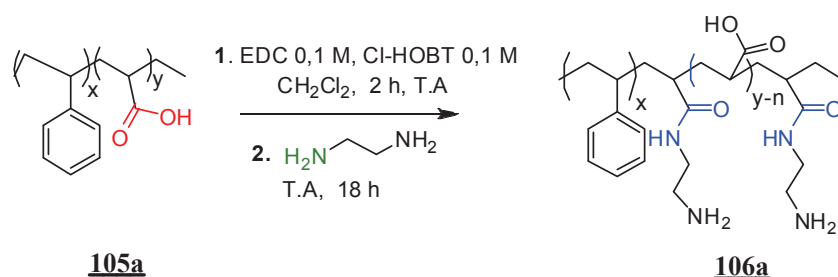
Le polymère utilisé pour la détection des métaux lourds par microcavités laser doit avoir certaines qualités : il doit être gonflable à l'eau pour faciliter la bonne diffusion de l'analyte, il doit être capable de séquestrer le colorant laser sans que ce dernier migre dans le milieu. Le polymère doit aussi être facilement mis en œuvre pour la fabrication des microcavités par lithographie et attaque par plasma oxygène. Afin d'avoir une meilleure diffusion de l'analyte dans la matrice du polymère, notre choix s'est porté sur le copolymère bloc poly (styrène-*b*-acide acrylique).<sup>27</sup> Le PS-*b*-PAA est un composé commercial constitué d'un bloc polystyrène de masse molaire moyenne  $M_n = 5580\text{-}6820$  et d'un bloc acide polyacrylique de masse molaire moyenne  $M_n = 1890\text{-}2310$ . Il est montré dans la littérature que le film de copolymère PS-*b*-PAA présente une organisation micellaire.<sup>28,29</sup> L'image AFM du film de copolymère bloc PS-*b*-PAA immergé dans de l'eau montre que les groupements polystyrène hydrophobes sont entourés par le bloc hydrophile de polyacide acrylique. Grâce à leur hydrophobicité, les groupements styrènes du PS-

b-PAA sont capables de séquestrer le colorant laser. Quant aux groupements acides acryliques ils permettent de fonctionnaliser le polymère par les ligands 100c et 109, mais aussi d'avoir une bonne diffusion de l'analyte. Le ligand greffé sur la partie hydrophile du polymère permet d'avoir une meilleure sensibilité grâce à une bonne diffusion de l'analyte en milieu aqueux dans la matrice du polymère. Les images AFM de la Figure V-7 ci-dessous présentent les propriétés du copolymère bloc poly(styrène-b-acide acrylique) dopé avec le colorant laser, DCM. En regardant l'échelle verticale des images AFM du film sec Figure V-7-a et plongé dans l'eau Figure V-7-b, on remarque une organisation micellaire au niveau de la surface du film. Cette structure micellaire est nettement plus organisée dans le film de polymère plongé dans l'eau Figure V-7-b. Cette organisation micellaire du film confirme bien que les groupements styrènes hydrophobes sont entourés par les groupements acides acryliques hydrophiles.



**Figure V-7 :** Images AFM du copolymère bloc poly (styrène-b-acide acrylique) sec (figure a) et gonflé à l'eau (figure b).

La fonctionnalisation du ligand spécifique pour la détection du mercure sur la matrice du copolymère bloc PS-b-PAA nécessite une modification partielle des groupements acides du polymère (voir la stratégie 2 du Schéma V-6). Nous avons donc décidé d'y greffer l'éthylène diamine sur le polymère. Deux approches ont été principalement développées: la première consiste à greffer l'éthylène diamine dans la masse du polymère PS-b-PAA et la deuxième approche consiste à effectuer la fonctionnalisation en surface, c'est-à-dire à greffer l'éthylène diamine sur un film de copolymère PS-b-PAA déjà déposé. Dans les deux cas, la modification est effectuée en utilisant les conditions de couplage peptidique.<sup>30,31</sup> Le schéma ci-dessous décrit les conditions utilisées pour la fonctionnalisation du copolymère bloc PS-b-PAA avec de l'éthylène diamine 106a.

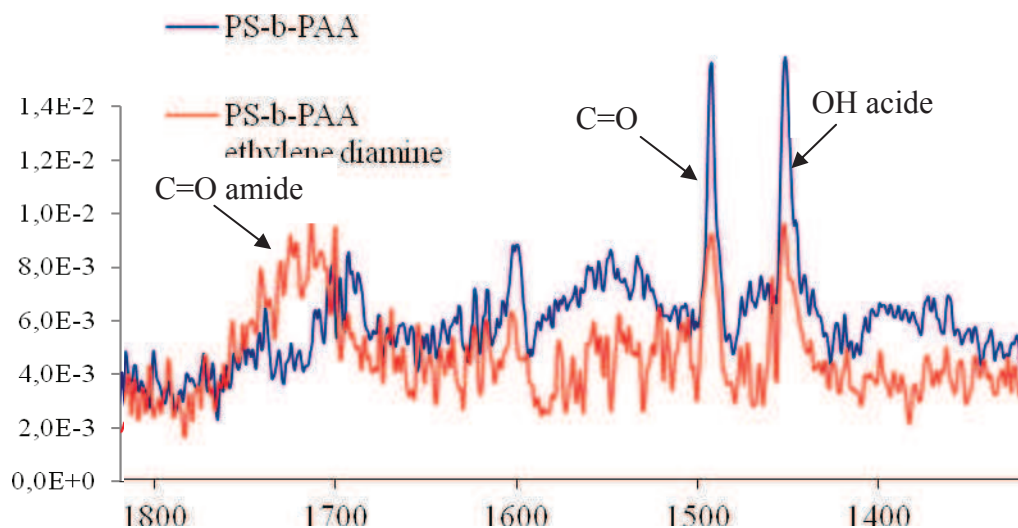


*Schéma V-17 : Conditions de modification du copolymère bloc PS-b-PAA par l'éthylène diamine en masse et en surface.*

## IV.2. Quantification des amines greffées sur le PS-b-PAA

### IV.2.a. Amines greffées dans la masse

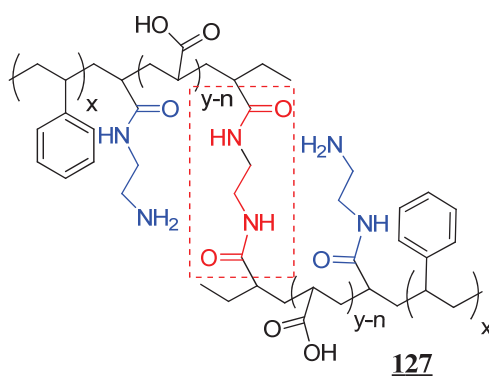
La réaction de couplage peptidique d'une partie des groupements acides du polymère avec l'éthylène diamine est effectuée en masse, c'est-à-dire que le polymère est dissous dans du dichlorométhane (voir le paragraphe V.2 p 231 de la partie expérimentale). L'analyse infrarouge du polymère modifié ainsi obtenu met en évidence une bande caractéristique de la liaison peptidique à une longueur d'onde de  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Figure V-8 ci-dessous).



*Figure V-8 : Analyse infrarouge du copolymère bloc PS-b-PAA seul et modifié par l'éthylène diamine en masse.*

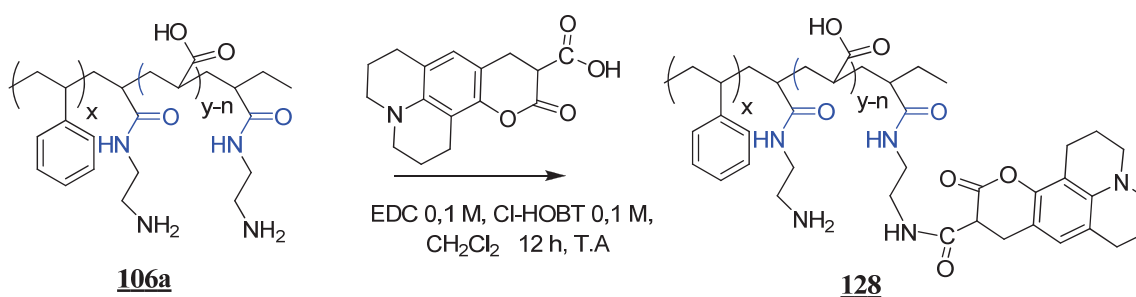
L'apparition de cette bande ne permet pas d'avoir des renseignements supplémentaires sur l'architecture du polymère modifié ; on peut avoir une réticulation du polymère selon le schéma décrit ci-dessous.





*Schéma V-18 : Structure du copolymère PS-b-PAA obtenu après réticulation par l'éthylène diamine.*

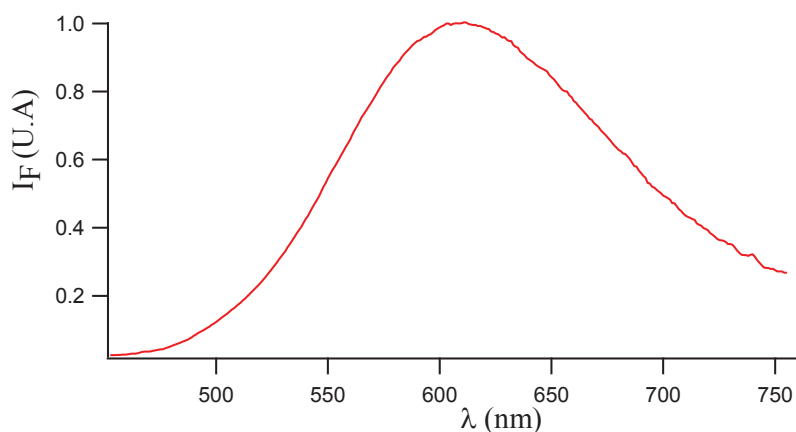
Dans le but de déterminer l'existence de groupements amines libres sur le polymère modifié, celui-ci peut être greffé par un composé fluorescent qui se fixe sur ces groupements.<sup>32,33</sup> Nous avons effectué la réaction de fonctionnalisation de la coumarine 343 sur un film du copolymère modifié **106a** en utilisant les conditions couplage peptidique (Schéma V-19 ci-dessous).



*Schéma V-19 : Fonctionnalisation du copolymère modifié avec de la coumarine.*

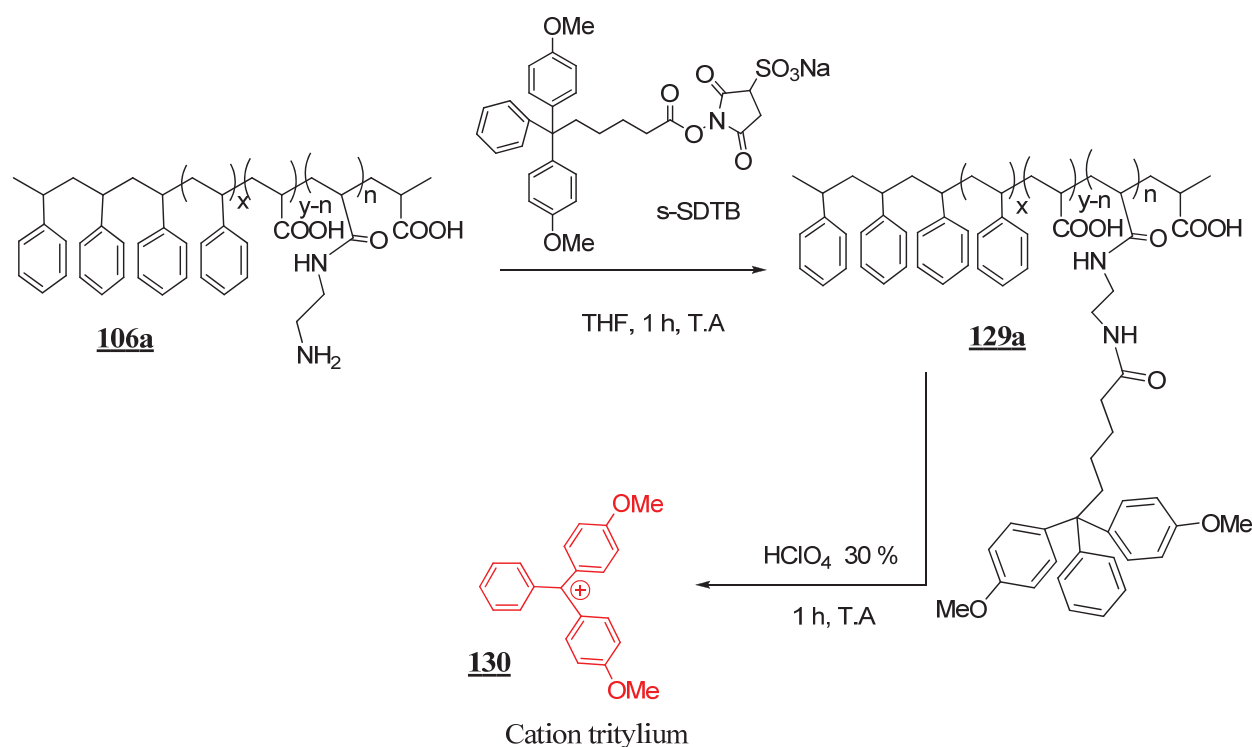
Le film de copolymère est ensuite rincé plusieurs à l'eau Millipore. La Figure V-9 ci-dessous présente le spectre d'émission du film fonctionnalisé avec de la coumarine 343. On observe un maximum de fluorescence de 608 nm caractéristique de la coumarine.

Les analyses effectuées par spectroscopie infrarouge et par fluorescence sur le PS-b-PAA modifié permettent de mettre en évidence la modification du copolymère bloc PS-b-PAA, mais pas une quantification du nombre de groupements amines libres. Un calcul du taux de fonctionnalisation du copolymère par l'éthylène diamine peut apporter des informations notables sur la sensibilité du composé poreux pour la détection du mercure.



**Figure V-9** : Spectre de fluorescence de la coumarine greffée sur le copolymère bloc modifié avec de l'éthylène diamine.

La quantification des amines primaires peut se faire par une réaction de dosage acido-basique classique. Cependant, cette méthode ne peut pas s'appliquer dans notre cas à cause de la structure de notre polymère PS-b-PAA constitué de groupements acides carboxyliques. McCarley *et al.* ont développé une technique de quantification des amines sur un polymère comportant des groupements acides greffés avec des amines primaires.<sup>34</sup> Cette technique consiste à fonctionnaliser le polymère modifié par un composé fluorescent, la sulfo-succinimidyl-4-O-(4,4'-diméthoxytrityl)butyrate) connu sous le nom de la s-SDTB. Le groupement trityle de la s-SDTB est ensuite clivé pour conduire au cation tritylium correspondant qui est ensuite dosé par absorption. A partir de la courbe d'étalonnage de la s-SDTB, en utilisant la loi de Beer-Lambert, on peut remonter au nombre de fonctions NH<sub>2</sub> libres sur le polymère. En adoptant la même stratégie, nous avons quantifié le nombre de fonctions amines sur le copolymère bloc PS-b-PAA modifié (Schéma V-20).



**Schéma V-20 :** Quantification des amines par la *s*-SDTB sur le copolymère bloc PS-b-PAA modifié en masse par l'éthylène diamine.

En réalisant la courbe d'étalonnage de la *s*-SDTB, un coefficient d'extinction molaire de  $70000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  est obtenu. Après clivage de la fonction trityle, l'absorbance de la solution obtenue permet d'accéder à la concentration de la solution à partir de la loi de Beer-Lambert ci-dessous.

$$A = \varepsilon l C \quad \text{éq V-2}$$

Où,

A est l'absorbance

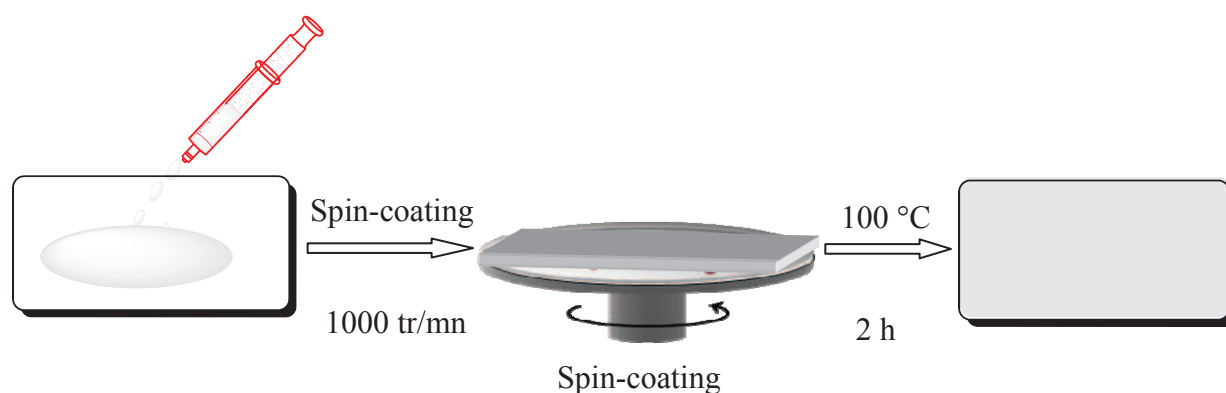
$\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire du cation trityle en  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$

l est la largeur de la cellule en cm

Le nombre de moles de groupements acide dans le copolymère bloc PS-b-PAA commercial est de  $4,89 \times 10^{-2}$  mmole. Après clivage du groupement trityle greffé en masse, la loi de Beer-Lambert nous a permis de déterminer  $4,077 \times 10^{-3}$  mmole de groupements amines libres sur le polymère modifié. Connaissant le nombre de moles du bloc acide acrylique initial ( $4,89 \times 10^{-2}$  mole), nous avons pu déterminer un taux de fonctionnalisation de 8,4 % des groupements acides du PS-b-PAA par l'éthylène diamine. Ce taux de fonctionnalisation nous nous paraît suffisant pour le greffage des ligands spécifiques du mercure et du plomb sur le polymère bloc PS-b-PAA.

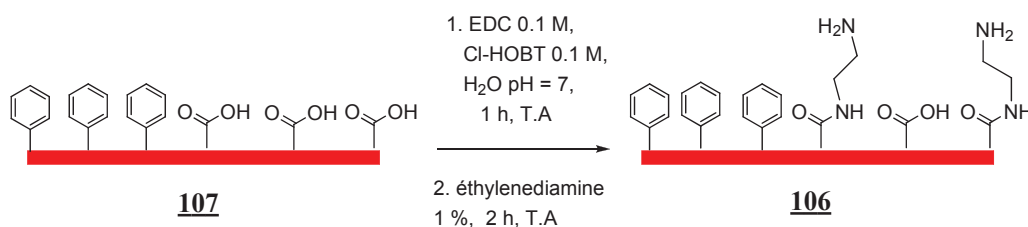
## IV.2.b. Amines greffées à la surface du film PS-b-PAA

Nous avons aussi envisagé de fonctionnaliser les ligands spécifiques 100c et 109 synthétisés pour la détection du  $\text{Hg}^{2+}$  et du  $\text{Pb}^{2+}$  à la surface d'un film du copolymère PS-b-PAA. Cette approche permet d'avoir un contact direct entre la sonde et l'analyte, elle ne nécessite pas de diffusion de l'analyte à l'intérieur du film de copolymère. Comme dans le cas du greffage en masse, la fonctionnalisation du ligand  $\text{Hg}^{2+}$  nécessite une modification du copolymère. Nous avons donc préparé des films de polymère bloc PS-b-PAA sur une lame de verre par « spin-coating ». La solution de copolymère à 50 mg/mL est préparée dans un mélange de solvant dioxane / toluène 50 : 50 v/v. Le solvant est ensuite évaporé à l'étuve pendant 2 heures à 100 °C. Le schéma ci-dessous présente la procédure de préparation des films du copolymère PS-b-PAA. L'épaisseur du film est de l'ordre de 0,7  $\mu\text{m}$ .



**Figure V-10** : Préparation des films de poly(styrène-*b*-acide acrylique) sur une lame de verre par « spin-coating ».

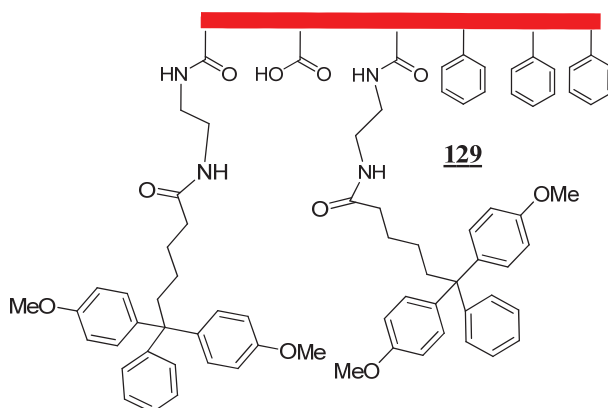
La surface du film ainsi obtenue est ensuite fonctionnalisée avec de l'éthylène diamine. Une première expérience de fonctionnalisation de la surface à partir du dérivé lithié correspondant à l'éthylène diamine s'est révélée très décevante,<sup>35</sup> le film de polymère se décollait instantanément du substrat de verre. En utilisant les conditions de couplage peptidique en milieu aqueux tamponné à pH = 7, l'éthylène diamine est greffé à la surface du film. Le Schéma V-21 présente les conditions utilisées pour la fonctionnalisation de la surface du film de copolymère PS-b-PAA.



**Schéma V-21** : Réaction d'amidation d'un film du copolymère PS-b-PAA.

Comme dans le cas de la fonctionnalisation en masse, le nombre de moles de groupements amines du composé 106 est quantifié par la s-SDTB. Après une heure de réaction

de couplage peptidique utilisant les conditions du Schéma V-21, le film de copolymère est rincé abondamment à l'eau désionisée. Le schéma ci-dessous présente la structure du composé obtenu en fonctionnalisant la s-SDTB à la surface du film.



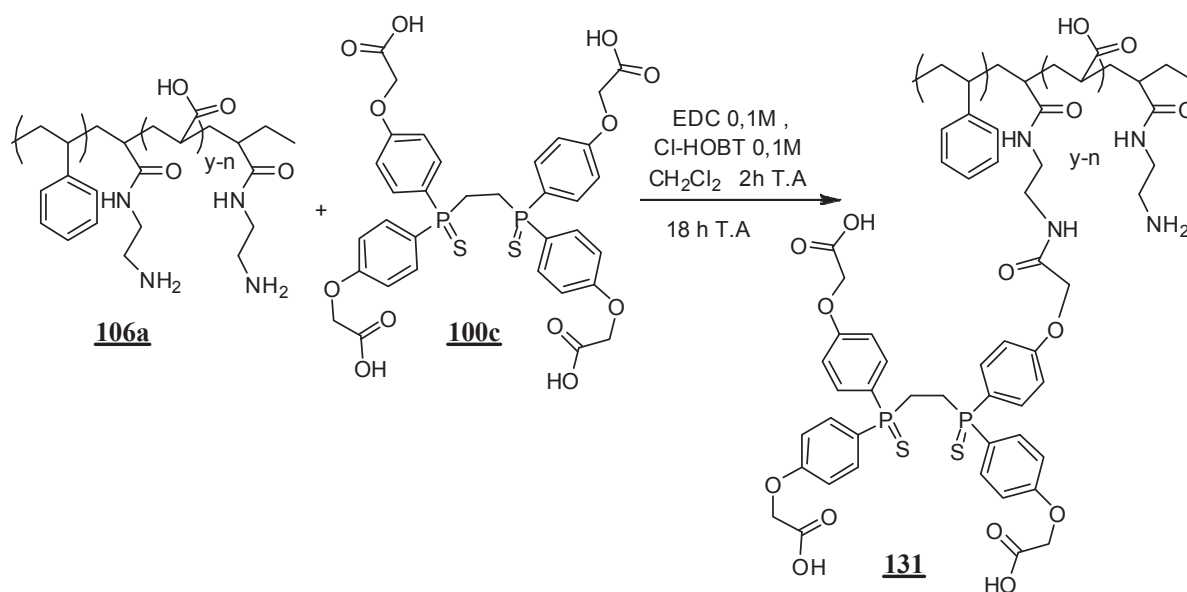
**Schéma V-22** : Structure du film de copolymère bloc PS-b-PAA fonctionnalisé par la s-SDTB.

Le groupement trityle est ensuite clivé en milieu acide pour donner le cation tritylium correspondant. La densité des groupements amines libres obtenue à la surface du polymère est de  $1,25 \cdot 10^{-9}$  mol/cm<sup>2</sup> de lame de verre. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue par McCarley *et al.* ( $3,4 \cdot 10^{-9}$  mol/cm<sup>2</sup>).<sup>34</sup>

### IV.3. Fonctionnalisation des ligands sur le PS-b-PAA

#### IV.3.a. Fonctionnalisation du ligand Hg<sup>2+</sup> dans la masse

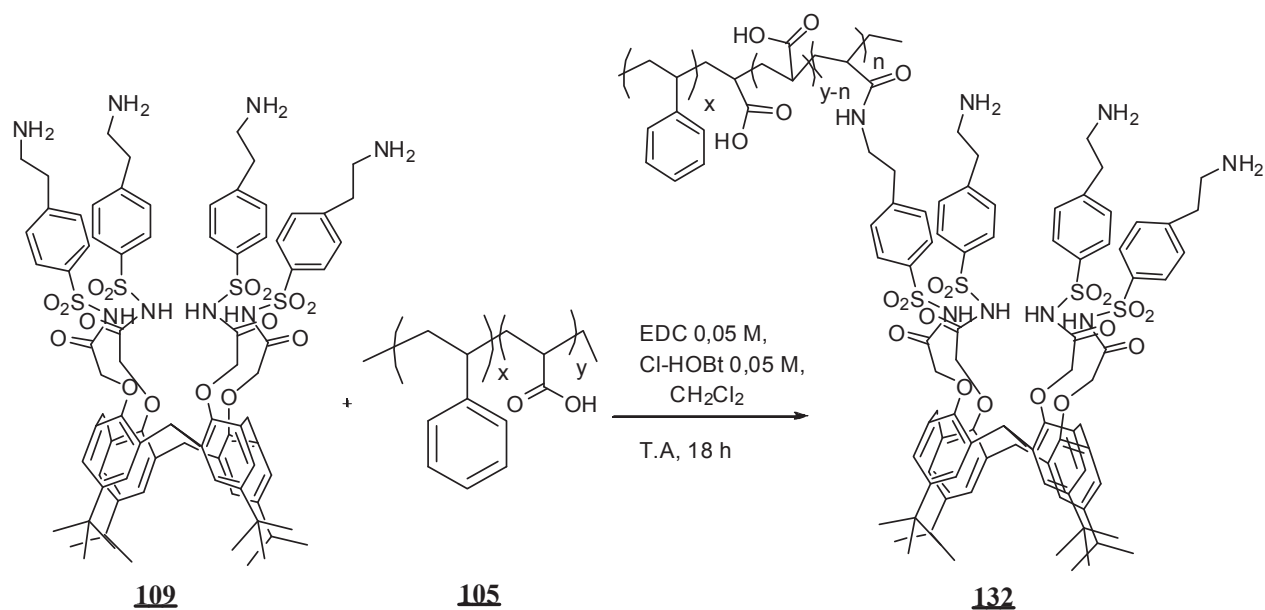
Le ligand spécifique pour la détection du mercure 100c est greffé sur le copolymère bloc PS-b-PAA modifié par l'éthylène diamine à partir des conditions de couplage peptidique décrites au paragraphe IV.2.a. L'analyse élémentaire du composé poreux ainsi obtenu montre que 14 % des groupements amines du copolymère modifié sont greffés avec le ligand 100c spécifique du mercure. La suite du travail va consister à étudier la solubilité de cette première génération de composé poreux 131 (Schéma V-23) obtenue pour la détection du mercure par microcavités laser.



**Schéma V-23** : Fonctionnalisation du ligand spécifique du mercure sur le copolymère bloc PS-b-PAA modifié par l'éthylène diamine.

#### IV.3.b. Fonctionnalisation du ligand spécifique de $\text{Pb}^{2+}$ dans la masse

La fonctionnalisation du ligand **109** sur le polymère bloc PS-b-PAA ne nécessite pas une modification du polymère. En effet, le composé **109** porte quatre fonctions amine susceptibles de réagir avec les groupements acides carboxyliques du copolymère PS-b-PAA (Schéma V-24). La poudre blanchâtre solide issue de la réaction de couplage peptidique avec l'éthylène diamine est quantifiée par analyse élémentaire. Celle-ci révèle que 18 % des fonctions amines du ligand spécifique pour la détection du plomb sont greffés sur les groupements acides du copolymère bloc PS-b-PAA. Comme dans le cas du composé poreux obtenu pour la détection du mercure, le but est de fabriquer des microcavités de bonne qualité optique (homogénéité, transparence). Donc, la solubilité du composé poreux **132** obtenu pour la détection du plomb (Schéma V-24) sera également étudiée dans différents solvants organiques.



*Schéma V-24 : Fonctionnalisation du ligand spécifique pour la détection du plomb sur le copolymère bloc PS-b-PAA.*

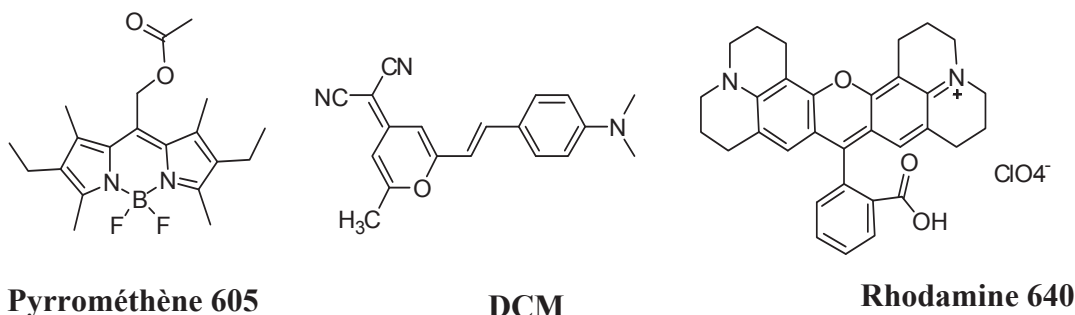
## V. Etude des propriétés optiques des films

### V.1. Les films de copolymère PS-b-PAA

#### V.1.a. Le choix du colorant laser

Un grand nombre de molécules organiques à base de pyrrométhènes sont utilisées ou sont utilisables comme colorant laser.<sup>36</sup> Leur efficacité en tant que colorant laser est excellente dans la bande spectrale comprise entre 550 et 650 nm. Ces colorants laser ont une stabilité moyenne avec  $10^5$  cycles d'excitation-déexcitation radiative, ce qui correspond à 28 h à une fréquence de 10 Hz. Leur durée de vie de fluorescence est de l'ordre de 5 ns.<sup>37</sup> Le pyrrométhène 605 commercialisé par la société Exciton est soluble dans un grand nombre de solvants organiques ; il possède un rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F = 0,75$  dans l'éthanol. Le 4-dicyanométhylène-2-méthyl-6-*p*-diméthylaminostyryl-4H-pyrane connu sous le nom de DCM est un colorant laser très utilisé. Le colorant laser DCM a été incorporé dans du PMMA et dans certains ormosils pour des applications en optique.<sup>38</sup> Les colorants laser à base de rhodamine sont les plus utilisés à cause de leur grande photostabilité ;<sup>39</sup> ils peuvent effectuer en moyenne  $10^7$  cycles d'excitation-déexcitation, ce qui correspond à une dizaine de jours à une fréquence d'irradiation de 10 Hz. La Rhodamine 640 est relativement soluble dans les solvants polaires ; sa bande spectrale s'étire entre 550 et 750 nm, avec un rendement quantique de fluorescence  $\Phi_F = 0,95$  dans l'éthanol.<sup>40</sup>

Pour notre projet de détection des métaux lourds par microcavités laser, notre choix s'est porté sur ces trois types de colorants laser. Le Schéma V-25 ci-dessous présente les structures du pyrrométhène 605, du DCM et de la Rhodamine 640 qui seront incorporés dans la matrice du copolymère bloc PS-b-PAA.



Pyrrométhène 605

DCM

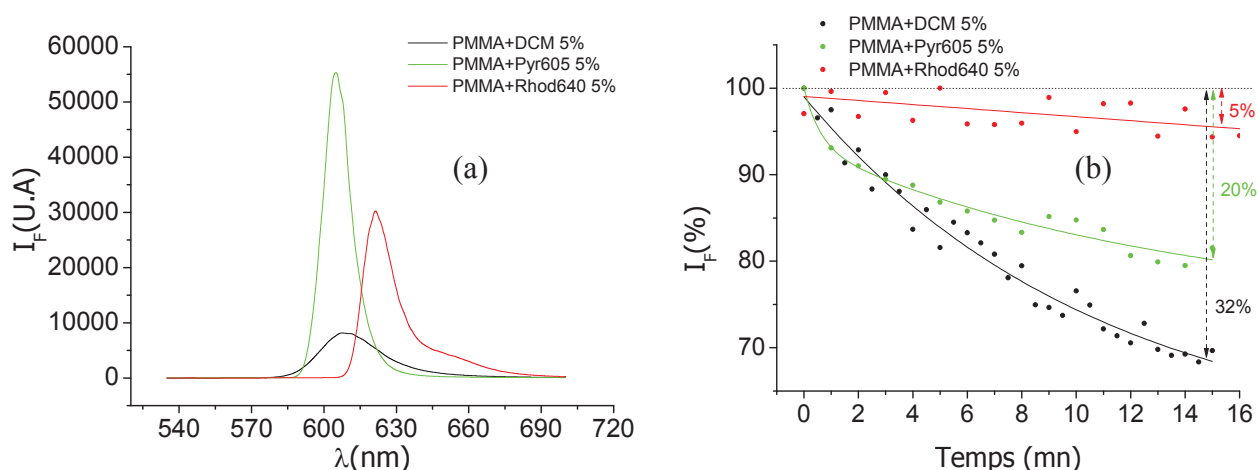
Rhodamine 640

*Schéma V-25 : Structures des colorants laser ; pyrrométhène, DCM et Rhodamine 640.*

### V.1.b. La stabilité des colorants dans la matrice PMMA

Le polymère poly(méthacrylate de méthyle) PMMA a été largement utilisé par nos collègues physiciens du laboratoire LPQM de l'ENS Cachan.<sup>1,2,41</sup> Dans le but de fabriquer des microcavités photostables, la stabilité des colorants laser DCM, pyrrométhène 605 et Rhodamine 640 dopé à 5 % dans la matrice du polymère PMMA a fait l'objet d'une étude. La Figure V-11 ci-dessous présente les spectres ASE (Amplified spontaneous Emission) de ces colorants laser et de leur dégradation par irradiation continue. Le signal du spectre d'émission ASE obtenu avec le pyrrométhène est nettement plus intense que celui du DCM et de la rhodamine 640 (Figure V-11-a). Cependant, une dégradation de 20 % du colorant laser est observée après irradiation pendant 15 mn de la microcavité dopée avec du pyrrométhène (Figure V-11-b). Le spectre ASE du PMMA dopé avec 5 % de DCM est deux fois moins intense que celui du pyrrométhène 605. Cependant, celui-ci est plus stable avec une dégradation du colorant de 5 % après 15 mn d'irradiation. En ce qui concerne la rhodamine 640, le spectre d'émission ASE obtenu est nettement moins intense que celui du DCM et du pyrrométhène 605 avec une dégradation de 32 % du colorant au bout de 15 mn d'irradiation.



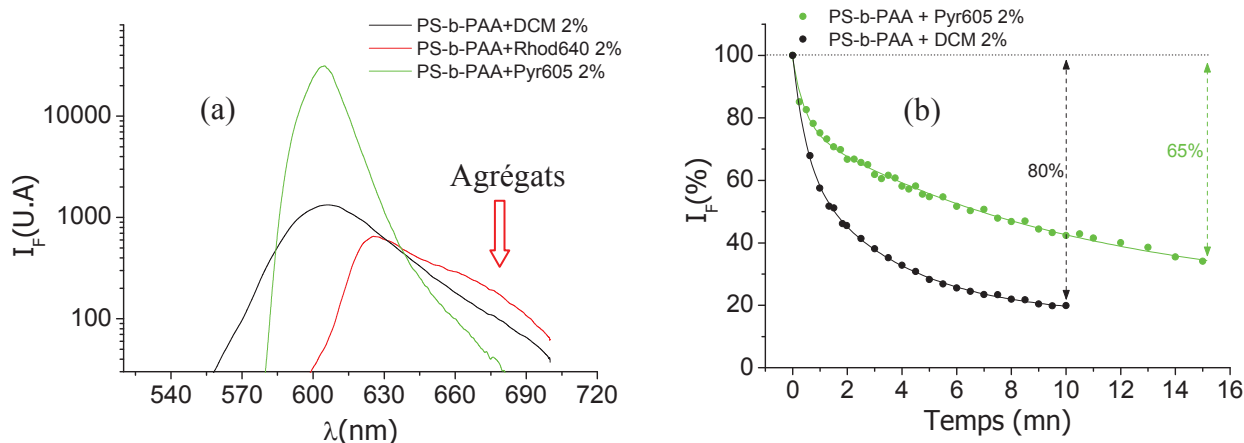


**Figure V-11 :** Spectres d'émission ASE du PMMA dopé avec le DCM, le pyrrométhène 605 et la rhodamine 640 à 5 % en poids (figure a) et dégradation des colorants laser dans la matrice du polymère par irradiation continue au laser pulsé ( $1 \mu\text{J}$ , 700 ps, 10 Hz), (figure b).

Cette même étude de stabilité de ces colorants laser choisis a été aussi effectuée dans la matrice du copolymère bloc PS-b-PAA.

### V.1.c. Stabilité des colorants laser dans la matrice du PS-b-PAA

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'étude de la qualité optique des films du copolymère bloc PS-b-PAA. Après avoir étudié sa solubilité dans différents solvants organiques, à savoir le THF, le toluène, le dioxane et l'anisole, des films du copolymère bloc PS-b-PAA de très bonne qualité optique sont obtenus à partir d'un mélange de solvants dioxane / anisole 50 : 50 pour une concentration en polymère à 125 mg/mL. La Figure V-12 ci-dessous présente les spectres d'émission ASE et la dégradation des colorants laser DCM et pyrrométhène dopés dans la matrice du polymère bloc PS-b-PAA. Les spectres ASE de ces films de polymère dopés avec 5 % puis 2 % de DCM et de pyrrométhène 605 ne montrent aucune présence d'agrégats (Figure V-12-a). Nous n'avons pas pu obtenir des films de bonne qualité optique pour le copolymère dopé avec de la rhodamine 640 à cause de la présence d'agrégats. Ces agrégats se caractérisent par la présence d'un épaulement au niveau du spectre d'émission ASE vers les grandes longueurs d'onde. Comme observé dans le cas du PMMA, le spectre d'émission ASE du pyrrométhène est plus intense que celui du DCM et de la rhodamine. Par contre, une dégradation de 60 % du colorant laser est observée au bout de 15 mn d'irradiation (Figure V-12-b). Le DCM qui s'est révélé très stable dans la matrice PMMA s'est dégradé à 80 % après seulement 10 mn d'irradiation.



**Figure V-12 :** Spectres ASE du PS-b-PAA dopé avec le DCM, le pyrrométhène 605 et la rhodamine 640 à 5 % (figure a) et dégradation des colorants laser dans la matrice du copolymère par irradiation au laser pulsé ( $1 \mu\text{J}$ , 700 ps, 10 Hz, (figure b).

Le Tableau V-1 ci-dessous est un récapitulatif de la stabilité des colorants laser étudiés DCM, pyrrométhène 605 et rhodamine 640 dans la matrice des polymères PMMA et PS-b-PAA. On remarque une nette instabilité de ces colorants dans la matrice du copolymère bloc PS-b-PAA ; celle-ci serait éventuellement due à la présence des groupements acides dans le copolymère. Dans la suite du travail, notre choix s'est porté sur le pyrrométhène 605 qui s'avère être plus stable que le DCM dans le copolymère bloc PS-b-PAA.

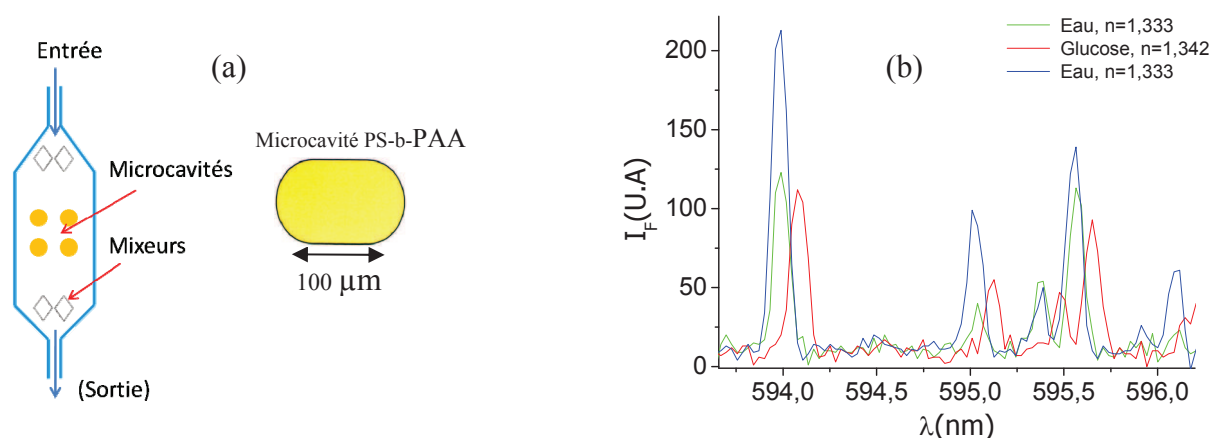
| Colorant laser   | Pourcentage de dégradation |          |
|------------------|----------------------------|----------|
|                  | PMMA                       | PS-b-PAA |
| DCM              | 5                          | 80       |
| Pyrrométhène 605 | 20                         | 60       |
| Rhodamine 640    | 32                         | -        |

**Tableau V-1 :** Comparaison de la stabilité du DCM, du pyrrométhène et de la rhodamine dans le PMMA et le PS-b-PAA après irradiation au laser pulsé ( $1 \mu\text{J}$ , 700 ps, 10 Hz) pendant 15 mn.

#### V.1.d. Preuve de principe de sensibilité de la microcavité laser

Afin d'avoir une preuve de principe de la sensibilité de la microcavité en fonction de l'indice de réfraction du milieu, nous avons d'abord fabriqué des microcavités à partir du copolymère bloc PS-b-PAA dopé avec 2 % de pyrrométhène. Ces microcavités sont ensuite incorporées dans le dispositif microfluidique présenté à la Figure V-13-a. En faisant circuler dans le circuit une solution d'eau dont l'indice de réfraction est de  $n = 1,333$ , le spectre d'émission laser ASE correspondant est enregistré (Figure V-13, spectre vert). L'eau est ensuite remplacée par une solution de glucose qui présente un indice de réfraction supérieur à celui de

l'eau ( $n = 1,342$ ). On observe un déplacement des pics d'émission laser vers le rouge de 0,088 nm (Figure V-13, spectre rouge). Cette variation du spectre d'émission en fonction de l'indice du milieu est une preuve de la sensibilité de la microcavité laser PS-b-PAA. Afin de vérifier la réversibilité du système, de l'eau est à nouveau introduite dans le circuit ; le spectre d'émission ASE enregistré à nouveau retrouve sa position initiale (Figure V-13, spectre bleu).



**Figure V-13** : Preuve de principe de la sensibilité des microcavités laser PS-b-PAA dopée avec 2 % de pyrrométhène à l'indice de réfraction du milieu.

## V.2. Les films de copolymères blocs pour la détection du mercure et du plomb

Afin de préparer les microcavités à partir des copolymères blocs élaborés pour la détection du plomb et du mercure, nous nous sommes d'abord intéressés à l'étude de la solubilité de ces copolymères dans différents solvants organiques.

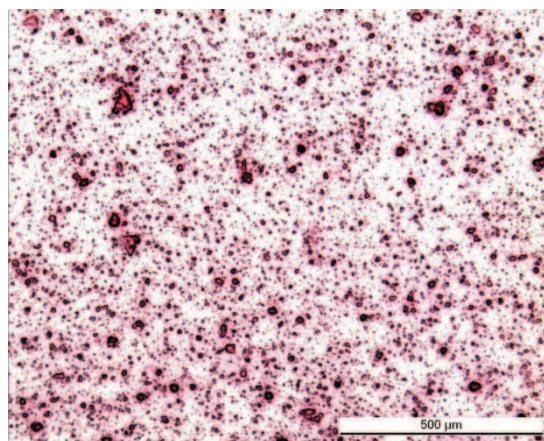
### V.2.a. Solubilité du copolymère bloc élaboré pour la détection du mercure

Une première tentative pour solubiliser le copolymère bloc **131** synthétisé pour la détection du mercure par microlaser est très décevante. En utilisant les conditions optimisées pour solubiliser le PS-b-PAA, notre composé poreux est difficilement soluble, même après une agitation de 18 heures sous ultra-sons. La qualité optique des films obtenus en diminuant la concentration du polymère à 75 mg/mL n'est pas satisfaisante (Tableau V-2). On observe la présence d'agrégats au microscope optique. En utilisant un mélange de solvants plus polaires (THF / Anisole) avec une concentration en polymère de 67 mg/mL, la qualité optique des films obtenus n'est toujours pas satisfaisante. Le Tableau V-2 ci-dessous présente les différentes combinaisons de solvants utilisés pour solubiliser le copolymère 131 pour la détection du mercure.

| PS-b-PAA ligand Hg <sup>2+</sup> | Pyrrrométhène | Solvants                     |
|----------------------------------|---------------|------------------------------|
| 125 mg/mL                        | 5 %           | Dioxane / Anisole (1 : 1)    |
| 75 mg/mL                         | 5 %           | Dioxane / Anisole (1 : 1)    |
| 100 mg/mL                        | 5 %           | Dioxane / Toluene (1 : 1)    |
| 67 mg/mL                         | 5 %           | Anisole                      |
| <b>67 mg/mL</b>                  | <b>5 %</b>    | <b>Anisole / THF (1 : 1)</b> |

*Tableau V-2 : Récapitulatif des tests de solubilité du copolymère fonctionnalisé avec le ligand spécifique du mercure 100c.*

Le microscope optique est un moyen simple qui permet de juger la qualité des films ou des microcavités obtenus. Le microscope utilisé est du type Leica MDLB installé en salle blanche. Celui-ci offre un agrandissement de X1000 et une bonne mise au point permettant d'observer en détail les films de copolymère obtenus. L'image de la Figure V-14 ci-dessous correspond à la meilleure image du film du copolymère 131 visualisée à l'aide du microscope Leica MDLB. Comme on peut le voir, on observe la présence de nombreux agrégats sur surface du film de polymère.



*Figure V-14 : Image de microscope optique du film du copolymère 131 (solubilisé dans Anisole / THF 1 : 1) pour la détection du mercure par microcavités laser.*

Pour expliquer la difficulté de solubiliser ce copolymère, l'hypothèse d'une réticulation partielle du polymère n'est pas à exclure (voir paragraphe V.2.a). En effet, la réticulation du polymère peut s'effectuer au moment de la fonctionnalisation du copolymère avec l'éthylène diamine (voir la structure sur le Schéma V-18). La réticulation du copolymère peut être mise en évidence grâce à la RMN du solide, mais cette caractérisation n'a pas pu être faite au laboratoire.

Donc, malgré toutes les tentatives effectuées pour solubiliser ce copolymère, les qualités optiques des films obtenus ne permettent pas de fabriquer des microcavités laser (Figure V-14 ci-dessus).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fabrication des microcavités à partir du copolymère **132** préparé pour la détection du plomb. Il faut signaler que celui-ci est greffé directement sur le copolymère bloc PS-b-PAA sans aucune modification préalable avec de l'éthylène diamine.

### V.2.b. Solubilité du copolymère pour la détection du plomb

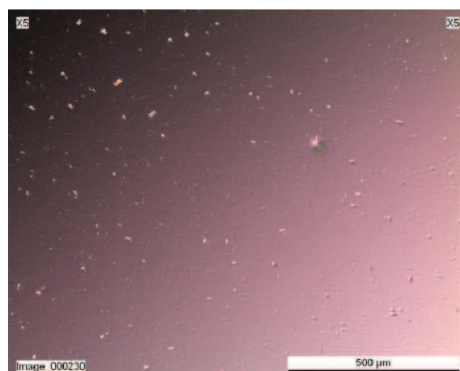
Comme dans le cas du mercure, le copolymère **132** modifié n'est pas très soluble dans les solvants utilisés. En utilisant des solvants très polaires comme le DMF ou l'anisole à une concentration de polymère de 67 mg/mL (Tableau V-3), aucune amélioration de la qualité optique des films n'est obtenue ; on observe toujours des zones d'agrégats à la surface du film du copolymère. Le Tableau V-3 ci-dessous présente les différentes combinaisons de solvants et des concentrations de copolymère **132** utilisés pour élaborer les films de bonne qualité optique.

| PS-b-PAA ligand Pb <sup>2+</sup> | Pyrrrométhène | Solvants                  |
|----------------------------------|---------------|---------------------------|
| 125 mg/mL                        | 5 %           | Dioxane / Anisole (1 : 1) |
| 75 mg/mL                         | 5 %           | Dioxane / Anisole (1 : 1) |
| <b>67 mg/mL</b>                  | <b>5 %</b>    | <b>DMF</b>                |
| 67 mg/mL                         | 5 %           | Anisole                   |

**Tableau V-3** : Récapitulatif des tests de solubilité du copolymère **132** fonctionnalisé avec le ligand pour la détection du plomb.

L'hypothèse d'une réticulation du polymère avec l'éthylène diamine est à exclure ; étant donné que le ligand spécifique est directement greffé sur le PS-b-PAA commercial. Le ligand spécifique du plomb **109** est introduit à 10 % molaire par rapport aux groupements acides du copolymère PS-b-PAA. La réaction de couplage peptidique (voir Schéma V-24) est effectuée en milieu suffisamment dilué pour éviter toute polyaddition des groupements amines sur les fonctions acides.

L'image de la Figure V-15 ci-dessous correspond à celle du meilleur film du copolymère **132** obtenu pour la détection du plomb. Comme observé dans le cas du composé pour le mercure, on note toujours la présence d'agrégats au microscope optique.

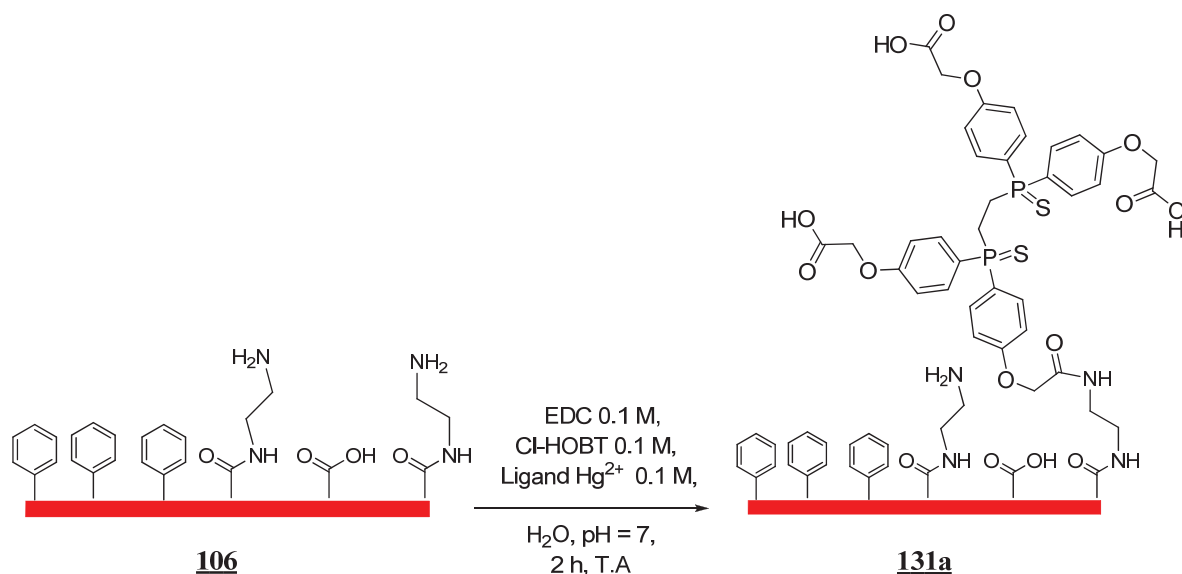


*Figure V-15 : Image de microscope optique du film de copolymère **132** (solubilisé dans le DMF) pour la détection du plomb par microcavités laser.*

A cause de la mauvaise solubilité de nos copolymères obtenus par greffage dans la masse des ligands spécifiques pour la détection du mercure **100c** et du plomb **109**, nous n'avons pas pu fabriquer des microcavités organiques. Pour minimiser, voire éviter toute formation d'agrégats nous nous sommes orientés vers le greffage des ligands **100c** et **109** sur la surface des microcavités organiques du copolymère bloc PS-b-PAA.

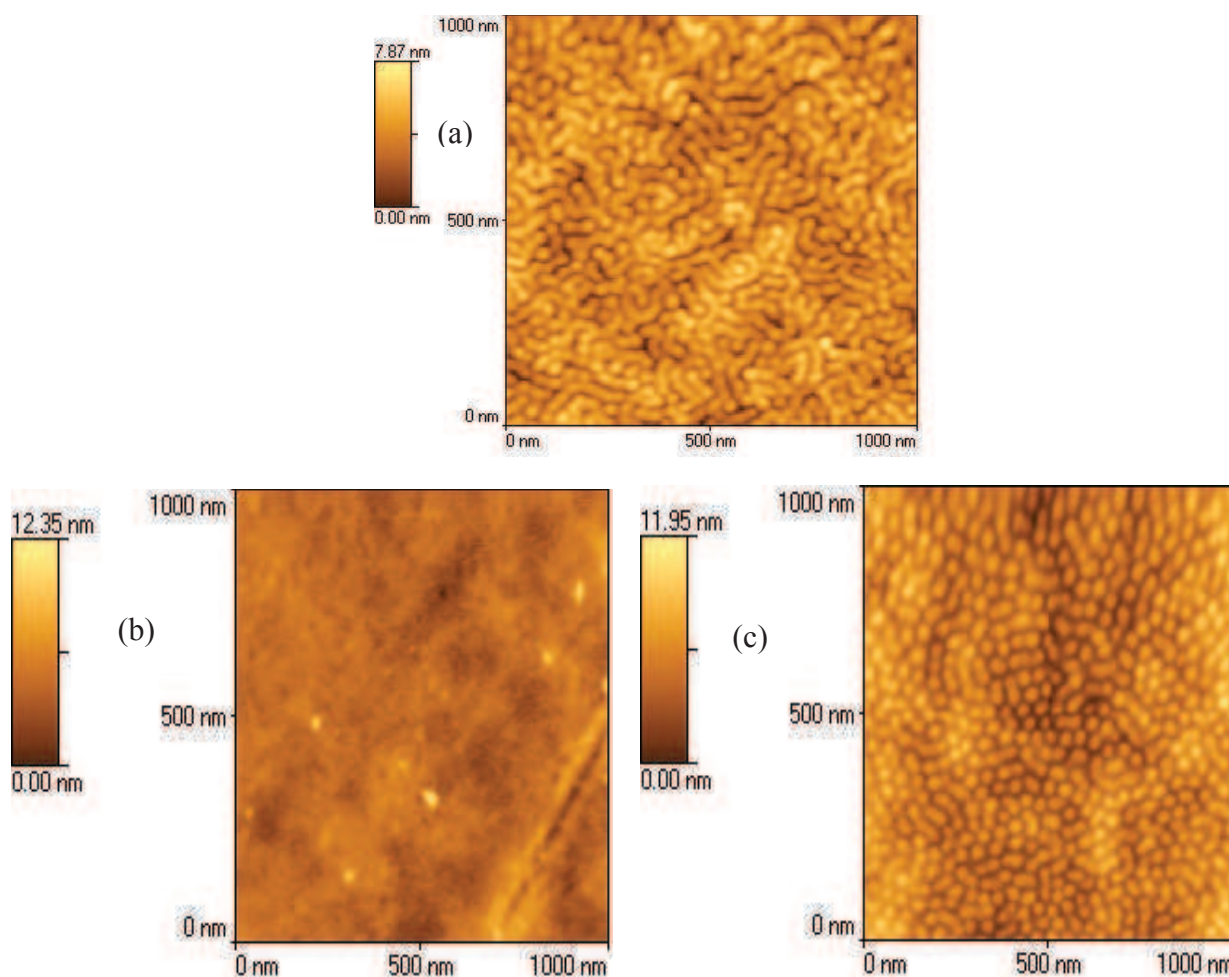
### *V.2.c. Ligand spécifique **100c** greffé à la surface du film de polymère*

Cette approche permet d'avoir un copolymère très sensible à l'analyte. Nous nous sommes d'abord intéressés à la fonctionnalisation du ligand **100c** spécifique du mercure sur le film de copolymère du PS-b-PAA modifié par l'éthylène diamine décrit sur le paragraphe IV.2.b. L'analyse IR ne nous permet pas de mettre en évidence le signal caractéristique d'un groupement sulfure de phosphine (P=S) sur la surface du film.



*Schéma V-26 : Fonctionnalisation du ligand spécifique au mercure **100c** sur la surface du film de polymère modifié par de l'éthylène diamine.*

Nous avons réalisé les images AFM des films du copolymère PS-b-PAA seul (Figure V-16-a) puis fonctionnalisé avec de l'éthylène diamine (Figure V-16-b). Comme on peut le voir, on observe des modifications au niveau de la surface. Nous avons également réalisé l'image AFM du film de copolymère fonctionnalisé avec le ligand **100c** spécifique du mercure (Figure V-16-c). En comparant l'image obtenue avec celle du copolymère modifié avec de l'éthylène diamine, une nette différence au niveau de la surface est observée. Cette différence observée au niveau de la structure micellaire serait probablement due à la fonctionnalisation du ligand spécifique du mercure à la surface du film. Au autre moyen de caractériser la surface du copolymère fonctionnalisé avec le ligand **100c** est la RMN  $^1\text{H}$  ou  $^{31}\text{P}$ . Etant donné le faible taux de greffage du ligand à la surface, il serait difficile de voir un signal un signal caractéristique de la phosphine (P=S à 42 ppm).



**Figure V-16** : Image du film du PS-b-PAA (figure a), fonctionnalisé avec l'éthylène diamine (figure b), puis avec le ligand spécifique **100c** pour la détection du mercure (figure c).

## Conclusion

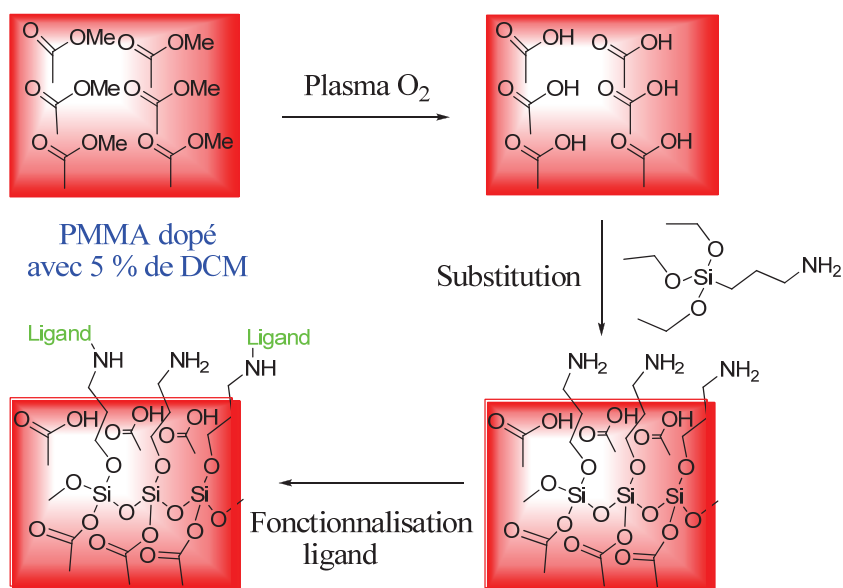
Dans notre projet de synthèse de ligands pour détection des métaux lourds par microcavités laser, nous avons réussi à synthétiser deux nouveaux ligands. Le premier à base de sulfure de phosphine pour la détection du mercure **100c**, le second à base de calixarène substitué par des groupements N-sulfonamides pour la détection du plomb **109**. Ces ligands sont ensuite greffés dans la masse et à la surface du copolymère bloc PS-b-PAA. Une étude comparative de la stabilité des colorants laser DCM, pyrrométhène 605 et rhodamine 640 a permis de conclure que ces trois colorants laser sont moins stables dans la matrice du PS-b-PAA que dans le PMMA. Une preuve de principe de la sensibilité des microcavités laser à l'indice de réfraction du milieu est obtenue. En plus de l'instabilité du colorant laser dans le copolymère PS-b-PAA, nous avons rencontré beaucoup de difficultés à obtenir des films de bonne qualité optique pour les copolymères blocs **131** et **132** respectivement pour la détection de  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ . Cependant, une question se pose sur les agrégats obtenus : cette mauvaise solubilité est-elle due à un fort taux de



fonctionnalisation et ou à une réticulation du polymère? Des analyses par RMN du solide nous donneraient sans doute la réponse.

## VI. Fonctionnalisation des ligands $Hg^{2+}$ et $Pb^{2+}$ à la surface des microcavités laser

Devant les difficultés rencontrées dans la mise en œuvre de copolymère bloc PS-b-PAA, à savoir l'instabilité des colorants laser dans la matrice du polymère, ainsi que la mauvaise qualité optique des films des composés **131** et **132** pour la détection de  $Hg^{2+}$  et de  $Pb^{2+}$ , nous nous sommes orientés vers la fonctionnalisation de la surface du PMMA. En effet, les microcavités PMMA fabriquées par nos collègues du LPQM présentent de bonnes qualités optiques : on n'observe pas d'agrégats ni de défauts de contour majeurs.<sup>1,2</sup> Pour tirer profit de ces qualités des microcavités PMMA, nous avons envisagé de fonctionnaliser la surface des microcavités à partir de la stratégie décrite sur le Schéma V-27 ci-dessous.<sup>42</sup> Cette approche impliquant un traitement sous plasma oxygène présente un risque de dégradation du colorant laser (DCM) incorporé dans la matrice du polymère.



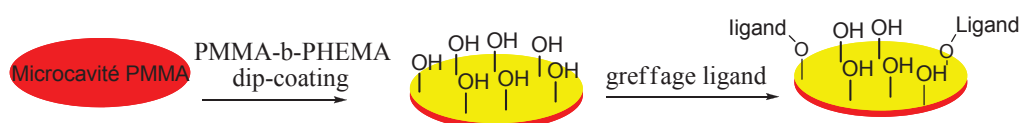
**Schéma V-27** : Principe de fonctionnalisation des ligands  $Hg^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  sur le PMMA activé au plasma oxygène.

Une deuxième approche consiste à déposer sur le film de PMMA une fine couche du copolymère bibloc poly(hydroxyéthylméthacrylate)-b-poly(méthacrylate de méthyle) connu sous l'acronyme PHEMA-b-PMMA sur les microcavités PMMA par « dip-coating ». <sup>43</sup> Le film de copolymère bloc présente une structure micellaire sur laquelle on observe le bloc PMMA entouré par le bloc hydrophile PHEMA (Schéma V-28). <sup>44</sup>



**Schéma V-28 :** Organisation micellaire du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA sur le film du polymère PMMA dopé avec 5 % de DCM.

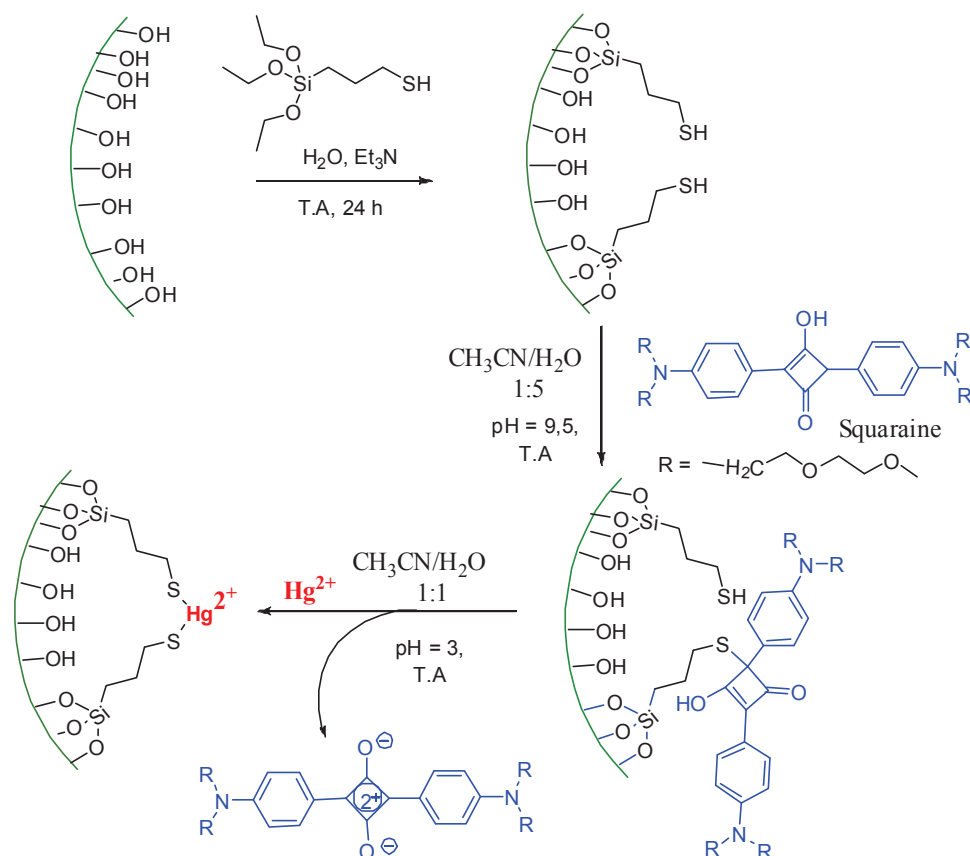
Les groupements alcools du PHEMA libres à la surface du polymère peuvent être fonctionnalisés avec les ligands **100c** et **109** (Schéma V-29). L'avantage de cette approche est qu'aucun risque de dégradation du colorant n'est possible contrairement à la méthode utilisant le traitement avec un plasma  $O_2$ .



**Schéma V-29:** Principe de détection du  $Hg^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  par fonctionnalisation à la surface des microcavités PMMA modifiées par le PHEMA.

## VI.1. Détection du mercure en surface par les groupements thiols

La chimie de surface présente de nombreux intérêts pour la détection des métaux lourds. De nombreuses approches de fonctionnalisation en surface pour des applications en chimie et en biologie sont décrites dans la littérature.<sup>45,46</sup> Dans le but de détecter le mercure, Rurack *et al.* ont greffé le mercaptopropyltriéthoxysilane sur la surface de la silice mésoporeuse.<sup>47</sup> Les groupements thiols libres à la surface de la silice sont ensuite fonctionnalisés par un composé fluorescent, le squaraine. En présence d'une quantité croissante de mercure, une exaltation de l'intensité de fluorescence est observée. Cette exaltation de la fluorescence est due à une réaction de clivage du chromophore (squaraine), puis une complexation du  $Hg^{2+}$ . Le complexe obtenu est de stœchiométrie 2 : 1 c'est-à-dire un cation  $Hg^{2+}$  est complexé par deux groupements thiols. Le Schéma V-30 ci-dessous décrit les différentes étapes de détection du mercure par fluorescence à partir du mercaptopropyltriéthoxysilane greffé sur de la silice mésoporeuse.



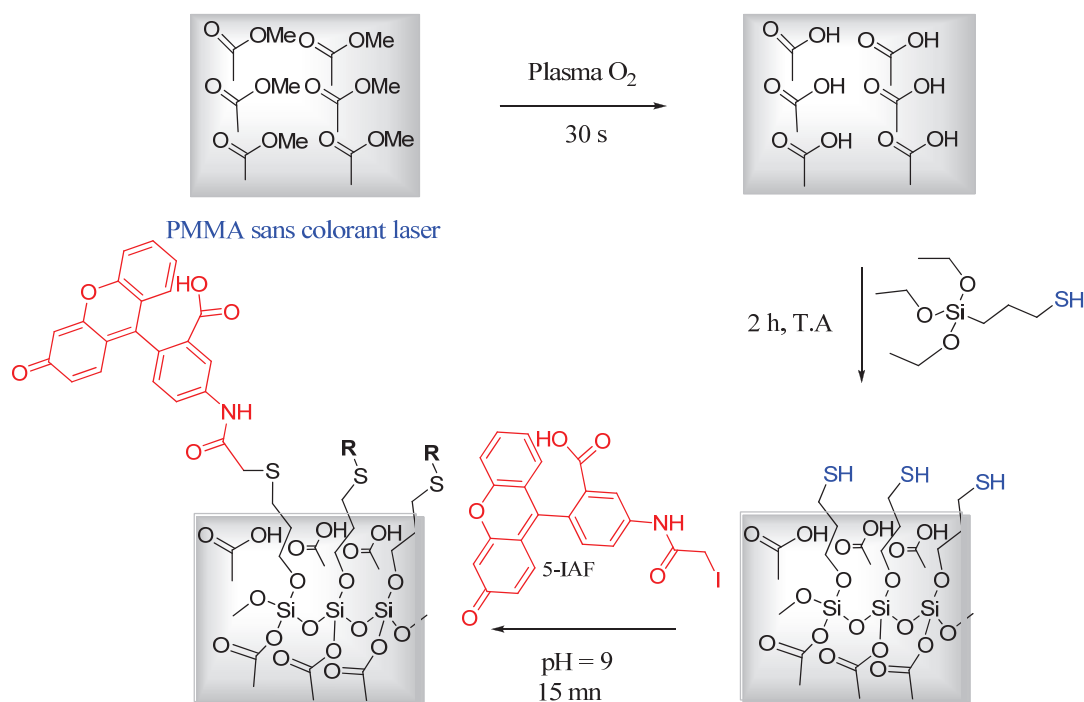
**Schéma V-30** : Détection du mercure par le mercaptopropane triéthoxysilane greffé sur de la silice mésoporeuse.<sup>47</sup>

Une très bonne sélectivité vis-à-vis des cations interférents tels que  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  est obtenue pour une concentration en métal de l'ordre du millimolaire. La limite de détection obtenue est de l'ordre de 100  $\mu\text{g/L}$ , cette valeur est largement supérieure à celle imposée dans les eaux de consommations en Europe. Dans l'optique d'avoir une preuve de principe de la détection des métaux lourds par microcavités laser, nous avons étudié la possibilité de fonctionnaliser le mercaptopropyltriéthoxysilane sur la surface des polymères PMMA et du copolymère bloc PHEMA-b-PHEMA. Nous n'avons pas d'abord utilisé notre composé **100c** synthétisé pour la détection du mercure car la fonctionnalisation du ligand à la surface du PMMA ou PDMS nécessite une solution concentrée du ligand **100c**.

## VI.2. Fonctionnalisation de la surface du PMMA

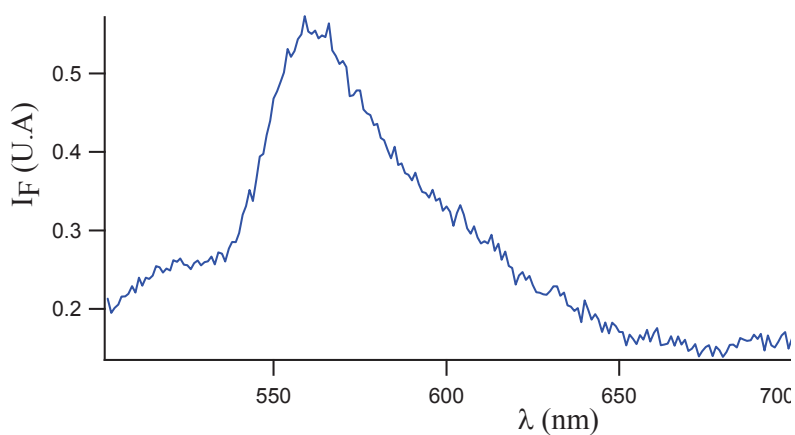
La fonctionnalisation de la surface du PMMA nécessite une réaction d'activation préalable de la surface du polymère. Plusieurs voies sont décrites dans la littérature. Parmi celles-ci, on peut citer les réactions de transamidation,<sup>48</sup> de saponification des groupements esters<sup>49</sup> ou le traitement sous plasma oxygène.<sup>50</sup> Le film de polymère PMMA obtenu par « spin-coating » (voir le principe au paragraphe IV.2.b) est activé par traitement au plasma oxygène pendant 30 s. Les groupements acides carboxyliques libres à la surface du film sont greffés avec

le mercaptopropyl triéthoxysilane. Le film est ensuite rincé plusieurs fois avec une solution de DMF. Le Schéma V-31 ci-dessous présente les différentes étapes de la fonctionnalisation du PMMA avec le mercaptopropyltriéthoxysilane.



**Schéma V-31** : Fonctionnalisation de la surface du PMMA par le mercaptopropyltriéthoxysilane après traitement sous plasma oxygène.

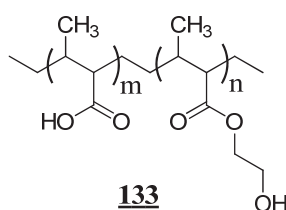
Dans le but d'estimer le taux de greffage des groupements mercaptopropyles à la surface du film, celui-ci est greffé avec le 5-iodoacetamidofluoresceine (5-IAF). Le 5-iodoacetamidofluoresceine est un composé fluorescent utilisé pour mettre en évidence la présence de groupements thiols.<sup>51</sup> Le spectre de fluorescence du film correspondant (Figure V-17) est caractéristique de la fluorescence du 5-IAF greffé sur des groupements thiols.<sup>52</sup>



**Figure V-17** : Spectre de fluorescence du 5-IAF greffé sur le PMMA activé par plasma oxygène et traité avec le mercaptopropyltriéthoxysilane.

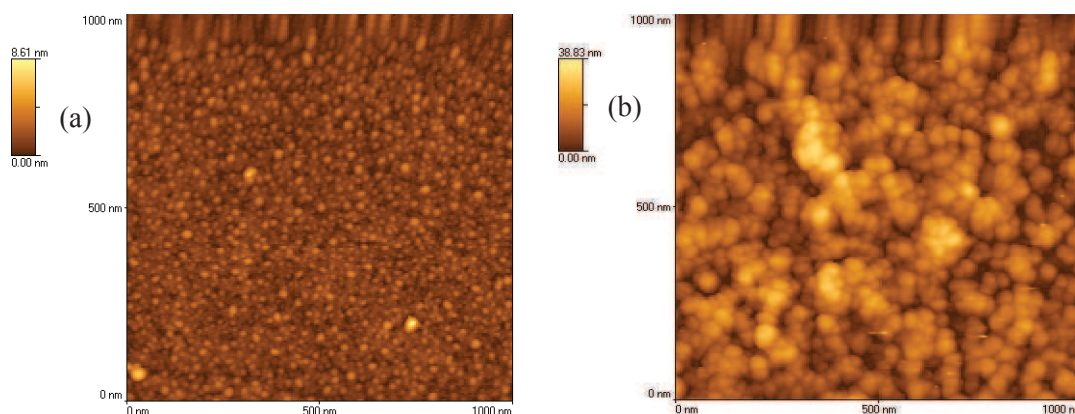
### VI.3. Fonctionnalisation de la surface du PHEMA-b-PMMA

Les microcavités de PMMA dopées avec le colorant laser DCM présentent une grande stabilité (paragraphe V.1.b). Cependant, la fonctionnalisation de la surface du PMMA dopé avec un colorant laser sous traitement avec un plasma O<sub>2</sub> s'avère délicate. Par ailleurs, l'activation de la surface du film sous plasma O<sub>2</sub> risque de dégrader le colorant laser. Nous avons effectué des tests de fonctionnalisation par voie chimique qui n'ont pas été très satisfaisants (la couche de PMMA se décolle). Une alternative consiste à déposer une fine couche du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA par « dip-coating » sur les microcavités de PMMA dopées avec du DCM à 5 %. Le PHEMA-b-PMMA est un copolymère amphiphile constitué de séquences PMMA qui seront compatibles avec la surface du PMMA et donc assurer l'adhésion de la couche mince.<sup>43</sup> Les séquences PHEMA hydrophiles permettent la fonctionnalisation par les fonctions OH placées en surface du film. Le Schéma V-32 ci-dessous présente la structure du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA déposé sur les microcavités de PMMA.



*Schéma V-32 : Structure du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA déposé par « dip-coating » sur le film de PMMA.*

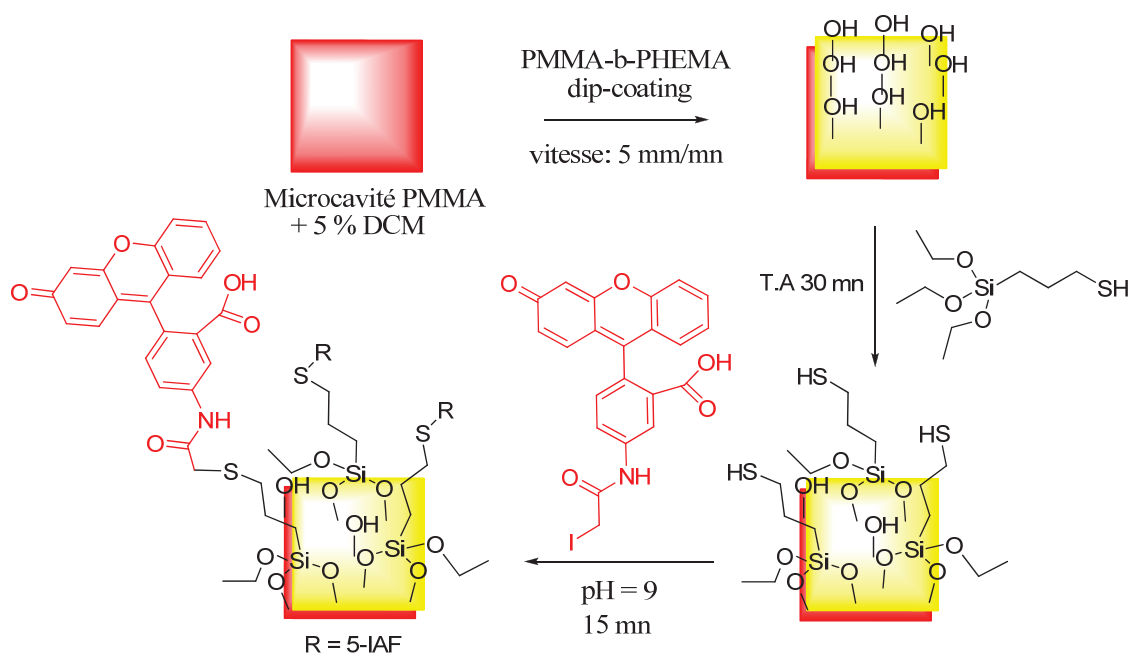
La surface du PMMA est modifiée en déposant une fine couche de PHEMA-b-PMMA. Cette couche est obtenue par « dip-coating » à une vitesse de 5 mm/mn dans une solution à 0,5 % (w / w) de PHEMA-b-PMMA dans un mélange de méthanol / eau 70 : 30. L'épaisseur du film obtenu est mesurée par ellipsométrie cette valeur est comprise entre 5 et 20 nm. La Figure V-18 ci-dessous présente les images AFM d'un film de polymère PMMA puis par dépôt d'une fine couche de PHEMA-b-PMMA sur le PMMA. En comparant ces images, on observe que la séquence PHEMA présente une organisation micellaire à la surface du PMMA. Cette structure a été déjà observée dans la littérature<sup>43</sup> et est interprétée par la Figure V-18.



**Figure V-18 :** Image AFM du PMMA (a) et du même film (b) après « dip-coating » dans une solution de PHEM-b-PMMA à 5 % w / w dans un mélange méthanol / eau 70 : 30 à une vitesse de 5 mm/mn.

## VI.4. Fonctionnalisation des groupements thiols à la surface du PHEMA-b-PMMA

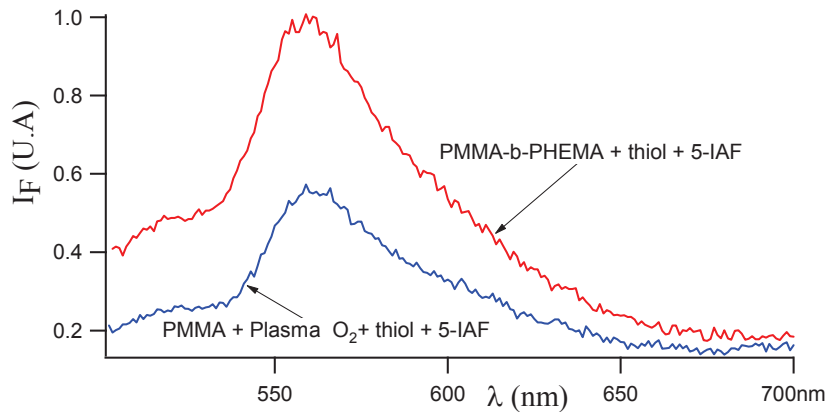
Une fine couche du copolymère PHEMA-b-PMMA (de l'ordre de 50 nm) est déposée par « dip-coating » sur les microcavités de PMMA en forme de carré. Les microcavités carrées utilisées possèdent un spectre d'émission laser simple celui-ci est constitué par des pics fins régulièrement espacés. Les groupements hydroxyles libres à la surface de la microcavité sont ensuite fonctionnalisés par le mercaptopropyl triéthylsilane (Schéma V-33). Les microcavités ainsi fonctionnalisées sont ensuite rincées plusieurs fois avec le DMF. Comme dans le cas du PMMA traité sous plasma  $\text{O}_2$ , la densité des groupements thiols sur la surface des microcavités est mise en évidence par réaction avec le composé fluorescent 5-IAF.



**Schéma V-33 :** Fonctionnalisation de la surface de la microcavité PHEMA-b-PMMA avec le mercaptopropyltriéthoxysilane.

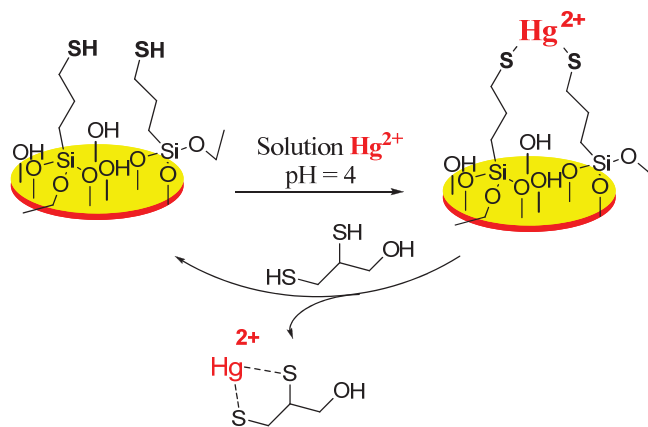
L'intensité de fluorescence du 5-IAF greffé sur le copolymère bloc PHEMA-b-PMMA correspond à la courbe rouge de la Figure V-19. En comparant l'intensité de fluorescence de cette courbe à celle obtenue sur le PMMA activé sous plasma  $\text{O}_2$ , on remarque une meilleure fonctionnalisation du 5-IAF sur le film mince PHEMA-b-PMMA.

Donc, dans le but d'avoir une preuve de principe de la détection des métaux lourds par microcavités laser, le mercaptopropyltriéthoxysilane greffé sur le système PHEMA-b-PMMA sera étudié pour la complexation du mercure.



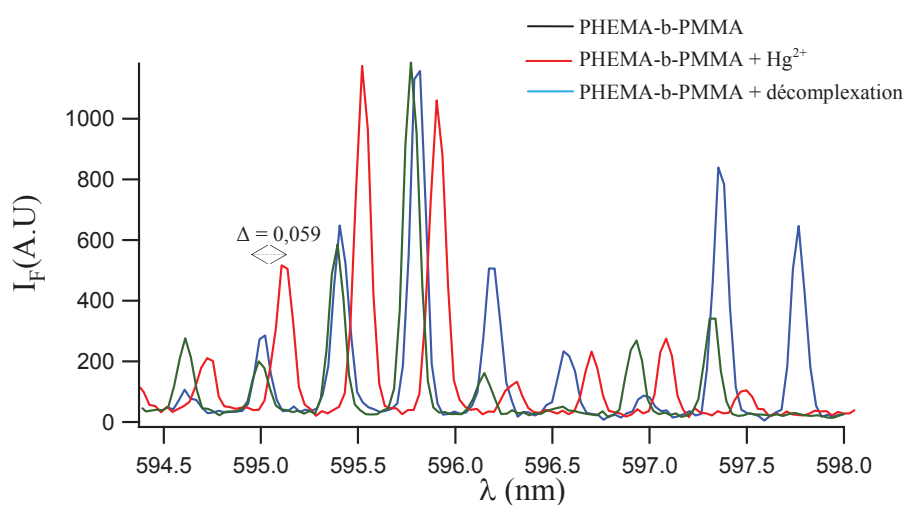
**Figure V-19 :** Etude comparative de la Fluorescence du 5-IAF greffé sur le PMMA activé par plasma oxygène et le PHEMA-b-PMMA.

Les microcavités PMMA dopées avec 5 % de DCM et fonctionnalisées par les groupements thiols sont incorporées dans le système de détection par microfluidique décrit au paragraphe I.2. Notre objectif est d'avoir une variation de l'indice de réfraction en faisant passer une solution de mercure à  $\text{pH} = 4$  dans le circuit. Le 1,2-dimercaptoéthanol est un ligand compétitif utilisé pour l'extraction du mercure.<sup>53</sup> En faisant circuler de nouveau une solution de ce ligand à  $\text{pH} = 4$  dans le circuit, nous espérons avoir une décomplexation du mercure caractérisée par retour du spectre d'émission laser à sa position initiale (Schéma V-34).



**Schéma V-34 :** Complexation du mercure par des groupements thiols greffés à la surface de la microcavité PHEMA-b-PMMA.

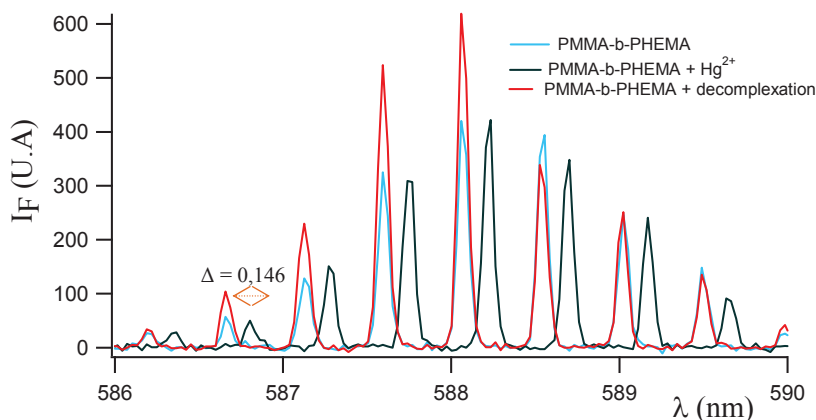
Le circuit microfluidique est conditionné en faisant circuler de l'eau à un  $\text{pH} = 4$ , puis le spectre d'émission laser correspondant est enregistré (Figure V-20, spectre noir). En faisant circuler à nouveau dans le circuit une solution de perchlorate de mercure à  $10^{-6}$  M toujours à  $\text{pH} = 4$ , un déplacement du spectral vers les grandes longueurs d'onde de  $\Delta\lambda = 0,059$  nm est observé (Figure V-20, spectre rouge). Cette variation est provoquée par le changement de l'indice de réfraction du milieu due à la présence des ions  $\text{Hg}^{2+}$  dans l'eau à  $\text{pH} = 4$ . Pour étudier la réversibilité du système, une solution de 1,2-dimercaptoéthanol est introduite à nouveau dans le circuit ; le spectre d'émission laser correspondant est superposable à celui enregistré initialement (Figure V-20, spectre bleu). La Figure V-20 ci-dessous est un résumé de la variation des spectres d'émission obtenus pour une concentration de  $\text{Hg}^{2+} = 10^{-6}$  M en circuit microfluidique.



**Figure V-20 :** Variation de la position du spectre d'émission laser du PHEMA-b-PMMA en fonction de la concentration de perchlorate de mercure ( $C = 10^{-6}$  M) dans le circuit microfluidique.

Les spectres de la Figure V-20 présentées ci-dessus correspondent à la plus faible valeur de la variation de l'indice de réfraction du milieu en fonction de la concentration de perchlorate de mercure introduite dans le circuit microfluidique. Dans une expérience précédente réalisée à partir d'une concentration de  $\text{Hg}^{2+}$  de  $10^{-4}$  M nous avons observé un déplacement spectral de 0,146 nm (Figure V-21).





**Figure V-21** : Variation de la position du spectre d'émission laser du PHEMA-b-PMMA en fonction de la concentration de perchlorate de mercure ( $C = 10^{-4} M$ ) dans le circuit microfluidique.

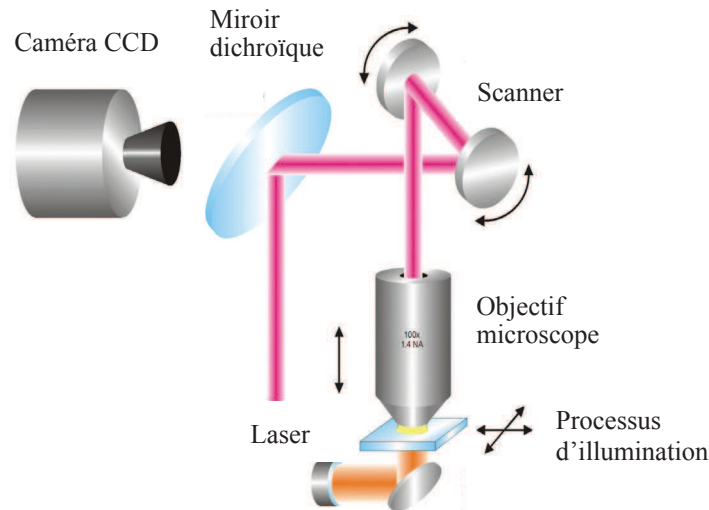
Ainsi, une preuve de principe de la sensibilité de la microcavité fonctionnalisée en surface est obtenue. Cependant, la limite de détection obtenue ( $10^{-6}$  mol/L) reste supérieure aux normes européennes sur la qualité de l'eau. Ces expériences constituent les premiers résultats obtenus, la continuité de ce projet est la thèse réalisée par Haitao Zhang. Pour avoir des systèmes sensibles et sélectifs du mercure et du plomb, nos ligands spécifiques **100c** et **109** pourront être greffés à la surface du copolymère PHEMA-b-PMMA.

## Conclusion

Dans cette deuxième partie du travail qui consiste à fonctionnaliser la surface des microcavités laser PHEMA-b-PMMA, nous avons réussi à effectuer le greffage du mercaptopropyl triéthoxysilane sur le PMMA après activation de la surface sous plasma  $\text{O}_2$  ou par dépôt d'une fine couche du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA. Une comparaison du taux de fonctionnalisation par fluorescence (à partir de la 5-IAF greffée sur les groupements thiols) a permis de constater que la fonctionnalisation de la surface via une fine couche de PHEMA-b-PMMA est plus efficace qu'une attaque par un plasma sur oxygène. Afin d'avoir une preuve de principe de la détection des métaux lourds, une solution de perchlorate mercurique est introduite dans les microcavités de PMMA fonctionnalisées par des groupements thiols. Un déplacement spectral vers les grandes longueurs d'ondes de  $\Delta\lambda = 0,056$  nm est observée. La suite du travail consistera à greffer les ligands spécifiques du mercure **100c** et du plomb **109** à la surface des microcavités PHEMA-b-PMMA.

## VII. Fabrication des microcavités par polymérisation à deux photons (2PP)

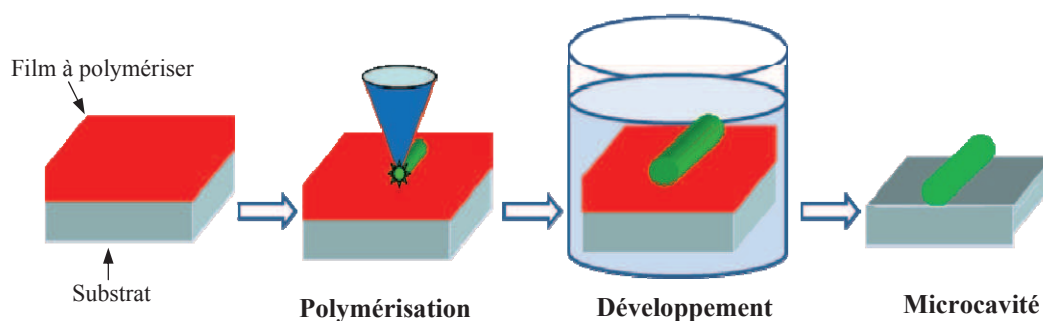
Pendant longtemps, les méthodes de fabrication des microsystèmes à l'aide d'un faisceau laser ont été limitées par leur coût élevé et leur complexité. Les récents progrès technologiques ont considérablement amélioré les performances, la fiabilité et la mise à disposition comme un outil de fabrication. Le laser femtoseconde est utilisé pour la fabrication des circuits microfluidiques par photoablation,<sup>54</sup> il peut également être utilisé pour la fabrication des microcavités. La Figure V-22 ci-dessous présente le principe de l'utilisation du laser pour la fabrication de microsystèmes. A l'aide d'un miroir dichroïque, le faisceau laser réfléchi permet de scanner la structure des microcavités sur une fine couche de polymère déposée sur un substrat de verre ou de silicium.



**Figure V-22 :** Principe de fabrication de microsystèmes par irradiation à l'aide d'un faisceau laser.

L'utilisation du laser permet une vitesse de fabrication rapide avec une très grande précision sans défauts de fabrication. Dans le cadre d'un projet de fabrication de microcavités organiques pour la détection des métaux lourds, nous nous sommes intéressés au procédé de fabrication par photopolymérisation à deux photons (2PP).

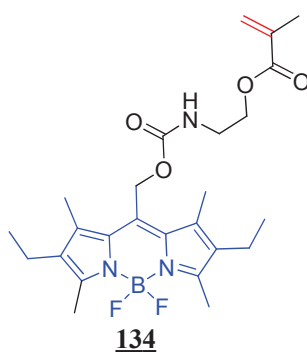
La photopolymérisation à deux photons est une technique de gravure de structures à trois dimensions (3D). La 2PP a lieu grâce à un initiateur de polymérisation comme l'Irgacure 369<sup>®</sup>.<sup>55</sup> Celui-ci absorbe la lumière (infrarouge ou visible) par un processus à deux photons au point focal du faisceau laser. Ce photosensibilisateur produit des radicaux qui provoquent la réticulation de la molécule à polymériser. Après « développement », c'est-à-dire rinçage par un solvant organique, seules les parties réticulées subsistent sur le substrat et forment les microcavités. Le Schéma V-35 ci-dessous décrit les différentes étapes de fabrication des microcavités laser par 2PP.



*Schéma V-35 : Principe de fabrication des microcavités laser par photopolymérisation à deux photons (2PP).*

## VII.1. Microcavités réalisées à partir d'un acrylate

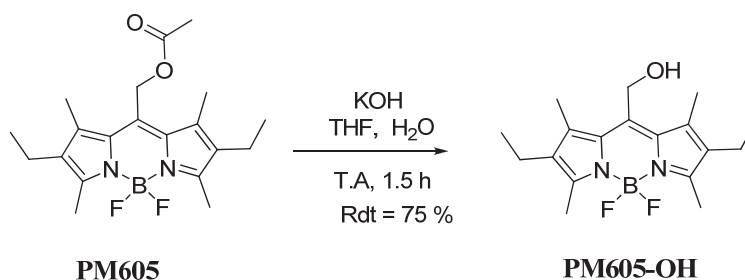
Le projet de fabrication des microcavités par photopolymérisation à deux photons du composé **134** est une collaboration avec le laboratoire POLIMI de l'Ecole Polytechnique de Milan, et le Lazer Zentrum de Hannover (LZH). Cette technique présente l'avantage d'offrir une résolution plus élevée, en évitant la technique de la lithographie basée sur le principe du masquage qui nécessite l'utilisation d'une salle blanche. Le polymère à base de méthacrylate de méthyle fonctionnalisé avec un colorant laser du type pyrrométhène est relativement stable.<sup>56</sup> Ainsi, nous nous sommes intéressés à la synthèse du monomère **134** à base de méthacrylate de méthyle (Schéma V-36) greffé avec le pyrrométhène 605 (Schéma V-37). Les microcavités seront ensuite fabriquées par 2PP.



*Schéma V-36 : Structure du monomère synthétisé pour la fabrication des microcavités par polymérisation à 2PP.*

Notre contribution à ce travail consiste à synthétiser le composé PM605-OH à partir du composé commercial PM605 (Schéma V-37). Une première expérience en milieu basique en présence de l'hydroxyde de lithium (LiOH) en milieu très dilué est sans succès.<sup>57</sup> Après une heure de réaction à température ambiante, nous avons observé une dégradation du produit dans le milieu réactionnel, le produit issu de la réaction ne fluoresce plus. Ce phénomène observé serait probablement dû à l'hydrolyse du groupement BF<sub>2</sub> responsable de la fluorescence du pyrrométhène 605. Dans les mêmes conditions, nous avons utilisé une base moins forte, l'hydroxyde de potassium (KOH). Après une heure de réaction (Schéma V-37), une nette

diminution de la dégradation du milieu réactionnel est observée. Le produit issu de la réaction est isolé avec un rendement de 75 % après une purification par flash chromatographie sur colonne.

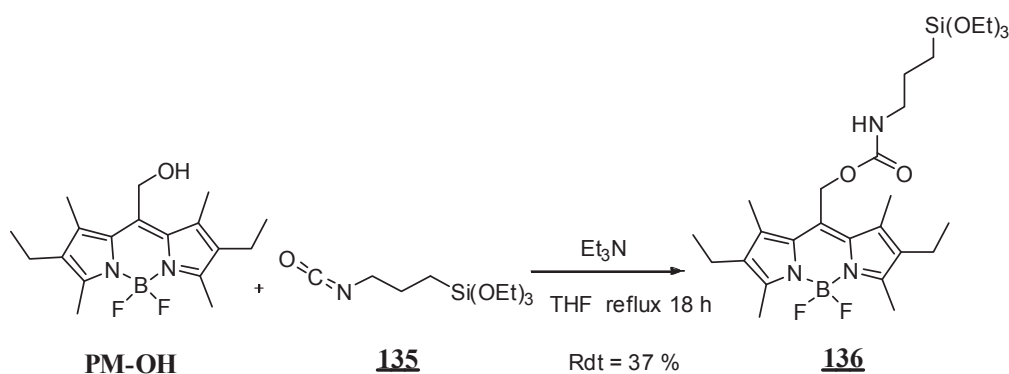


*Schéma V-37 : Synthèse du pyrrométhène PM605-OH.*

Le composé **134** est obtenu par nos collègues du laboratoire POLIMI de Milan, les microcavités issues de ce composé sont en cours de fabrication par polymérisation à deux photons au laboratoire LZH de Hanovre.

## VII.2. Microcavités réalisées à partir d'un ormosil

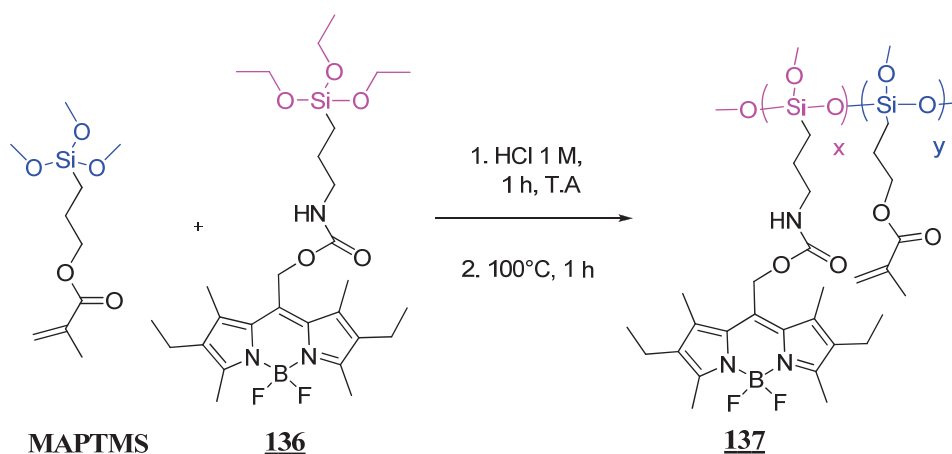
Ce projet de fabrication des microcavités laser à partir d'un sol-gel est une collaboration avec le laboratoire Laser Zentrum de Hannover (LZH). Une première partie du travail consiste à synthétiser le colorant laser **136** à partir de la réaction décrite sur le Schéma V-38. Le composé organique **136** est obtenu par réaction de la triéthoxysilanepropylisocyanate **135** avec le PM-OH au reflux du THF.<sup>58</sup> Le produit issu de la réaction est obtenu avec un rendement de 37 % après flash chromatographie sur gel de silice. Cette réaction nécessite de travailler dans des conditions très anhydres, car les groupements triéthoxysilanes peuvent facilement être hydrolysés.



*Schéma V-38 : Réaction de fonctionnalisation du PM-OH par la triéthoxysilane propylisocyanate.*

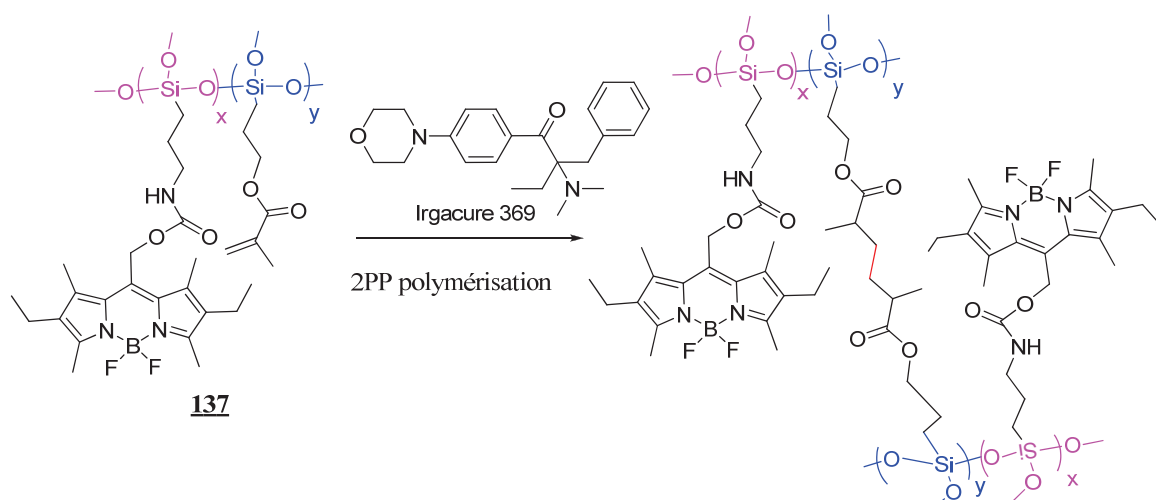
Les sol-gels présentent un intérêt majeur pour la fabrication de ces microstructures.<sup>59-60</sup> Ces matériaux possèdent de bonne qualité optique, sont post-fonctionnalisables et sont chimiquement très stables. D'une manière très simple, le sol-gel peut être préparé comme suit<sup>61</sup> (Schéma V-39) : une première étape consiste à dissoudre le colorant laser **136**, ainsi que le méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPTMS) dans le minimum de toluène. Les groupements

triéthoxysilanes de ces composés sont ensuite hydrolysés par une solution d'acide chlorhydrique à 1 M (5 % par rapport au MAPTMS) pendant une heure à température ambiante puis de l'Irgacure<sup>®</sup> 369 (3 % par rapport au MAPTMS) est ajouté. Le sol-gel ainsi obtenu est ensuite étalé à l'abri de la lumière sur une lame de verre. La condensation des groupements silanols est effectuée en chauffant la lame de verre sur une plaque chauffante à 100 °C pendant une heure. Le Schéma V-39 ci-dessous décrit la structure du sol-gel **137** obtenu après condensation des groupements silanols.



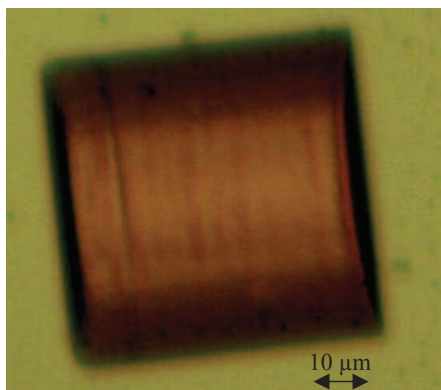
*Schéma V-39 : Structure du sol-gel obtenu par condensation du composé **136** avec le MAPTMS.*

La photopolymérisation à deux photons du sol-gel **137** est effectuée selon le dispositif de la Figure V-22 à l'aide d'un laser titane saphir ( $\lambda = 790 \text{ nm}$ ,  $\tau = 60 \text{ fs}$ , 73 MHz). En irradiant la couche de sol-gel à une puissance de 24 mW (l'irradiation est répétée quatre fois), la structure des microcavités est délimitée. Le développement est ensuite effectué dans le THF pendant 3 mn, puis les microcavités sont rincées trois fois à l'isopropanol et séchées à l'air comprimé. Le Schéma V-40 ci-dessous présente la structure du polymère obtenue par 2PP à partir du sol-gel **137**.



*Schéma V-40 : Polymérisation à deux photons du sol-gel **137** en présence de l'Irgacure 369.*

La microcavité présentée sur le Schéma V-41 correspond à celle obtenue sur le sol-gel 137. Comme on peut le voir, la microcavité ainsi obtenue par polymérisation à deux photons ne présente aucun défaut de contour. Cependant, à cause d'un défaut d'adhésion, le sol-gel n'a pas pu être déposé par « spin-coating ». Celui-ci est étalé à l'aide d'une lame de verre, ce qui a conduit à une épaisseur de l'ordre de 500-700  $\mu\text{m}$ . Pour avoir un bon guidage de la lumière dans les microcavités, l'épaisseur doit être de l'ordre de 700 nm. Nos collègues du LZH travaillent pour améliorer l'adhésion du sol-gel sur le substrat de verre.



*Schéma V-41 : Microcavité obtenue par photopolymérisation à deux photons d'un ormosil avec le pyrrométhène 136.*

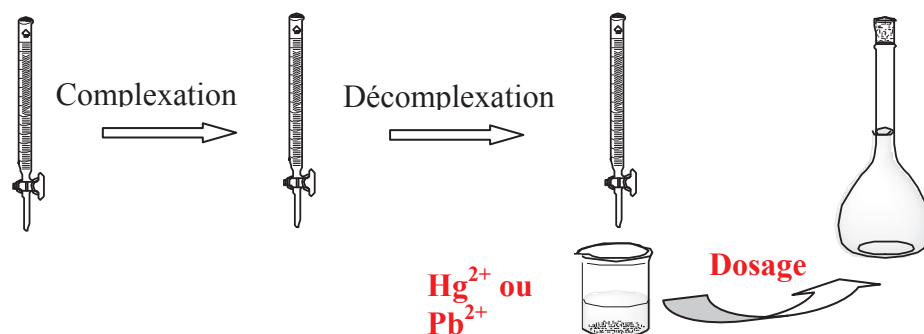
## Conclusion et perspectives

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons réussi à synthétiser deux nouvelles sondes : l'une à base de sulfure de phosphine spécifique pour la détection du mercure et l'autre à base de calixarène spécifique pour la détection du plomb.

Nous avons choisi le copolymère bloc PS-b-PAA pour la fabrication des microcavités laser. Celui-ci est constitué d'un bloc acide hydrophile sur lequel le ligand spécifique est greffé et un bloc polystyrène capable de séquestrer le colorant laser sans le solubiliser dans le milieu. Une étude comparative de la stabilité des colorants laser DCM, pyrrométhène 605 et rhodamine 640 dans des films de polymères PMMA puis PS-b-PAA montre une meilleure stabilité de ces colorants dans le PMMA. Le pyrrométhène 605 s'est révélé néanmoins plus stable dans la matrice du copolymère PS-b-PAA que les autres colorants laser. Une preuve de principe de la sensibilité des microcavités laser incorporées dans le dispositif microfluidique à la variation de l'indice de réfraction du milieu (eau puis glucose) est obtenue à partir du PS-b-PAA dopé avec 2 % de pyrrométhène.

Deux approches de greffage des ligands pour la détection du mercure et du plomb sur le copolymère bloc PS-b-PAA sont développées : ces ligands sont greffés dans la masse et sur la surface d'un film de polymère. Nous avons rencontré des difficultés pour préparer des films de bonne qualité optique à partir des composés poreux obtenus pour la détection du plomb et du mercure obtenus par greffage en masse. Ceci serait probablement dû à une réticulation du copolymère PS-b-PAA lors de l'étape du greffage de l'éthylène diamine. Cette hypothèse de réticulation inter-chaine pourrait être mise évidence par une analyse en RMN du solide.

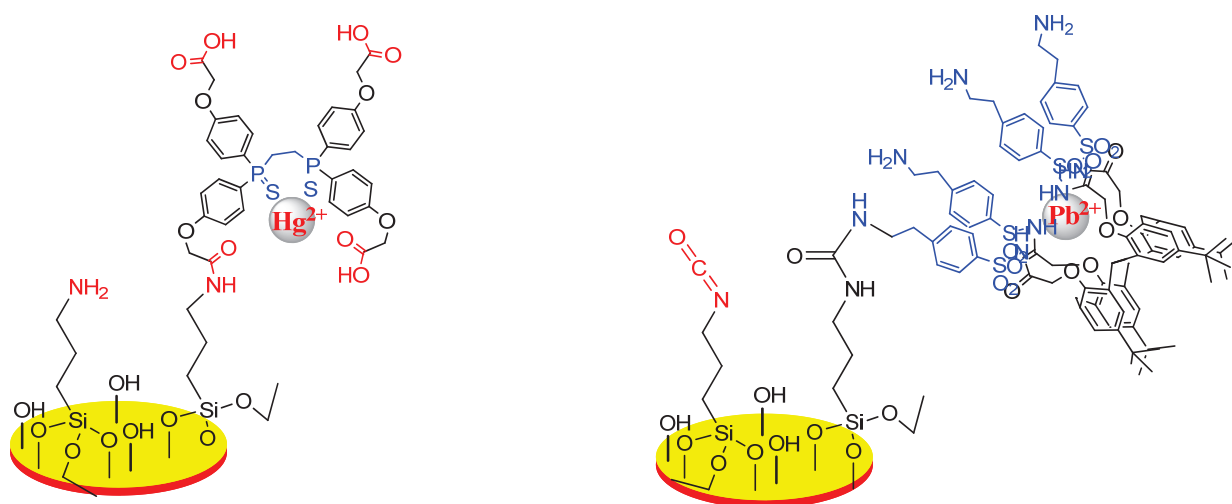
Pour valoriser ce travail, afin de déterminer des quantités très faibles de plomb et de mercure dans des solutions très diluées, nous comptons utiliser les composés poreux pour la détection du plomb et du mercure comme préconcentrateurs de métaux lourds couplés à la détection par fluorescence. Cette technique consiste à placer ces polymères dans une mini-colonne. Les solutions à doser contenant des quantités très faibles de métaux lourds seront concentrées à travers la mini-colonne. Le métal complexé par le ligand sera ensuite décomplexé en utilisant un ligand compélétif ou un milieu acide (Schéma V-42).



*Schéma V-42 : Principe de l'utilisation des composés poreux pour la détection du mercure et du plomb comme préconcentrateurs de cations.*

Dans la deuxième partie du travail qui consiste à fonctionnaliser la surface du PMMA, nous avons travaillé sur deux approches. La première consiste à fonctionnaliser le PMMA après activation sous plasma  $O_2$  et la deuxième consiste à faire un dépôt par « dip-coating » d'une fine couche du copolymère boc PHEMA-b-PMMA. Une étude comparative du taux de fonctionnalisation du mercaptopropyltriéthoxysilane sur ces polymères montre un meilleur taux de greffage avec le PHEMA-b-PMMA. Une variation de l'indice de réfraction du milieu de 0,059 nm est obtenue en faisant circuler une solution d'ion  $Hg^{2+}$  à  $10^{-6}$  M. La réversibilité du système est obtenue en faisant circuler de l'eau en le dispositif microfluidique.

Dans la continuité de ce projet de détection des métaux lourds par microcavités laser, il sera intéressant d'étudier le comportement des microcavités fonctionnalisées par les ligands spécifiques synthétisés pour la détection du mercure et du plomb (Schéma V-43). Cette approche permettrait d'avoir des systèmes de détection très sensibles et sélectifs du mercure et du plomb.



*Schéma V-43 : Ligands spécifiques pour la détection du mercure et du plomb greffés sur la surface des microcavités PHEMA-b-PMMA.*

La dernière partie du travail consistait à développer une nouvelle approche de fabrication de microcavités laser par polymérisation à deux photons (2PP). Nous avons réussi à synthétiser



deux nouveaux composés fluorescents à base de pyrrométhène : le premier est greffé sur le groupement isocyanate d'un acrylate ; ceci constitue un monomère polymérisable par 2PP. Le second est le produit de saponification du pyrrométhène 605 qui peut être avec un sol-gel. Les premiers résultats obtenus par polymérisation 2PP sont très encourageants ; la structure des microcavités obtenues présente de belles qualités optiques. L'adhésion du sol-gel sur le substrat de verre est en train d'être optimisée par nos collègues du Laser Zentrum de Hanovre (LZH). Si ce problème est résolu, une nouvelle méthode de fabrication des microcavités laser pourra être proposée.

## Références bibliographiques

- 1 M. Lebental, J. S. Lauret, J. Zyss, C. Schmit, E. Bogomolny "Directional emission of stadium-shaped microlaser." Phys. Rev. A **2007** (75), 033806.
- 2 M. Lebental, J. S. Lauret, R. Hierle, J. Zyss. "Highly directional stadium-shaped polymer microlaser." Appl. Phys. Lett. **2006** (88), 031108-3.
- 3 T. Vilknér, D. Janasek, Vilknér, A. Manz "Micro Total Analysis Systems. Recent Developments." Anal. Chem. **2004** (76), 3373-3386.
- 4 C. Monat, P. Domachuk, B. Eggleton "Integrated optofluidics: A new river of light." Nat. Photon. **2007** (1), 106-114.
- 5 Q. Xu, B. Schmidt, S. Pradhan, M. Lipson. "Micrometre-scale silicon electro-optic modulator." Nature **2005** (435), 325-327.
- 6 W. Fang, H. Cao "Wave interference effect on polymer microstadium laser." Appl. Phys. Lett. **2007** (91), 041108-3.
- 7 M. Kneissl, M. Teepe, N. Miyashita, N.M. Johnson, G.D. Chern, R.K. Chang, "Current-injection spiral-shaped microcavity disk laser diodes with unidirectional emission." Appl. Phys. Lett. **2004** (84), 2485-2487.
- 8 T. Oishi, M. Goto, Y. Pihosh, A. Kasahara, M. Tosa, "Silicon microstructure fabricated by laser micro-patterning method combined with wet etching process." Appl. Surf. Sci. **2005** (241), 223-226.
- 9 L. Zhao-Pei, L. Yan, X. Yun-Feng, L. Bei-Bei, J. Xue-Feng, Q. Yi, F. Xiao-Bo, Y. Hong, G. Qihuang, "Direct laser writing of whispering gallery microcavities by two-photon polymerization." Appl. Phys. Lett. **2010** (97), 211105.
- 10 A.M. Armani, K.J. Vahala "Heavy water detection using ultra-high-Q microcavities." Opt. Lett. **2006** (31), 1896-1898.
- 11 C.Y. Chao, L.J. Guo "Biochemical sensors based on polymer microrings with sharp asymmetrical resonance." Appl. Phys. Lett. **2003** (83), 1527-1529,.
- 12 M. Lebental "Vers le contrôle géométrique de l'émission de microcavités laser à base de polymères" thèse ENS Cachan 2007
- 13 M.H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly Selective and Sensitive Phosphane Sulfide Derivative for the Detection of  $Hg^{2+}$  in an Organoaqueous Medium." Org. Lett. **2007** (9), 1133-1136.
- 14 Directive 2008/105/CE du parlement européens et du Conseil du 16 Décembre 2008, "Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants ", Journal Officiel de l'union Européenne L 348/92, **2008**.
- 15 M.H. Ha-Thi, M. Penhoat, V. Michelet, I. Leray "Highly selective and sensitive  $Hg^{2+}$  fluorescent sensors based on a phosphane sulfide derivative", Org. Biomol. Chem. **2009** (7), 1665-1673.
- 16 R. Hirschmann, L. Ducry, A.B. Smith "Development of an Efficient, Regio- and Stereoselective Route to Libraries Based on the  $\beta$ -D-Glucose Scaffold", J. Org. Chem. **2000** (65), 8307-8316.

- 17 B.E. Blass, C.L. Harris, D.E. Portlock "A facile, selective  $KF/Al_2O_3$  mediated method for the deprotection of aryl silyl ethers and preparation of aryl SEM ethers", Tet. Lett. **2001** (42), 1611-1613.
- 18 Z.Y. Jiang, Y.G. Wang "A mild, efficient and selective deprotection of *t*-butyldimethylsilyl-protected phenols using cesium carbonate", Tet. Lett. **2003** (44), 3859-3861.
- 19 D. Zhang, X. Cao, D.W. Purkiss, R.A. Bartsch "Di-ionizable *p*-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-3 ligands in cone and 1,2-alternate conformations: synthesis and metal ion extraction", Org. Biomol. Chem. **2007** (8), 1251-1259.
- 20 G.G. Talanova, H.S. Hwang; V.S Talanov, R.A Bartsch "Calix 4 arenes with a novel proton-ionizable group: synthesis and metal ion separations", Chem. Commun. **1998** (3), 419-420.
- 21 I. Leray, B. Valeur "Calixarene-Based Fluorescent Molecular Sensors for Toxic Metals." Eur. J. Inorg. Chem. **2009** (24), 3525-3535.
- 22 R. Métivier, I. Leray, B. Valeur "Photophysics of calixarenes bearing two or four dansyl fluorophores: charge, proton and energy transfers", Photochem. Photobiol. Sci. **2004** (3), 374-380.
- 23 Y. Vilaivan "A rate enhancement of tert-butoxycarbonylation of aromatic amines with Boc<sub>2</sub>O in alcoholic solvents", Tet. Lett. **2006** (47), 6739-6742.
- 24 A.J. Tong, Y.S. Song, L.D. Li, T. Hayashita, N. Teramae, C. Park, R.A. Bartsch "Selective extraction of alkali metal cations with proton-ionizable dibenzo-16-crown-5 fluoroionophores", Anal. Chim. Acta **2000** (420), 57-64.
- 25 B. Li, M. Berliner, R. Buzon, C.K.F. Chiu, S.T. Colgan, T. Kaneko, N. Keene, W. Kissel, T.Z. Le, K.R. Leeman, B. Marquez, R. Morris, L. Newell, S. Wunderwald, M. Witt, J. Weaver, Z. Zhang "Aqueous Phosphoric Acid as a Mild Reagent for Deprotection of tert-Butyl Carbamates, Esters, and Ethers", J. Org. Chem. **2006** (71), 9045-9050.
- 26 R. Metivier, I. Leray, B. Lebeau, B. Valeur "A mesoporous silica functionalized by a covalently bound calixarene-based fluoroionophore for selective optical sensing of mercury(II) in water." J. Mat. Chem. **2005** (15), 2965-2973.
- 27 J. Kowalonek, K. Suchocka-Galas. "Surface properties of ionomers based on styrene-*b*-acrylic acid copolymers obtained by copolymerization in emulsion", Appl. Surf. Sci. **2009** (255), 9159-9165.
- 28 J. Kowalonek, K. Suchocka-Galas. "Surface properties of ionomers based on styrene-*b*-acrylic acid copolymers obtained by copolymerization in emulsion" Appl. Surf. Sci. **2009** (255), 9159-9165.
- 29 D.G. Bucknall, H.L. Anderson, "Polymers Get Organized". Science **2003** (302) 1904-1905.
- 30 A.M. Nyström, K.L. Wooley "Thiol-functionalized shell crosslinked knedel-like (SCK) nanoparticles: a versatile entry for their conjugation with biomacromolecules." Tetrahedron **2008** (64), 8543-8552.
- 31 S.P. Cullen, X. Liu, I.C Mandel, F.J Himpfel, P. Gopalan "Polymeric Brushes as Functional Templates for Immobilizing Ribonuclease A: Study of Binding Kinetics and Activity." Langmuir **2007** (24), 913-920.

- 32 L. Locascio-Brown, A.L. Plant, R.A. Durst, R.M. VBrizgys "Radiometric and fluorimetric determination of aminosilanes and protein covalently bound to thermally pretreated glass substrates", *Anal. Chim. Acta*, **1990** (228), 107-116.
- 33 F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.B.V. Christensen "Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays", *Nuc. Acids Res.* **2004** (32), e9.
- 34 S. Wei, B. Vaidya, A.B. Patel, S.A. Soper, R.L. McCarley "Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices." *J. Phys. Chem. B* **2005** (109), 16988-16996.
- 35 Y. Wang, B. Vaidya, H.D. Farquar, W. Stryjewski, R.P. Hammer, R.L. McCarley, S.A. Soper, Y.W. Cheng, F. Barany "Microarrays Assembled in Microfluidic Chips Fabricated from Poly(methyl methacrylate) for the Detection of Low-Abundant DNA Mutations", *Anal. Chem.* **2003** (75), 1130-1140.
- 36 J.H. Boyer, A.M. Haag, G. Sathyamoorthi, M.L. Soong, K. Thangaraj, "Pyromethene-BF<sub>2</sub> Complexes as Laser Dyes", *Heteroatom. Chem.* **1993** (4), 39.
- 37 L. Porrès, O. Mongin, O. Blanchard-Desce "Synthesis, fluorescence and two-photon absorption properties of multichromophoric boron-dipyromethene fluorophores for two-photon-excited fluorescence applications." *Tet. Lett.* **2006** (47), 1913-1917.
- 38 K. Yagi, S. Shibata, T. Yano, A. Yasumori, M. Yamane, B. Dunn "Photostability of the laser dye DCM in various inorganic-organic host matrices" *J. Sol-Gel Sci. Techn.* **1995** (4), 67-73.
- 39 R.F. Kubin, A.N. Fletcher. "Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes" *J. Lumin.* **1982**, (27), 455.
- 40 D. Magde, R. Wong, P.G. Seybold "Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields", *Photochem. Photobiol.* **2002** (75), 327-334.
- 41 R. Dubertrand, E. Bogomolny, N. Djellali, M. Lebental, C. Schmit, "Circular dielectric cavity and its deformations". *Phys. Rev. A*, **2008** (77), 013804; 2008.
- 42 T.M. Long, S. Prakash, M.A. Shannon, J.S. Moore "Water-Vapor Plasma-Based Surface Activation for Trichlorosilane Modification of PMMA", *Langmuir* **2006** (22), 4104-4109.
- 43 M.R. Tomlinson, J. Genzer "Evolution of Surface Morphologies in Multivariant Assemblies of Surface-Tethered Diblock Copolymers after Selective Solvent Treatment". *Langmuir* **2005** (21), 11552-11555.
- 44 D. Yin, S. Horiuchi, T. Masuoka. "Lateral assembly of metal nanoparticles directed by nanodomain control in block copolymer thin films". *Chem. mat.* **2005** (17), 463-469, 2005
- 45 S.P. Cullen, X. Liu, I.C. Mandel, F.J. Himpel, P. Gopalan "Polymeric brushes as functional templates for immobilizing ribonuclease a: Study of binding kinetics and activity", *Langmuir* **2007** (24), 913-920.
- 46 S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. Soper, D. Spivak, "Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications", *Anal. Bioanal. Chem.* **2008** (390), 1009-1021.

- 47 J.V. Ros-Lis, R. Casasú, M. Comes, C. Coll, M.D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, P. Amorós, J.E. Haskouri, N. Garró, K. Rurack "A mesoporous 3D hybrid material with dual functionality for  $Hg^{2+}$  detection and adsorption." *Chem-A Eur. J.* **2008** (14), 8267-8278.
- 48 F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C.B.V. Christensen, "Functionalization of poly(methyl methacrylate) (pmma) as a substrate for DNA microarrays" *Nuc. Acids Res.* **2004** (32), e9.
- 49 A.M. Nyström, K.L. Wooley, "Thiol-functionalized shell crosslinked knedel-like (sck) nanoparticles: A versatile entry for their conjugation with biomacromolecules", *Tetrahedron* **2008** (64), 8543-8552.
- 50 T.M. Long, S. Prakash, M.A. Shannon, J.S. Moore "Water-vapor plasma-based surface activation for trichlorosilane modification of PMMA" *Langmuir*, **2006** (22), 4104-4109.
- 51 A. Zinellu, C. Carru, F. Galistu, M.F. Usai, G.M. Pes, G. Baggio, G. Federici, G. Deiana. "N-Methyl-D-glucamine improves the laser-induced fluorescence capillary electrophoresis performance in the total plasma thiols measurement." *Electrophoresis* **2003** (24), 2796-2804.
- 52 C. Carru, L. Deiana, S. Sotgia, G.M. Pes, A. Zinellu "Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, **2004** (25), 882-889.
- 53 W. Tröger "Hg(II) Coordination Studies in Penicillamine Enantiomers by 199 mHg-TDPAC", *Hyperfine Interact.* **2001** (136-137), 673-680.
- 54 R. Osellame, V. Maselli, R. Martinez Vazquez, R. Ramponi, G. Cerullo, "Integration of optical waveguides and microfluidic channels both fabricated by femtosecond laser irradiation", *Appl. Phys. Lett.* **2007** (90), 231118.
- 55 A. Ovsianikov, J. Viertl, B. Chichkov, M. Oubaha, B. MacCraith, I. Sakellari, A. Giakoumaki, D. Gray, M. Vamvakaki, M. Farsari, C. Fotakis, C "Ultra-Low Shrinkage Hybrid Photosensitive Material for Two-Photon Polymerization Microfabrication". *Laser Chem.* **2008** (2), 2257-2262.
- 56 F. Amat-Guerri, M. Liras, M. Luisa Carrascoso, R. Sastre "Methacrylate-tethered Analogs of the Laser Dye PM567-Synthesis, Copolymerization with Methyl Methacrylate and Photostability of the Copolymers", *Photochem. Photobiol.* **2003** (77), 577-584.
- 57 P. Oleynik, Y. Ishihara, G. Cosa "Design and Synthesis of a BODIPY- $\hat{I}$ -Tocopherol Adduct for Use as an Off/On Fluorescent Antioxidant Indicator", *J. Am. Chem. Soc.* **2007** (129), 1842-1843.
- 58 H.Y. Lee, D.R. Bae, J.C. Park, H. Song, W.S. Han, J.H. Jung "A Selective Fluoroionophore Based on BODIPY-functionalized Magnetic Silica Nanoparticles: Removal of  $Pb^{2+}$  from Human Blood". *Angew. Chem.* **2009** (121), 1265-1269.
- 59 C. Croutxé-Barghorn, O. Soppera, C. Carréet "Real time study of hybrid sol-gel photopolymerization by UV light". *J.Sol-Gel Sci and Tech* **2007** (41): 93-97.
- 60 A. Ovsianikov, J. Viertl, B. Chichkov, M. Oubaha, B. MacCraith, I. Sakellari, A. Giakoumaki, D. Gray, M. Vamvakaki, M. Farsari, C. Fotakis. "Ultra-Low Shrinkage Hybrid Photosensitive Material for Two-Photon Polymerization Microfabrication". *ACS Nano* **2008** (2): 2257-2262.
- 61 O. Soppera, C. Croutxe-Barghorn, D.J. Lougnot "New insights into photoinduced processes in hybrid sol-gel glasses containing modified titanium alkoxides". *New J.Chem* **2001** (25), 1006-1014.



**Conclusion Générale et  
Perspectives**



# Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif principal de ce travail était la mise au point de nouvelles méthodes permettant la détection sélective de très faibles quantités de plomb, de mercure et de cadmium dans les eaux de consommation et de surface. Deux approches de détection de ces cations toxiques en circuit microfluidique ont été développées ; la première est basée sur la fluorescence et la deuxième consiste à utiliser des microcavités laser organiques.

## La détection par fluorescence

Une première partie du travail a consisté en l'étude de la détection du cadmium à partir du composé commercial le Rhod-5N. De très faibles quantités de cadmium sont détectées en circuit microfluidique ( $0,45 \mu\text{g/L}$ ) ; cette valeur est inférieure à la valeur maximale actuelle admissible dans les eaux de consommation en Europe ( $5 \mu\text{g/L}$ ). Des études de complexation du cadmium en circuit long et court ont montré une cinétique de complexation très rapide. Cependant, le plomb reste le principal cation interférent. Afin de faire du Rhod-5N une sonde spécifique pour la détection des ions  $\text{Cd}^{2+}$ , nous avons étudié la possibilité de discrimination des ions  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  par préconcentration. La silice fonctionnalisée par l'aminopropyltriéthoxysilane ( $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ ) incorporée dans une mini-colonne capillaire est utilisée. Les premiers résultats obtenus sur l'adsorption sélective des ions  $\text{Pb}^{2+}$  sur la  $\text{SiO}_2\text{-APTES}$  sont très encourageants.

Pour la détection du mercure en milieu aqueux, nous avons synthétisé un ligand chélatant à base de sulfure de phosphine (DPPS-PEG). Afin d'augmenter la solubilité du ligand, celui-ci est fonctionnalisé par des groupements polyéthylène glycols. L'étape clé de la synthèse de nos composés à base de sulfure de phosphine est la réaction de couplage de Sonogashira. Une première partie du travail a consisté à partir de composés modèles. Deux composés modèles ont été synthétisés ; le premier est substitué par trois groupements polyéthylène glycols (PS-3PEG) et le deuxième par un seul groupement polyéthylène glycol (PS-PEG). Le composé PS-3PEG est très soluble en milieu aqueux; cependant, le spectre d'absorption obtenu ne permet pas d'utiliser une LED excitatrice à 365 nm en circuit microfluidique contrairement au PS-PEG soluble dans un mélange de solvants  $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$  60 : 40. Les études de complexation des ions  $\text{Hg}^{2+}$  par le DPPS-PEG en solution ont révélé une très bonne sensibilité. Une limite de détection de  $0,27 \mu\text{g/L}$  est obtenue. Cette valeur reste inférieure à celle obtenue à partir de son analogue DPPSI synthétisé au laboratoire pour la détection des ions  $\text{Hg}^{2+}$  ( $0,75 \mu\text{g/L}$  voir chapitre III). Comme dans le cas du Rhod-5N, dans le but d'élaborer un dispositif portable pour la détection des ions  $\text{Hg}^{2+}$ , le DPPS-PEG est incorporé dans le dispositif microfluidique. Les premiers résultats obtenus sont très encourageants. Aucune dégradation significative de la sonde dans le dispositif microfluidique n'est observée et une très bonne complexation des ions  $\text{Hg}^{2+}$  est aussi mise en évidence. La courbe de calibration obtenue présente la même allure que celle obtenue en solution. La limite de



détection obtenue est de l'ordre de 1  $\mu\text{g/L}$ . Cette limite est quatre fois supérieure à celle déterminée en cuve au spectrofluorimètre, mais la méthode qui utilise la microfluidique présente un certain nombre d'avantages qui rendent ce résultat tout de même très intéressant.

En ce qui concerne le ligand pour la détection des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , nous avons travaillé sur une nouvelle approche qui consiste à fonctionnaliser le ligand spécifique dans le canal du circuit microfluidique. Afin de voir la faisabilité de cette nouvelle approche, nous avons d'abord synthétisé le composé modèle DANS-1-OH. Celui-ci est ensuite greffé dans le canal du circuit microfluidique. Les conditions de détection sont optimisées en étudiant la variation de l'intensité de fluorescence du DANS-1-OH en fonction du pH. Nous nous sommes aussi intéressés à la synthèse du ligand spécifique des ions  $\text{Pb}^{2+}$  : le CalixDANS-3-OH. Celui-ci est un analogue du CalixDANS-4 synthétisé au laboratoire comme un bon complexant des ions  $\text{Pb}^{2+}$ . Des études de complexation de  $\text{Pb}^{2+}$  en solution à pH = 3 puis pH = 5 ont montré une très bonne sensibilité. Une limite de détection de 10,35  $\mu\text{g/L}$  est obtenue, cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le CalixDANS-4 (4,2  $\mu\text{g/L}$ ). Cette différence de sensibilité nous permet de supposer que quatre groupements dansyles amides participeraient à la complexation des ions  $\text{Pb}^{2+}$ . Nous avons étudié la complexation des ions  $\text{Pb}^{2+}$  à partir du CalixDans-3-OH greffé dans le canal du circuit microfluidique. Malgré une photo-dégradation du CalixDANS-3-OH dans le circuit microfluidique, nous avons pu détecter des concentrations d'ions  $\text{Pb}^{2+}$  allant jusqu'à l'ordre 42  $\mu\text{g/L}$ . Aucune interférence des cations testés n'est observée dans le dispositif microfluidique. Pour continuer sur cette approche innovante de détection des ions  $\text{Pb}^{2+}$ , c'est-à-dire accroître la sensibilité, on pourrait greffer un groupement fonctionnel en dessous du CalixDANS-4. Par ailleurs, en greffant des ligands spécifiques excitables à des longueurs d'ondes différentes sur le canal du circuit microfluidique, on pourrait détecter simultanément plusieurs cations toxiques.

### La détection par microcavités laser

Cette stratégie est un nouveau concept de détection des métaux lourds. Nous nous sommes d'abord intéressés à la synthèse des ligands spécifiques pour la détection des ions mercure et plomb. Ces ligands possèdent la même entité complexante que leurs analogues fluorescents, CalixDANS-4 et DPPSI étudiés au laboratoire respectivement pour la détection des ions  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$ .

Afin d'obtenir des microcavités laser très sensibles à l'indice de réfraction du milieu, notre choix s'est porté sur le copolymère bloc PS-b-PAA. Celui-ci est constitué d'une séquence hydrophile (acide polyacrylique) et une séquence hydrophobe (polystyrène) capable de séquestrer le colorant laser sans le relarguer dans le milieu. Des tests de stabilité des colorants laser pyrrométhène 605, DCM et Rhodamine 640 dans la matrice du copolymère bloc PS-b-PAA ont permis choisir le pyrrométhène 605. Une preuve de principe de la sensibilité de la microcavité laser PS-b-PAA dopée avec 5 % de pyrrométhène à l'indice de réfraction du milieu (eau puis solution de glucose) est obtenue. Les ligands spécifiques de mercure et de plomb ont été ensuite

## Conclusion Générale et Perspectives

---

greffés sur le copolymère bloc PS-b-PAA. Les films des composés poreux pour la détection du mercure et du plomb dopés avec 5 % de pyrrométhène ne présentent pas de bonnes qualités optiques permettant la fabrication des microcavités. On observe principalement des zones d'agrégation au microscope optique, ce qui laisse supposer une réticulation partielle du copolymère PS-b-PAA pendant l'étape de réaction avec de l'éthylène diamine.

Pour valoriser notre travail effectué sur la détection du plomb et mercure par microcavités laser à partir du copolymère bloc PS-b-PAA, nous comptons utiliser les composés poreux synthétisés pour la détection des ions  $Pb^{2+}$  et  $Hg^{2+}$  comme préconcentrateurs de cations (voir la stratégie sur le schéma V-42 à la conclusion du chapitre V). Ceci permettrait de détecter de faibles concentrations de plomb et de mercure contenues dans des solutions aqueuses très diluées.

Nous avons travaillé sur une nouvelle voie qui consiste à fonctionnaliser les ligands spécifiques des ions  $Pb^{2+}$  et  $Hg^{2+}$  à la surface des microcavités PMMA dopées avec du DCM. En effet, ces microcavités PMMA présentent de bonnes qualités optiques. Pour fonctionnaliser les ligands à la surface du PMMA, deux stratégies ont été développées. La première a consisté à activer la surface du PMMA par traitement sous plasma  $O_2$ , la deuxième a consisté à déposer une fine couche de copolymère bloc PHEMA-b-PMMA par « dip-coating » sur la surface des microcavités PMMA. Dans les deux cas, les groupements OH libres à la surface sont fonctionnalisés avec le mercaptopropyltriéthoxysilane. Une étude comparative du taux de fonctionnalisation a été effectuée en greffant la 5-IAF, un composé fluorescent utilisé pour quantifier les groupements thiols. Celle-ci a montré une meilleure fonctionnalisation par dépôt d'une fine couche du copolymère bloc PHEMA-b-PMMA. Il faut également signaler que, dans les deux cas de fonctionnalisation, la qualité optique des microcavités PMMA n'est pas modifiée. Une preuve de principe de la détection des ions  $Hg^{2+}$  par microcavités laser a été obtenue en incorporant le PHEMA-b-PMMA fonctionnalisé avec le mercaptopropyltriéthoxysilane dans le dispositif microfluidique. Une variation de l'indice de réfraction du milieu de 0,059 nm est obtenue en faisant circuler une solution d'ion  $Hg^{2+}$  à  $10^{-6}$  M. La sensibilité de cette nouvelle méthode est encore modeste et moins bonne que celle qui est atteinte pour la détection du mercure par l'utilisation d'une sonde fluorescente dans un dispositif microfluidique. Cependant, cette technique est nouvelle ; elle peut être améliorée du point de vue technique en améliorant la méthode de détection et aussi du point de vue chimique en changeant la nature des ligands. Ainsi, nous comptons fonctionnaliser nos ligands spécifiques de mercure et de plomb à la surface des microcavités PMMA.

Pour répondre aux normes Européennes prévues en 2018 sur la qualité des eaux de consommation et de surface, il serait intéressant de synthétiser de nouvelles générations de sonde spécifiques à la détection des ions  $Pb^{2+}$ ,  $Hb^{2+}$  et  $Cb^{2+}$ .





# Partie expérimentale



# Experimental procedure

## Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| Sommaire.....  | 201 |
| I. General procedures.....   | 202 |
| II. Chapitre III: Synthesis of mercury ligand.....   | 202 |
| II.1. Model compound for mercury detection: PS-3PEG.....   | 202 |
| II.2. Model compound for mercury detection: PS-PEG.....  | 208 |
| II.3. Mercury ligand DPPS-PEG.....   | 211 |
| III. Chapitre IV: Ligand for lead ion detection CalixDans3-OH.....   | 214 |
| III.1. Model compound for lead ion detection: DANS-1-OH.....   | 214 |
| III.2. Synthesis of lead ion ligand: Calix-DANS-3-OH.....  | 216 |
| IV. Chapter V: Ligands for Hg <sup>2+</sup> and Pb <sup>2+</sup> detection by microlaser.....                  | 221 |
| IV.1. Synthesis of mercury ligand.....   | 221 |
| IV.2. Synthesis of lead ion ligand.....  | 225 |
| V. Chapter V: Porous material for mercury and lead detection.....  | 230 |
| V.1. Synthesis of the bodipy derivatives.....  | 230 |
| V.2. Modification of poly(styrene-b-acrylic acid).....   | 231 |
| V.3. Porous material for mercury detection 131.....  | 234 |
| V.4. Porous material for lead detection 132.....   | 235 |
| VI. Protocol for the determination of stability constants of the complex of fluoroionophore and metal ion..... | 236 |
| VII. Protocol for the fabrication of microchips for lead, mercury and cadmium detection.....                   | 237 |
| VII.1. Materials and equipments.....   | 237 |
| VII.2. Fabrication of bilayered microchannel mold.....   | 237 |
| VII.3. Replica of PDMS chip and embedded optical fiber.....  | 239 |
| VII.4. Amplified spontaneous emission (ASE).....   | 240 |

# I. General procedures

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectra were recorded at room temperature on a JEOL JNM ECS 400 MHz spectrometer using tetramethylsilane as reference; chemical shifts were reported in ppm, coupling constants in Hz.

Elemental analyses were performed at the Institut de Chimie des Substances Naturelles ( Gif sur Yvette France); mass spectra were performed at IMAGIF institute (Gif sur Yvette, France).

Melting points were determined on a KOFLER apparatus and are uncorrected.

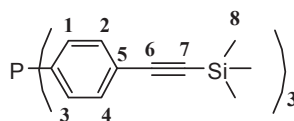
All chemicals were of reagent grade and were used without further purification unless otherwise noted. Toluene, tetrahydrofuran (THF), dichloromethane and acetonitrile, received from Aldrich or SDS, were purified by passing through an activated alumina purification system (MBraun sps-800). Dimethylformamide (DMF) and methanol were dried on molecular sieves. Other solvents were used as received.

Column chromatographies were performed using puriFlash<sup>®</sup> (Interchim) or Spot 2 Flash System (ARMEN) with prepacked column Septra Si 50-60Å. TLC chromatographies were performed using silica gel 60 F250 plates (SDS), detection by UV (254 nm and 365 nm).

## II.Chapitre III: Synthesis of mercury ligand

### II.1. Model compound for mercury detection: PS-3PEG

#### Tris-[4-(trimethylsilylethynyl)-phenyl]-phosphane 64



$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{PSi}$   
 $M = 204,05 \text{ g/mol}$   
white solide

To a solution of activated magnesium (1 g, 41.67 mmol, 1.1 eq) in anhydrous tetrahydrofurane (12 mL) was canulated a solution of 4-bromophenylacetylene-trimethylsilane (9.59 g, 37.87 mmol, 1 eq) in anhydrous tetrahydrofurane (20 mL). The resulting solution was refluxed for 1 hour, and then cooled to room temperature. Phosphorus trichloride (1.2 mL, 13.75 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred at room temperature for 2 hours, quenched with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution, extracted with diethyl ether. The combined organic phases

were dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/dichlorométhane 99:1) to give 2.3 g of compound **64** as a white solid (30 %).

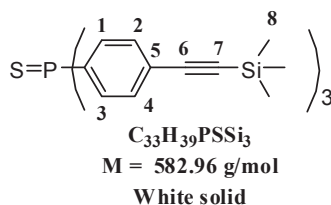
**F:** 180 - 183°C

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm) = 0.25 (s, 27H, H-8), 7.17 (d-d,  $J = 7,6$  Hz, 6H, H-1, H-3), 7.40 (m, 6H, H-2, H-4)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm) = 0.0 ( $\text{CH}_3$ , C-8), 95.9 (Cq, C-7), 104.5 (Cq, C-8), 123.8 (Cq, C-P.), 132.0 (CH, C-1, C-3), 132.4 (CH, C-2, C-4), 137.0 (Cq, C-5).

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz):  $\delta$  (ppm) = -5.2

### Tri-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)phosphane sulfide **65**



To a solution of tri-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)phosphane **64** (500 mg, 0.91 mmol) in anhydrous toluene (20 mL) under argon was added quickly  $\text{S}_8$  (29.1 mg, 0.91 mmol). The resulting mixture was stirred at 95°C for 6 hours, then cooled to room temperature and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/dichloromethane 1:1) to give 530 mg of a white solid (100 %).

**F:** 195-197 °C

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm) = 0.26 (s, 27H, H-8), 7.63-7.48 (m, 12H, H-1, H-3, H-2, H-4).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm) = 0.0 ( $\text{CH}_3$ , C-8), 98.1 (Cq, C-7), 103.8 (Cq, C-6), 127.0 (CH, C-1, C-3), 132.0 (CH, C-2, C-4), 132.2 (Cq, C-5), 132.4 (Cq, C-P).

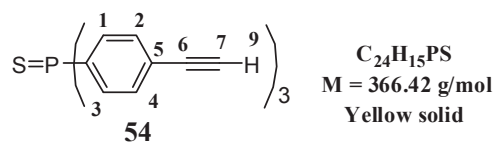
$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz),  $\delta$  (ppm) = 42.6.

**MS** (CI,  $\text{NH}_3$ ):  $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{PSSi}_3$ ,  $m/z$ : 583  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**ES HRMS**:  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{PSSi}_3$ : 605.1716; found: 605.1763  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### Tri-(4-ethynyl-phenyl)phosphane sulfide **54**





To a solution of tri-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)phosphane sulphide **65** (99.7 mg, 0.171 mmol) in a mixture of dichloromethane (2 mL) and methanol (2 mL) was added potassium carbonate (23.6 mg, 0.171 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 hour quenched with water and then extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried ( $MgSO_4$ ), filtered and then concentrated under reduced pressure to give 53 mg of an yellow solid (85 %).

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm) = 3.20 (s, 3H, H-9), 7.56-7.52 (m, 6H, H-1, H-3), 7.68-7.60 (m, 6H, H-2, H-4).

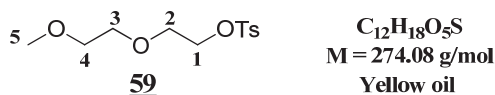
$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  (ppm) = 80.2 (CH, C-7), 82.4 ( $C_q$ , C-6), 126.3 ( $C_q$ , C-5), 132.0 (CH, C-2, C-4), 132.2 (CH, , C-1, C-3), 132.7 ( $C_q$ , C-P).

$^{31}P$  NMR ( $CDCl_3$ , 162 MHz),  $\delta$  (ppm) = 42.6.

MS (CI,  $NH_3$ ):  $C_{24}H_{15}PS$ ,  $m/z$ : 367  $[M+H]^+$

ES HRMS:  $m/z$ : calcd for  $C_{24}H_{15}PS$   $[M+H]^+$  367.0710, found: 367.0693.

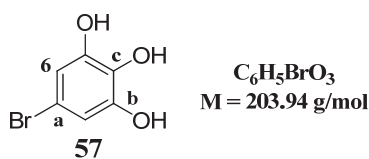
## 2-(2-methoxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **59**



6 g of 2-(2-methoxyethoxy)ethanol (49.94 mmol), 9.52 g of 4-methylbenzene-1-sulfonyl chloride (49.94 mmol) and 7.3 mL of triethylamine (52.43 mmol, 1.03 eq.) were dissolved in 250 mL of anhydrous dichloromethane under strong stirring at  $0^\circ C$ . After stirring for 20 hours at room temperature, the resulting mixture was acidified with 25 mL of HCl 0.1 M, then extracted with 3x50 mL of  $CH_2Cl_2$ . The combined organic phases were dried ( $MgSO_4$ ) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography ( $CH_2Cl_2$  then  $CH_2Cl_2$ /Acetone 90:10) to obtain 7.13 g (52 %) of yellow oil of **59**.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 2.45 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.35 (s, 3H, H-5); 3.47-3.49 (m, 2H, H-4); 3.57 (t,  $^3J_{3,4} = 4.6 \text{ Hz}$ , 2H, H-3); 3.69 (t,  $^3J_{2,1} = 5.0 \text{ Hz}$ , 2H, H-2); 4.17 (t,  $^3J_{1,2} = 5.0 \text{ Hz}$ , 2H, H-1); 7.35 (d,  $^3J = 8.7 \text{ Hz}$ , 2H, H-ar); 7.81 (d,  $^3J = 8.7 \text{ Hz}$ , 2H, H-ar).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 20.69 ( $CH_3$ ); 58.10 ( $CH_3$ , C-5); 67.76 ( $CH_2$ , C-1); 68.25 ( $CH_2$ , C-2); 69.73 ( $CH_2$ , C-3); 70.85 ( $CH_2$ , C-4); 127.04 (CH, Car); 128.86 (CH, Car); 134.00 ( $C_q$ , C-4); 144.43 ( $C_q$ , C-2); 132.01 ( $C_q$ , ); 143.84 ( $C_q$ ).

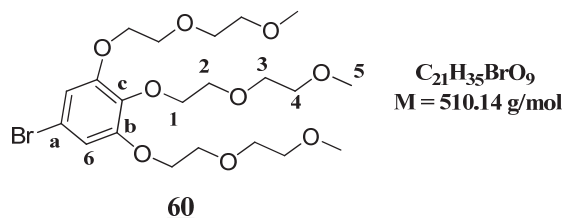
**5-bromobenzene-1,2,3-triol 57**

To a  $CH_2Cl_2$  solution (45 mL) of 3,4,5-trimethoxy-1-bromobenzene (4.00 g, 16.18 mmol), was added a  $CH_2Cl_2$  solution (60 mL) of  $BBr_3$  (1.0 M) at 0 °C under Argon; the mixture was stirred for 4 h at 0 °C and then 24 h at room temperature. The reaction mixture was poured into ice-water (40 mL) and stirred for 30 min. The separated organic phase was washed with saturated aqueous NaCl solution and water, dried over  $MgSO_4$  and evaporated to afford the corresponding **57** as a red solid (2.76 g, 83.5 %).

F: 136°C

$^1H$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 6.54 (s, 2H, H-6); 7.54 (s, OH-c); 8.22 (s, OH-b).

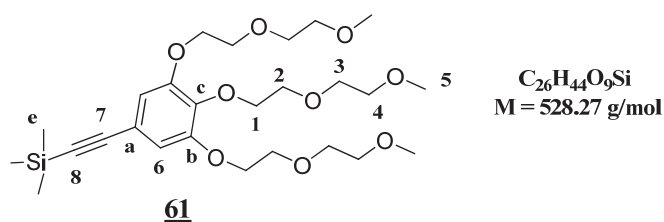
$^{13}C$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 110.41 (CH, C-6); 131.34-132.10 (Cq, C-b, C-c).

**5-bromo-1,2,3-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzene 60**

1-Bromo-3,4,5-trihydroxybenzene **57** (530 mg, 2.59 mmol, 1 eq.), 2-(2-methoxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **59** (3.35g, 10.39 mmol, 4 eq.), and powder  $K_2CO_3$  (2.86 g, 20.79 mmol, 8 eq.) were mixed in 16 mL of DMF. The mixture was heated at 80°C under argon atmosphere for 30 hours. After cooling, the mixture was poured into water and extracted by 3x50mL of AcOEt. The combined organic phases were dried ( $MgSO_4$ ) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude oil was purified by chromatography (AcOEt then  $CH_2Cl_2$ /EtOH 95:05) to afford the corresponding compound **60** as black oil 520 mg (25.5 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.39 (s, 9H, H-5); 3.51-3.57 (m, 6H, H-4); 3.67-3.72 (m, 6H, H-3); 3.80-3.86 (m, 6H, H-2); 4.11-4.17 (m, 6H, H-1); 6.73 (s, 2H, H-6).

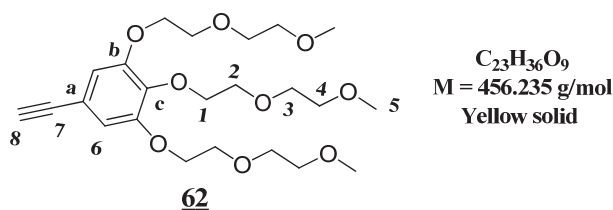
$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 58.25 ( $CH_3$ , C-5); 67.71 ( $CH_2$ , C-1); 68.17-71.42 ( $CH_2$ , C-1, C-2, C-3, C-4); 110.17 (CH, C-6); 151.91 (Cq, C-b, C-c).

**trimethyl((3,4,5-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)silane 61**

A Schlenk flask was charged with compound 60 (450 mg, 0.881 mmol, 1 eq) in 10 mL of distilled piperidine. The mixture was thoroughly degassed with argon. Trimethylsilylacetylene (129.79 mg, 1.32 mmol, 1.5 eq), CuI (8.37 mg, 0.044 mmol, 0.05 eq) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (20 mg, 0.0176 mmol, 0.02 eq) were then added and the mixture was stirred at 70°C for 24 h, then cooled to room temperature. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was filtered over celite, washed with water (150 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, a chromatography on silica gel with a gradient from 100 % cyclohexane to a 10:90 mixture Cyclohexane/AcOEt gave the desired compound 61 as a brown powder (345 mg, 74 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 0.19 (s, 9H, H-e); 3.33 (s, 9H, H-5); 3.48-3.51 (m, 6H, H-4); 3.63-3.67 (m, 6H, H-3); 3.78-3.82 (m, 6H, H-2); 4.09-4.12 (m, 6H, H-1); 6.65 (s, 2H, H-6).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 0.0 (CH<sub>3</sub>, C-e); 58.23 (CH<sub>3</sub>, C-5); 67.74 (CH<sub>2</sub>, C-1); 68.20-71.43 (CH<sub>2</sub>, C-1, C-2, C-3, C-4); 110.09 (CH, C-6); 151.91 (Cq, C-b, C-c).

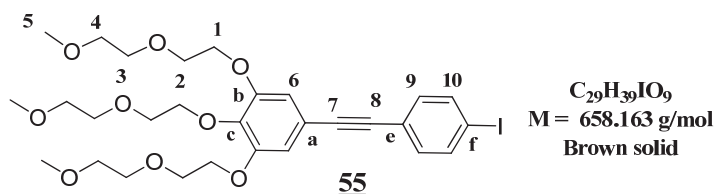
**5-ethynyl-1,2,3-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzene 62**

A solution of trimethyl((3,4,5-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)silane 61 (345 mg, 0.65 mmol, 1 eq) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (360 mg, 2.61 mmol, 4 eq) in a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) and MeOH (6 mL) was stirred at room temperature for 4 hours and quenched with water and then extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by chromatography (AcOEt then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) to afford the corresponding 62 as a yellow solid 170 mg (57 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 3.00 (s, 1H, H-8); 3.37 (s, 9H, H-5); 3.53-3.54 (m, 6H, H-4); 3.69-3.72 (m, 6H, H-3); 3.72 (m, 6H, H-2); 4.41 (m, 6H, H-1); 6.72 (s, 2H, H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 58.20 ( $\text{CH}_3$ , C-5); 67.76 ( $\text{CH}_2$ , C-1); 68.25-71.40 ( $\text{CH}_2$ , C-1, C-2, C-3, C-4); 110.06 ( $\text{CH}$ , C-6); 151.89 (Cq, C-b, C-c).

### 5-((4-iodophenyl)ethynyl)-1,2,3-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzene **55**

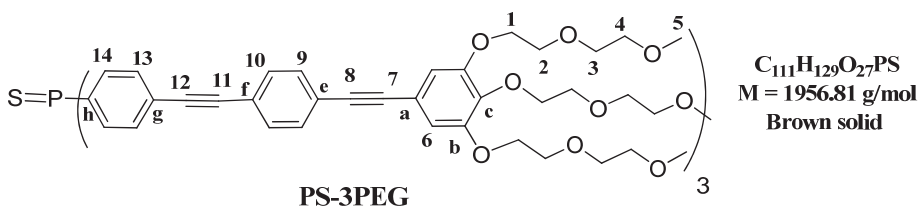


A Schlenk flask was charged with compound **62** (160 mg, 0.287 mmol, 1 eq),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (9.93 mg, 0.0086 mmol, 0.03 eq),  $\text{CuI}$  (3.27 mg, 0.0172 mmol, 0.06 eq) and 1,4-diiodobenzene (379.31 mg, 1.15 mmol, 4 eq) in a mixture of anhydrous toluene (5 mL) and distilled triethylamine (1 mL). The mixture was exhaustively degassed with argon and stirred at 80 °C overnight. The organic phase was filtered over celite, washed with water (20 mL) and dried over  $\text{MgSO}_4$ . After removal of the solvent, a chromatography on silica gel with a gradient from  $\text{AcOEt}$  to a 90:10 mixture  $\text{AcOEt}/\text{EtOH}$  gave the desired compound **55** as a brown solid (110 mg, 58 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.38 (s, 9H, H-5); 3.5-53.56 (m, 6H, H-4); 3.7-13.73 (m, 6H, H-3); 3.83-3.88 (s, 6H, H-2); 4.16-4.21 (m, 6H, H-1); 6.76 (s, 2H, H-6); 7.23 (d,  $^3J_{9-10} = 7.9$  Hz, 2H, H-9); 7.69 (d,  $^3J_{10-9} = 8.7$  Hz, 2H, H-10).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 58.20 ( $\text{CH}_3$ , C-5); 67.76 ( $\text{CH}_2$ , C-1); 68.25-71.40 ( $\text{CH}_2$ , C-1, C-2, C-3, C-4); 90.28-93.45 (Cq, C-8, C-7); 99.66 (Cq, C-f); 110.06 ( $\text{CH}$ , C-6); 128.53 ( $\text{CH}$ , C-9); 137.60 ( $\text{CH}$ , C-10); 151.89 (Cq, C-b, C-e).

### Tri-4-[ethyl 4-(4-di(phenylene ethynylene)-1,2,3-tris(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzene ]phosphane sulfide: **PS-3PEG**



A Schlenk flask was charged with compound **54** (5.56 mg, 0.015 mmol, 1 eq),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1.4 mg, 0.0012 mmol, 0.08 eq),  $\text{CuI}$  (1.15 mg, 0.006 mmol, 0.04 eq), and compound **55** (50 mg, 0.075 mmol, 5 eq) in a mixture of anhydrous toluene (1 mL) and distilled triethylamine (0.2 mL). The mixture was exhaustively degassed with argon and stirred at 80 °C for 34 h then cooled to room temperature. The organic phase was filtered over celite, washed with water (10 mL) and dried over

MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, a chromatography on silica gel with a gradient from cyclohexane to a 60:40 mixture cyclohexane/AcOEt gave the desired compound **PS-3PEG** as a brown solid (5 mg, 17 %).

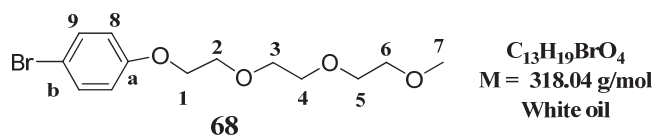
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 3.38 (s, 27H, H-5); 3.55-3.56 (m, 18H, H-4); 3.71-3.72 (m, 18H, H-3); 3.73-3.86 (m, 18H, H-2); 4.17-4.18 (m, 18H, H-1); 6.76 (s, 6H, H-6); 7.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-10</sub> = 8.2 Hz, 6H, H-9); 7.46-7.47 (m, 6H, H-13); 7.67-7.69 (12H, H-10, H-14).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 59.17 (CH<sub>3</sub>, C-5); 68.93 (CH<sub>2</sub>, C-1); 69.74 (CH<sub>2</sub>, C-2); 70.85 (CH<sub>2</sub>, C-3); 72.13 (CH<sub>2</sub>, C-4); 90.34.13 (CH, C-8, C-11, C-12); 94.20 (CH, C-7) 111.20 (CH, C-6); 118.33 (Cq, C-a); 122.81 (Cq, C-e, C-f, C-g); 128.53 (CH, C-9); 132.14 (CH, C-13); 137.60 (CH, C-10, C-14); 139.47 (Cq, C-c); 139.47 (Cq, C-b).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 43.9 (s, P=S).

## II.2. Model compound for mercury detection: PS-PEG

### 1-bromo-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxybenzene **68**

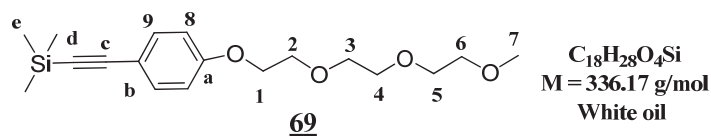


4-bromophenol (2.45 g, 14.13 mmol, 1.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.90g, 2.82 mmol, 3 eq.), 18-crown-6-ether (90 mg, 0.34 mmol, 0.025 eq.) in 20 mL DMF were stirred 30 mn at room temperature. 3 g (9.42 mmol, 1 eq.) of 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate were added and the mixture was heated at 60°C under argon atmosphere for 18 hours. After cooling, the mixture was poured into water and extracted by 3x100 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. The resulted crude oil was purified by chromatography (cyclohexane then cyclohexane/AcOEt 50:50) to afford the corresponding compound **68** as white oil 2.36 g (79 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 3.38 (s, 3H, H-7); 3.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 5.0 Hz, 2H, H-6); 3.64-3.74 (m, 6H, H-5, H-4, H-3); 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 4.6 Hz, 2H, H-2); 4.09 (t, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 4.8 Hz, 2H, H-1); 6.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-8); 7.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-9).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 58.10 (CH<sub>3</sub>, C-7); 67.73 (CH<sub>2</sub>, C-1); 69.72 (CH<sub>2</sub>, C-2); 70.60-70.92 (CH<sub>2</sub>, C-3, C-4, C-5); 72.00 (CH<sub>2</sub>, C-6); 112.77 (Cq, C-b); 116.51 (CH, C-8); 132.29 (CH, C-9); 157.84 (Cq, C-a).

### ((4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)trimethylsilane **69**

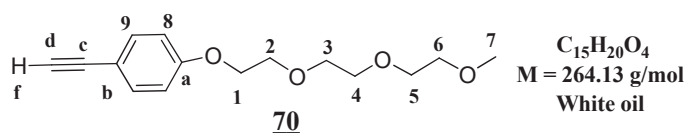


A Schlenk flask was charged with 1-bromo-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzene **68** (2.3 g, 7.23 mmol, 1 eq) in 10 mL of distilled piperidine. The mixture was thoroughly degassed with argon. Trimethylsilylacetylene (1.065 mg, 10.82 mmol, 1.5 eq), CuI (68.8 mg, 0.361 mmol, 0.05 eq) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (167.1 mg, 0.144 mmol, 0.02 eq) were then added and the mixture was stirred at 70°C for 24 h, then cooled to room temperature. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was filtered over celite, washed with water (150 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, a chromatography on silica gel with a gradient from 100 % cyclohexane to a 20:80 mixture Cyclohexane/AcOEt gave the desired compound **69** as white oil (1.98 g, 81.5 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 0.23 (s, 9H, H-e); 3.37 (s, 3H, H-7); 3.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 4.1 Hz, 2H, H-6); 3.63-3.71 (m, 6H, H-5, H-4, H-3); 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 5.5 Hz, 2H, H-2); 4.11 (t, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 5.5 Hz, 2H, H-1); 6.82 (d, J<sub>8-9</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-8); 7.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-1</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-9).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 19.4 (CH<sub>3</sub>, C-7); 59.21 (CH<sub>3</sub>, C-7); 67.87 (CH<sub>2</sub>, C-1); 69.90 (CH<sub>2</sub>, C-2); 70.71-70.97 (CH<sub>2</sub>, C-3, C-4, C-5); 72.12 (CH<sub>2</sub>, C-6); 83.76 (C-c, C-d); 114.27 (CH, C-8); 117.18 (C<sub>q</sub>, C-b); 132.65 (CH, C-9); 159.45 (C<sub>q</sub>, C-a).

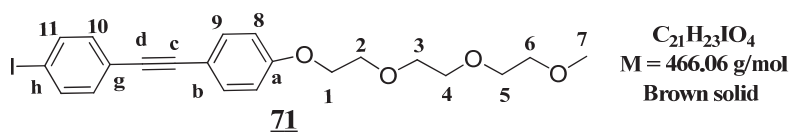
### 1-ethynyl-4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzene **70**



A solution of ((4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)trimethylsilane **69** (1.98 g, 5.88 mmol, 1 eq.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.43 g, 17.69 mmol) in a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) and MeOH (20 mL) was stirred at room temperature for 4 hours then quenched with water and finally extracted with AcOEt. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. The resulted crude oil was purified by chromatography (cyclohexane then cyclohexane/AcOEt 50:50) to afford the corresponding **70** as white oil 940 mg (60.5 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 2.28 (s, 1H, H-f); 3.37 (s, 3H, H-7); 3.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 4.6 Hz, 2H, H-6); 3.64-3.72 (m, 6H, H-5, H-4, H-3); 3.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 4.6 Hz, 2H, H-2); 4.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 5.0 Hz, 2H, H-1); 6.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-8); 7.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-9).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 59.19 (CH<sub>3</sub>, C-7); 67.91 (CH<sub>2</sub>, C-1); 69.91 (CH<sub>2</sub>, C-2); 70.72-70.99 (CH<sub>2</sub>, C-3, C-4, C-5); 72.05 (CH<sub>2</sub>, C-6); 83.73 (C-c, C-d); 114.24 (CH, C-8); 117.16 (C<sub>q</sub>, C-b); 132.69 (CH, C-9); 159.43 (C<sub>q</sub>, C-a).

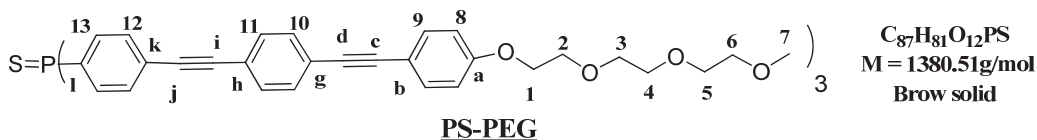
**1-iodo-4-((4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)benzene 71**

A Schlenk flask was charged with compound 70 (780 mg, 2.95 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (102.3 mg, 0.088 mmol, 0.03 eq), CuI (33.7 mg, 0.177 mmol, 0.06 eq), and 1,4-diiodobenzene (3.89 g, 11.81 mmol, 4 eq) in a mixture of anhydrous toluene (50 mL) and distilled triethylamine (12 mL). The mixture was exhaustively degassed with argon and stirred at 80 °C overnight. The organic phase was filtered over celite, washed with water (60 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, a chromatography on silica gel a gradient from 100% cyclohexane then cyclohexane/AcOEt 20:80 gave the desired compound 71 as a brown solid (680 mg, 50 %).

F: 72-74°C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 3.38 (s, 3H, H-7); 3.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 4.6 Hz, 2H, H-6); 3.66-3.74 (m, 6H, H-5, H-4, H-3); 3.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 5.0 Hz, 2H, H-2); 4.15 (t, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 5.0 Hz, 2H, H-1); 6.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>8-9</sub> = 7.8 Hz, 2H, H-8); 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>10-11</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-10); 7.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-10</sub> = 7.8 Hz, 2H, H-9); 7.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>11-10</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-11).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 59.08 (CH<sub>3</sub>, C-7); 67.48 (CH<sub>2</sub>, C-1); 69.43 (CH<sub>2</sub>, C-2); 70.62-71.07 (CH<sub>2</sub>, C-3, C-4, C-5); 72.07 (CH<sub>2</sub>, C-6); 87.77-93.05 (Cq, C-c, C-d); 99.66 (Cq, C-h); 115.36 (CH, C-8); 122.60 (Cq, C-g); 133.01-133.12 (CH, C-9, C-10); 137.53 (CH, C-11); 159.21 (Cq, C-a).

**Tri-4-[ethyl4-(4-di(phenyleneethynylene)-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)benzene ]phosphane sulfide: PS-PEG**

A Schlenk flask was charged with tri-(4-ethynyl-phenyl)phosphane sulfide 54 (13.09 mg, 0.035 mmol, 1 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (16.17mg, 0.0014 mmol, 0.04 eq), CuI (2.71 mg, 0.0014 mmol, 0.04 eq), and compound 71 (100 mg, 0.2145 mmol, 6 eq) in a mixture of anhydrous toluene (2 mL) and distilled triethylamine (0.4 mL). The mixture was exhaustively degassed with argon and stirred at 80 °C overnight then cooled to room temperature. The organic phase was filtered over celite, washed with water (10 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent, a

chromatography on silica gel with a gradient from AcOEt to a 95:05 mixture AcOEt/EtOH gave the desired compound **PS-PEG** as a brown solid (27.5 mg, 56 %).

F: 94-101°C

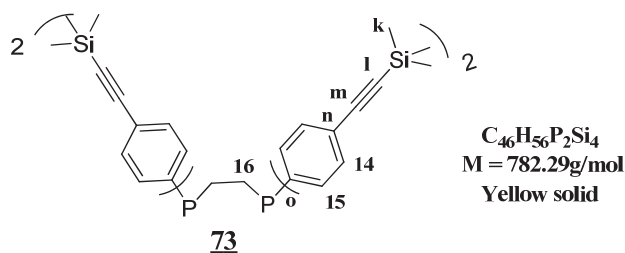
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.37 (s, 9H, H-7), 3.54-3.55 (m, 6H, H-6); 3.64-3.73 (m, 18H, H-5, H-4, H-3); 3.85-3.89 (m, 6H, H-2); 4.14 (t,  $^3J_{1-2} = 5.0$  Hz, 6H, H-1), 6.89 (d,  $^3J_{8-9} = 9.16$  Hz, 6H, H-8); 7.44 (d,  $^3J_{9-8} = 8.7$  Hz, 6H, H-9); 7.48-7.50 (m, 6H, H-10); 7.66-7.71 (m, 18H; H-11, H-12, H-13).

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 59.07 ( $\text{CH}_3$ , C-7); 70.49 ( $\text{CH}_2$ , C-1, C-2, C-3, C-4, C-5); 72.89 ( $\text{CH}_2$ , C-6); 104.59 (Cq, C-c, C-d, C-i, C-j); 115.09 (Cq, C-b); 131.77-138.08 (CH, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13); 138.08 (Cq, C-a).

$^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 43.21 (s, P=S).

### II.3. Mercury ligand DPPS-PEG

#### 1,2-bis-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)diphosphanoethane **73**



In a three necked round bottom flask, 460 mg of magnesium powder (17.25 mmol, 4 eq) were activated by strong stirring under argon atmosphere during 3 h. Then a solution of bromophenylethynyl)trimethylsilane (4.369 g, 17.25 mmol, 4 eq) was introduced via a cannula. The resulting solution was refluxed until all magnesium reacted, and then cooled down to room temperature. The reaction mixture was transferred in a cooled solution of 1 g of 1,2-bis(dichlorophosphino)ethane (4.31 mmol, 1 eq.) in 5 mL of anhydrous THF and stirred at room temperature overnight. The mixture was then quenched with 15 mL of saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution, extracted with 2x30 mL of AcOEt, and 2x30 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were washed with 10 mL of water, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  50:50) to obtain 1,7 g of compound **73** as a pale yellow solid (26 %).

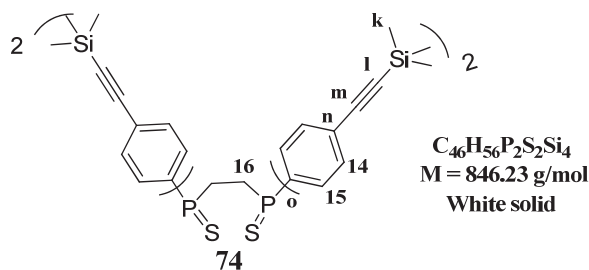
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.25 (s, 36H, H-k); 2.01-2.02 (m, 4H, C-16); 7.51-7.52 (m, 8H, H-15); 7.67-7.68 (m, 8H, H-15).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.22 ( $\text{CH}_3$ , C-k); 23.74 ( $\text{CH}_2$ , C-16); 95.53 (Cq, C-l, C-m); 104.65 (Cq, C-n); 123.63 (Cq, C-o); 131.82 (CH, C-15); 132.29 (CH, C-14).



$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): -11.59 (s, P).

### 1,2-bis(bis(4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)phosphorothioyl)ethane 74



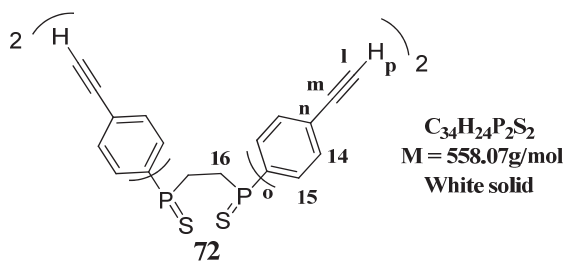
To a solution of 1,2-bis-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)diphosphanoethane 73 (1.7 g, 2.17 mmol, 1 eq) in 30 mL toluene under argon, was quickly added  $\text{S}_8$  (258 mg, 4.34 mmol, 2 eq). The resulting mixture was refluxed for 18 hours, then cooled to room temperature and concentrated under vacuum. The residue was purified by silica gel chromatography with a gradient from a mixture of cyclohexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  80:20 to 50:50 to afford 1.62 g of a white solid 74 (88 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.24 (s, 36H, H-k); 2.60-2.61 (m, 4H, C-16); 7.51 (d,  $^3J_{14-15} = 6.9 \text{ Hz}$ , 8H, H-14); 7.68 (d d,  $^3J = 6.9 \text{ Hz}$ ,  $^4J = 1.4 \text{ Hz}$ , 8H, H-15).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.22 ( $\text{CH}_3$ , C-k); 25.73 ( $\text{CH}_2$ , C-16); 97.51 ( $\text{C}_q$ , C-l, C-m); 104.25 ( $\text{C}_q$ , C-n); 123.83 ( $\text{C}_q$ , C-o); 131.22 ( $\text{CH}$ , C-15); 132.26 ( $\text{CH}$ , C-14).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 44.61 (s, P =S).

### 1,2-bis(bis(4-ethynylphenyl)phosphorothioyl)ethane 72



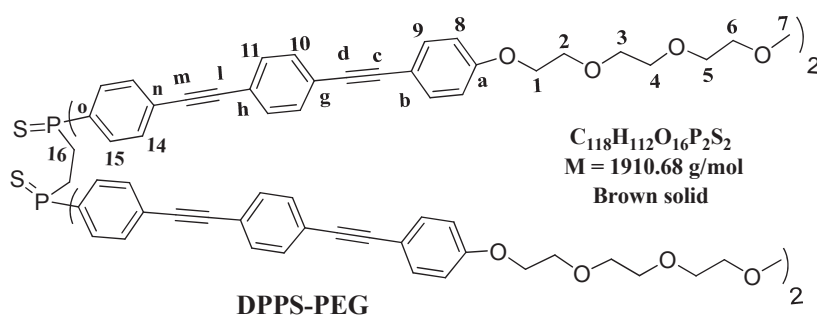
To a solution of ethylene 1,2-bis-(4-trimethylsilylethynyl-phenyl)diphosphane sulphide 74 (300 mg, 0.35 mmol) in a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) and MeOH (10 mL), was added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (195.6 mg, 1.42 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 6 hours, quenched with water and then extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried ( $\text{MgSO}_4$ ), and concentrated under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by chromatography (cyclohexane then cyclohexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  80:20) to afford the corresponding 72 as a white solid 185 mg (95 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 2.64-2.65 (m, 4H, H-16); 7.57 (d,  $^3J_{14-15} = 7.8$  Hz, 8H, H-14); 7.73-7.75 (m; 8H, H-15).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 21.71 ( $\text{CH}_3$ , C-16); 97.51 ( $\text{C}_q$ , C-l, C-m); 104.25 ( $\text{CH}_3$ , C-n); 123.83 ( $\text{CH}_3$ , C-o); 128.08 ( $\text{CH}$ , C-15); 129.90 ( $\text{CH}$ , C-14).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 44.44 (s, P=S).

**Ethylene-1,2-bis-4-[ethyl4-(4-di(phenyleneethynylene)-(2-(2-(2methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)ethynyl)benzene]phosphane sulfide : DPPS-PEG**



A Schlenk flask was charged with 1,2-bis(bis(4-ethynylphenyl)phosphorothioyl)ethane **72** (50 mg, 0.089 mmol, 1 eq),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (16.54 mg, 0.0014 mmol, 0.16 eq),  $\text{CuI}$  (2.72 mg, 0.0014 mmol, 0.16 eq), and 1-iodo-4-((4-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethynyl)benzene) **71** (271.4 mg, 0.582 mmol 6.5 eq) in a mixture of anhydrous toluene (2 mL) and distilled triethylamine (0.4 mL). The mixture was exhaustively degassed with argon and stirred at 80 °C overnight then cooled to room temperature. The organic phase was filtered over celite, washed with water (10 mL) and dried over  $\text{MgSO}_4$ . After removal of the solvent, a chromatography on silica gel with a gradient from  $\text{AcOEt}$  to a 95:05 mixture  $\text{AcOEt}/\text{EtOH}$  gave the desired compound **DPPS-PEG** as a brown solid (78 mg, 45.5 %).

**F:** 121-125°C

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.38 (s, 12H, H-7); 3.64-3.70 (m, 16H, H-5, H-4); 3.73 (t,  $^3J_{3-4} = 5.0$  Hz, 8H, H-3); 3.87 (t,  $^3J_{2-1} = 4.6$  Hz, 8H, H-2); 4.15 (t,  $^3J_{1-2} = 4.2$  Hz, 8H, H-1); 6.89 (d,  $^3J_{8-9} = 8.4$  Hz, 8H, H-8); 7.44 (d,  $^3J_{9-8} = 8.7$  Hz, 8H, H-9); 7.46-7.49 (m, 16H, H-10, H-11); 7.57-7.60 (m, 8H, H-14); 7.77-7.81 (m, 8H, H-15).

$^{13}\text{C}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 38.77 ( $\text{CH}_2$ , C-16); 59.40 ( $\text{CH}_3$ , C-7); 67.53 ( $\text{CH}_2$ , C-1); 69.72 ( $\text{CH}_2$ , C-2); 70.64-70.74 ( $\text{CH}_2$ , C-3, C-4, C-5); 72.00 ( $\text{CH}_2$ , C-6); 114.89 ( $\text{CH}$ , C-8); 131.77-133.08 ( $\text{CH}$ , C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13).

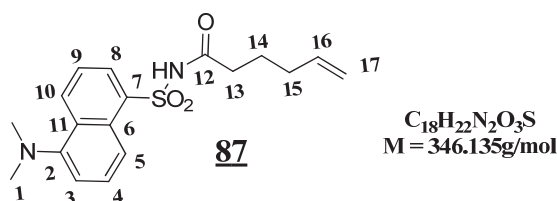
$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 44.67 (s, P=S).

## III. Chapitre IV: Ligand for lead ion detection

### CalixDans3-OH

#### III.1. Model compound for lead ion detection: DANS-1-OH

##### N-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-ylsulfonyl)hex-5-enamide 87

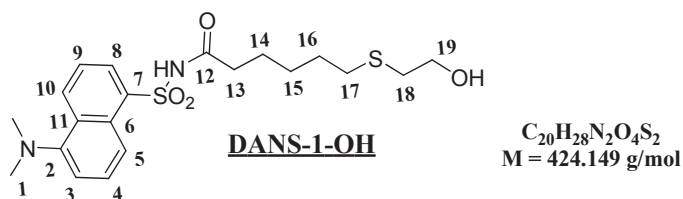


To a solution of 1.81 g of hex-5-enoic acid (15.87 mmol, 1eq.) in 30 mL of toluene, were added 3.5 mL of oxalyl chloride (39.7 mmol, 2.5 eq.) diluted in 5 mL of toluene. The mixture was refluxed during 3 h then solvent was quickly removed under reduced pressure. The resulted crude solid was dissolved in 17 mL of THF and added to a solution of dansyle amide 5.16 g (20.63 mmol, 1.3 eq.) and potassium hydride 3.8 g (95.22 mmol, 6 eq, 35 % in mineral oil) in 20 mL of THF. The mixture was stirred at room temperature for 18 hours. Exceeded KH was neutralized by methanol, the solvent was removed under reduced pressure and the crude solid was extracted with 3x100 mL of AcOEt. The combined organic phases were dried ( $MgSO_4$ ) and concentrated under reduced pressure. The resulted crude solid was purified by chromatography ( $CH_2Cl_2$  to  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1 to afford the corresponding **87** as a green solid (2.39 g, 33 %).

**F:** 66-72°C

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.56 (t,  $^3J_{14-13} = 7.3$  Hz, 2H, H-14); 1.87 (t,  $^3J_{15-14} = 6.9$  Hz, 2H, H-15); 2.22 (t,  $^3J_{13-14} = 7.3$  Hz, 2H, H-13); 3.06 (s, 6H, H-1); 4.81-4.85 (m, 2H, H-17); 5.54-5.61 (m, 1H, H-16); 6.18 (d,  $^3J_{3-4} = 7.8$  Hz, 1H, H-3); 7.56-7.59 (m, 2H, H-4, H-9); 8.20 (d,  $^3J_{10-9} = 8.8$  Hz, 1H, H-10); 8.50 (d,  $^3J_{8-9} = 6.9$  Hz, 1H, H-8); 8.61 (d,  $^3J_{5-4} = 8.7$  Hz, 1H, H-5).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$   $\delta$  (ppm):** 23.25 ( $CH_2$ , C-14); 32.64 ( $CH_2$ , C-15); 35.38 ( $CH_2$ , C-13); 45.54 ( $CH_3$ , C-1); 115.39 ( $CH_2$ , C-17); 115.70 ( $CH$ , C-3); 118.07 (Cq, C-11); 123.40 ( $CH$ , C-5, C-8); 129.01-130.12 ( $CH$ , C-4, C-9); 132.09 ( $CH$ , C-10); 132.39 (Cq, C-6); 137.28 ( $CH$ , C-16); 152.41 (Cq, C-2); 171.01 (Cq, C-12).

**N-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-ylsulfonyl)-6-(2-hydroxyethylthio)hexanamide: DANS-1-OH**

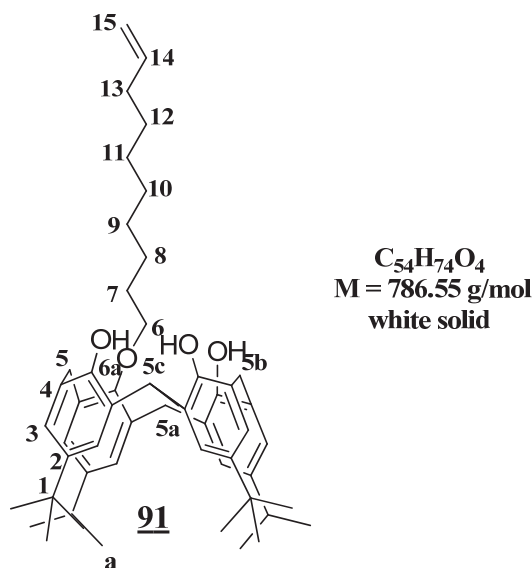
350 mg (1.01 mmol, 1 eq.) of *N*-(5-(dimethylamino)naphthalen-1-ylsulfonyl)hex-5-enamide **87**, 8.86 mg (0.060 mmol, 0.06 eq.) of AIBN and 141  $\mu$ L (2.02 mmol, 2 eq.) of mercaptoethanol were dissolved in 30 mL of chloroform under argon. The mixture was refluxed 72 h then the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by chromatography (Cyclohexane to Cyclohexane/AcOEt 50:50 then AcOEt/MeOH 90:10) to afford the corresponding **DANS-1-OH** as a green solid (200 mg, 46 %).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.24-1.27 (m, 2H, H-15); 1.39-1.51 (m, 4H, H-14, H-16); 2.22 (t,  $^3J_{13-14} = 7.3$  Hz, 2H, H-13); 2.35 (t,  $^3J_{17-16} = 7.3$  Hz, 2H, H-17); 2.66 (t,  $^3J_{18-19} = 7.3$  Hz, 2H, H-18); 2.9 (s, 6H, H-1); 3.69 (t,  $^3J_{19-18} = 5.9$  Hz, 2H, H-19); 7.20 (d,  $^3J_{3-4} = 7.8$  Hz, 1H, H-3); 7.58-7.62 (m, 2H, H-4, H-9); 8.21 (d,  $^3J_{10-9} = 8.8$  Hz, 1H, H-10); 8.50 (d,  $^3J_{8-9} = 6.9$  Hz, 1H, H-8); 8.61 (d,  $^3J_{5-4} = 8.7$  Hz, 1H, H-5).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 23.84 ( $\text{CH}_2$ , C-15); 27.82 ( $\text{CH}_2$ , C-14); 29.16 ( $\text{CH}_2$ , C-16); 31.27 ( $\text{CH}_2$ , C-17); 35.32 ( $\text{CH}_2$ , C-18); 36.06 ( $\text{CH}_2$ , C-13); 45.54 ( $\text{CH}_3$ , C-1); 60.37 ( $\text{CH}_2$ , C-19); 115.34 ( $\text{CH}_2$ , C-17); 118.03 (Cq, C-11); 123.44 (CH, C-5, C-8); 128.96-129.88 (CH, C-4, C-9); 131.64 (CH, C-10); 132.09 (Cq, C-6); 152.11 (Cq, C-2); 170.90 (Cq, C-12).

### III.2. Synthesis of lead ion ligand: Calix-DANS-3-OH

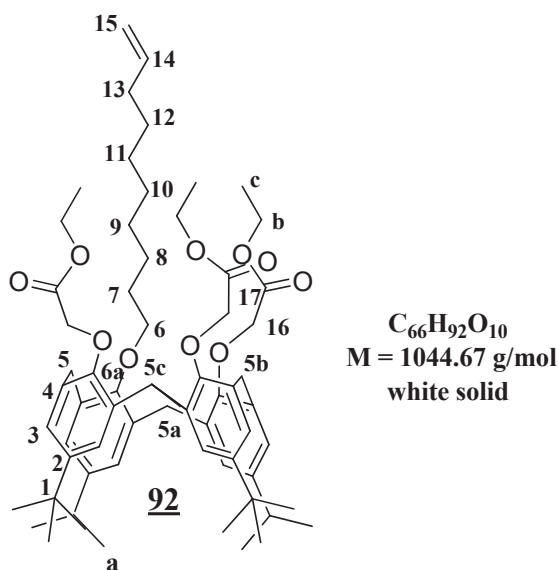
#### 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25-(dec-10-enyl)oxy-calix[4]arene 91



5.92 g (9.12 mmol, 1 eq.) of *t*-butyl-calix[4]arene and 1.26 g (9.12 mmol, 1eq.) of  $K_2CO_3$  in 30 mL of acetone were dissolved under strong stirring during 1 h. Then 2 g (9.12 mmol, 1eq.) of 1-bromo-10-decene were added and the mixture was refluxed 18 h. The solvent was removed under vacuum; then the mixture was acidified with 40 mL of HCl 1 M and extracted with 3x40 mL of  $CH_2Cl_2$ . The combined organic phases were dried ( $MgSO_4$ ) and concentrated under reduced pressure. Exceeded calixarene was precipitated upon addition of 30 mL of cyclohexane. The white oil obtained was purified by flash chromatography (Cyclohexane/ $CH_2Cl_2$  7:3) to afford the corresponding 91 as a white solid (3.1 g, 43.5 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.12-1.19 (m, 36H, H-a); 1.34-1.45 (m, 10H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12); 1.63-1.65 (m, 2H, H-7); 2.01-2.06 (m, 2H, H-13); 3.40 (d,  $^2J = 7.3$  Hz, 2H, H-5c); 3.45 (d,  $^2J = 9.2$  Hz, 2H, H-5b); 4.12 (t,  $^3J_{6-7} = 8.7$  Hz, 2H, H-6); 4.27 (d,  $^2J = 15.1$  Hz, 2H, H-5); 4.35 (d,  $^2J = 11.9$  Hz, 2H, H-5a); 4.95 (dd,  $^2J = 1.37$  Hz,  $^3J_{15-14} = 14.6$  Hz, 2H, H-15); 5.78-5.87 (m, 1H, H-14); 6.97-7.08 (m, 8H, H-3).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 26.30 ( $CH_2$ , C-8); 29.29 ( $CH_2$ , C-10); 29.50 ( $CH_2$ , C-9); 29.81 ( $CH_2$ , C-12); 30.23 ( $CH_2$ , C-7); 31.42 ( $CH_2$ , C-5c, C-5b); 31.60 ( $CH_3$ , C-a); 33.89 (Cq, C-1); 31.95 ( $CH_2$ , C-5a, C-5); 33.90 ( $CH_2$ , C-13); 60.06 ( $CH_2$ , C-6); 113.96 ( $CH_2$ , C-15); 125.01 (CH, C-3); 125.35 (CH, C-14); 134.00 (Cq, C-4); 144.43 (Cq, C-2); 153.17 (Cq, C-6a).

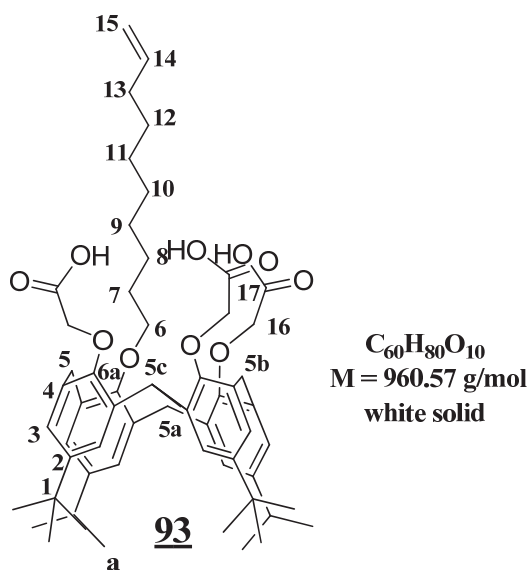
**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27-triethoxycarbonylmethyleneoxy-28-(dec-10-enyl)oxy-calix[4]arene 92**

To a solution of compound **91** (2.35 g, 2.98 mol, 1 eq.) in a mixture of 10 mL of DMF and 40 mL of THF, was added 1.43 g of NaH 30 % (59.78 mmol, 20 eq.). The mixture was stirred during 45mn at room temperature. 7.53 g (44.83 mmol, 15 eq.) of ethyl bromoacetate were added and the mixture was heated at 60°C during 24 h. Excess of NaH was neutralized by methanol. The solvent was removed under vacuum. The mixture was acidified with 50 mL of HCl 1 M and extracted with 3x40 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure. The resulted crude solid was purified by chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 7:3 then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) to afford the corresponding **92** as a white solid 1.8 g (56 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 1.04-1.09 (m, 36H, H-a); 1.26-1.36 (m, 19H, H-c, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12); 1.96-1.98 (m, 2H, H-7); 2.04-2.05 (m, 2H, H-13); 3.16 (d, <sup>2</sup>J = 7.3 Hz, 2H, H-5c); 3.19 (d, <sup>2</sup>J = 9.1 Hz, 2H, H-5b); 3.85 (t, <sup>3</sup>J<sub>6-7</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-6); 4.10-4.22 (m, 6H, H-b); 4.62 (d, <sup>2</sup>J = 15.1 Hz, 2H, H-5); 4.76-4.79 (m, 6H, H-16); 4.84 (d, <sup>2</sup>J = 12.8 Hz, 2H, H-5a); 4.95 (d-d, <sup>2</sup>J<sub>15-15</sub> = 0.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>15-14</sub> = 11.45 Hz, 2H, H-15); 5.78-5.85 (m, 1H, H-14); 6.71-6.80 (m, 8H, H-3).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 14.31 (CH<sub>3</sub>, C-c); 26.27 (CH<sub>2</sub>, C-8); 29.30 (CH<sub>2</sub>, C-10); 29.50 (CH<sub>2</sub>, C-9); 29.81 (CH<sub>2</sub>, C-12); 30.23 (CH<sub>2</sub>, C-7); 31.42 (CH<sub>2</sub>, C-5c, C-5b); 31.65 (CH<sub>3</sub>, C-a); 31.98 (CH<sub>2</sub>, C-5a, C-5); 33.85 (CH<sub>2</sub>, C-13); 33.89 (Cq, C-1); 59.07 (CH<sub>2</sub>, C-b); 70.73 (CH<sub>2</sub>, C-16); 71.62 (CH<sub>2</sub>, C-6); 114.15 (CH<sub>2</sub>, C-15); 125.30 (CH, C-3); 139.31 (CH, C-14); 134.00 (Cq, C-4); 144.43 (Cq, C-2); 153.46 (Cq, C-6a); 170.46 (Cq, C-17).

**ES HRMS:** m/z: calcd for C<sub>66</sub>H<sub>92</sub>O<sub>10</sub>Na: 1067.6547; found: 1067.6588 [M+Na<sup>+</sup>].

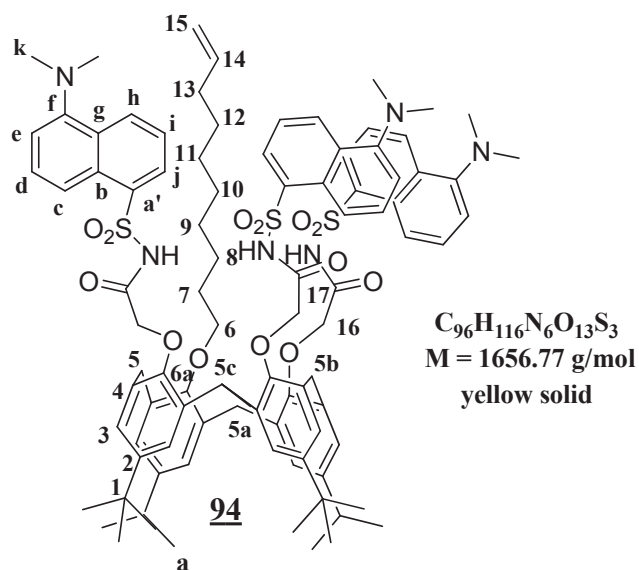
**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27-tricarboxymethyleneoxy-28-(dec-10-enyl)oxy-calix[4]arene 93**

To a solution of 1.8 g of compound 92 (1.72 mmol) in ethanol (20 mL), were added 10 mL of NaOH aqueous solution (15% w/w). The resulting mixture was stirred for 20 mn at room temperature, then refluxed for 5. Ethanol was removed under reduced pressure. The mixture was acidified with 25 mL of HCl 0.1 M, and a white precipitate was formed upon addition of 20 mL cyclohexane. The solid was filtered and dried under vacuum to afford the corresponding 93 as a white solid 1.67 g (97 %).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.19-1.26 (m, 36H, H-a); 1.34-1.45 (m, 10H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12); 1.67-1.70 (m, 2H, H-7); 2.03-2.07 (m, 2H, H-13); 3.24-3.40 (m, 4H, H-5c, H-5b); 3.70-3.72 (m, 2H, H-6); 4.08-4.10 (m, 6H, H-16); 4.13-4.15 (m, 2H, H-5); 4.55-4.56 (m, 2H, H-5a); 4.81-4.96 (m, 2H, H-15); 5.81-5.96 (m, 1H, H-14); 6.99-7.17 (m, 8H, H-3).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 26.17 ( $\text{CH}_2$ , C-8); 29.33 ( $\text{CH}_2$ , C-10); 29.53 ( $\text{CH}_2$ , C-9); 29.81 ( $\text{CH}_2$ , C-12); 30.31 ( $\text{CH}_2$ , C-7); 31.35 ( $\text{CH}_2$ , C-5c, H-5b); 31.38 ( $\text{CH}_3$ , C-a); 31.98 ( $\text{CH}_2$ , C-5a, C-5); 33.60 (Cq, C-1); 34.13 ( $\text{CH}_2$ , C-13); 67.13 ( $\text{CH}_2$ , C-16); 74.80 ( $\text{CH}_2$ , C-6); 114.29 ( $\text{CH}_2$ , H-15); 125.63 (CH, H-3); 134.62 (Cq, H-4); 139.38 (CH, C-14); 147.61 (Cq, C-2); 150.31 (Cq, C-6a); 172.71 (Cq, C-17).

**ES HRMS:** m/z: calcd for  $C_{60}H_{80}O_{10}Na$ : 983.5613; found: 983.5649 [ $M+Na^+$ ].

**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27-[(5'-*N,N*-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl)carbamoylmethoxy]-28-(dec-10-enyl)oxy-calix[4]arene 94**

To a solution of compound 93 (0.638 g, 0.664 mmol, 1 eq.) in 10 mL of toluene, was added 1.16 mL oxalyl chloride (13.9 mmol, 20 eq.) diluted in 5 mL of toluene. The mixture was refluxed during 4h30mn then solvent was quickly removed under reduced pressure. The resulting crude solid was dissolved in 10 mL THF added to a solution of dansyl amide 1 g (13.9 mmol, 6 eq.) and potassium hydrid 1.52 g (13.29 mmol, 20 eq.) 35% in oil then stirred at room temperature for 18 hours. Excess of KH was neutralized by methanol and solvent was removed under reduced pressure. Excess dansyl amide was eliminated by precipitation in cyclohexane. The resulting crude solid was purified by chromatography ( $CH_2Cl_2$  then  $CH_2Cl_2/MeOH$  99:01 to 90:10). The obtained yellow solid was washed with 30 mL HCl 1 M, and 25 mL Millipore water to afford the corresponding 94 as a yellow solid (546 mg, 33 %).

**F:** 143-146°C

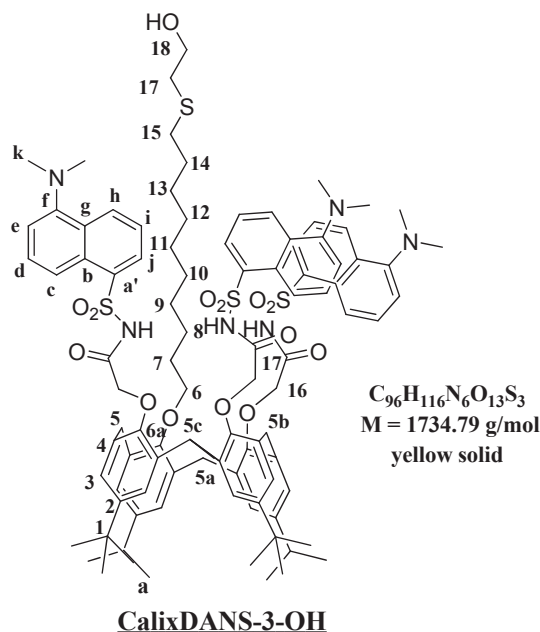
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.03-1.21(m, 36H, H-a); 1.25-1.27 (m, 10H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12); 1.94-2.02 (m, 4H, H-7, H-13); 2.86-2.87 (m, 18H, H-k); 3.05-3.12 (m, 4H, H-5c, H-5b); 3.34-3.38 (m, 2H, H-6); 3.94-4.13 (m, 6H, H-16); 4.16-4.42 (m, 4H, H-5, H-5a); 4.97 (d-d,  $J_{15-15} = 1.4\text{Hz}$ ,  $J_{15-14} = 10.9 \text{ Hz}$ , 2H, H-15); 5.67-5.82 (m, 1H, H-14); 6.77-6.78 (m, 3H, H-e); 6.90-7.08 (m, 8H, H-3); 7.07-7.44 (m, 6H, H-i, H-d); 8.36-8.67 (m, 9H, H-c, H-f, H-g).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 25.31 ( $CH_2$ , C-8); 28.09 ( $CH_3$ , C-a); 28.03-29.60 ( $CH_2$ , C-1, C-9, C-12, C-7); 31.17 ( $CH_2$ , C-5c, H-5b); 31.49 ( $CH_2$ , C-5a, C-5); 33.80 (Cq, C-1); 33.95 ( $CH_2$ , C-13); 45.54 ( $CH_3$ , C-k); 74.86 ( $CH_2$ , C-6); 114.52 ( $CH_2$ , C-15); 115.52 (CH, C-e); 120.40 (Cq, C-f); 123.62 (CH, C-b); 125.46 (CH, C-h, C-i, C-d, ); 126.11 (CH, C-g); 134.96 (Cq, C-b); 139.37 (CH, C-14); 140.06 (CH, C-3); 149.17 (Cq, C-N); 151.41 (Cq, C-6a); 175.51 (Cq, C-17).

**ES HRMS:** m/z: calcd for  $C_{96}H_{116}N_6O_{13}S_3Na_4$ : 1748,69; found: 1748,58 [ $M+4Na^+$ ].



**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27-[(5'-*N,N*-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl) carbamoylmethoxy]-28-(dec-10-enylthioethanol)oxy-calix[4]arene**  
**CalixDANS-3-OH**



280 mg (0.16 mmol, 1 eq.) of compound **94**, 2.94 mg (0.0202 mmol, 0.12 eq.) of AIBN and 26.4 mg (0.338 mmol, 2.1 eq.) of mercaptoethanol were dissolved in 10 mL of chloroform under argon. The mixture was refluxed 48h then the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 80:20 to 90:10) to afford the corresponding **CalixDANS-3-OH** as a yellow solid (160 mg, 56 %).

**F:** 192-195°C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 1.02-1.15 (m, 36H, H-a); 1.24-1.32 (m, 10H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13); 1.52-1.56 (m, 2H, H-14); 1.84-1.92 (m, 2H, H-7); 2.45 (t, <sup>3</sup>J<sub>14-15</sub> = 6.9 Hz, 2H, H-15); 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>17-18</sub> = 6.4 Hz, 2H, H-17); 2.81-2.86 (m, 18H, H-k); 3.23-3.37 (m, 4H, H-5c, H-5b); 3.76 (t, <sup>3</sup>J<sub>18-17</sub> = 6.4 Hz, 2H, H-18); 4.14-4.18 (m, 2H, H-6); 4.27-4.35 (m, 6H, H-16); 4.41-4.51 (m 4H, H-5, H-5a); 6.98 (m, 3H, H-e) 7.03-7.14 (m, 8H, H-3); 7.35-7.43 (m, 3H, H-d); 7.48-7.52 (m, 3H, H-i); 8.26-8.28 (m, N-H); 8.33-8.40 (m, 3H, H-h); 8.44-8.46 (m, 3H, H-j); 8.52-8.54 (m, 3H, H-c).

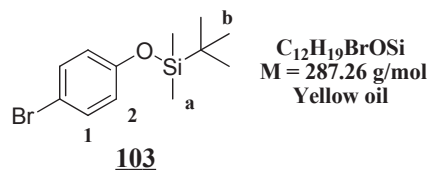
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm):** 25.79 (CH<sub>3</sub>, C-a); 28.03-29.60 (CH<sub>2</sub>, C-1, C-8, C-9, C-12, C-7); 31.17 (CH<sub>2</sub>, C-5c, H-5b); 31.49 (CH<sub>2</sub>, C-5a, C-5); 33.95 (CH<sub>2</sub>, C-13); 45.80 (CH<sub>3</sub>, C-k); 116.94-129.87 (CH, C-e, C-f, C-b, C-h, C-i, C-d, C-g); 134.96-138.38 (, C-b, C-b); 140.06 (CH, C-3); 147.32 (Cq, C-N); 149.65 (Cq, C-6a); 162.51 (Cq, C-17).

**ES HRMS:** m/z: calcd for C<sub>98</sub>H<sub>119</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>Na<sub>4</sub>: 1824.75; found: 1823.75 [M+4Na<sup>+</sup>].

## IV. Chapter V: Ligands for $\text{Hg}^{2+}$ and $\text{Pb}^{2+}$ detection by microlaser

### IV.1. Synthesis of mercury ligand

#### (4-bromophenoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane 103



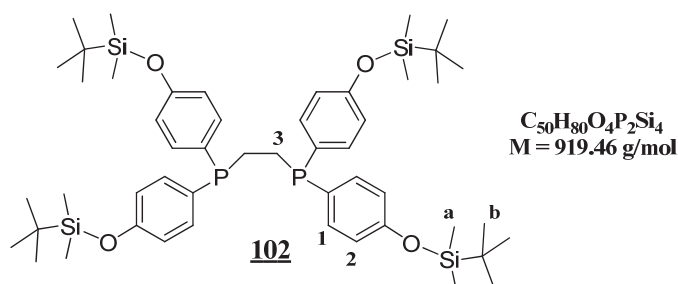
5.2 g of 4-bromophenol (30 mmol), 1.8 g of DMAP (15 mmol, 0.5 eq.) and 13 mL of triethylamine (90 mmol, 3 eq.) were dissolved in 600 mL of anhydrous dichloromethane under strong stirring at room temperature. 13.6 g of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (90 mmol, 3 eq.) were added. After stirring overnight at room temperature, the mixture was quenched with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution and extracted with 3x30mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were dried ( $\text{MgSO}_4$ ) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  80:20) to obtain 8.4 g (98%) of yellow oil of 103.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.1 (s, 9H, H-b); 0.92 (s, 6H, H-a); 6.67 (d,  $^3J = 8.96$  Hz, 2H, H-1); 7.27 (d, 2H,  $^3J = 8.96$  Hz, H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.44 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ); 18.32 (Cq, tBu); 25.78 ( $\text{CH}_3$ , tBu); 113.74 (Cq, C-Br); 122.04 (CH aromatic, C1); 132.42 (CH aromatic, C2); 154.96 (Cq, C-O).

RMN  $^{29}\text{Si}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm): 22.28 (SiMe<sub>2</sub>tBu).

#### 1,2-bis(bis(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)phosphino)ethane 102



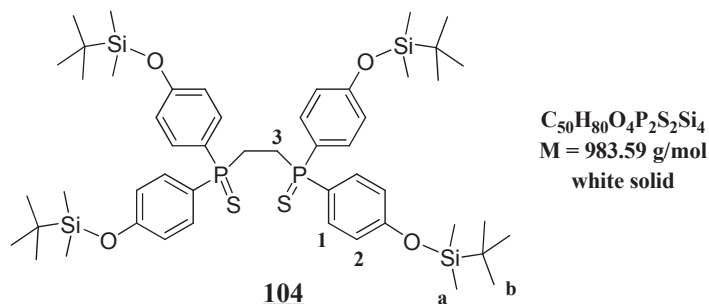
In a three necked round bottom flask, 498 mg of magnesium powder (4.75 eq, 20.49 mmol) were activated by strong stirring under argon atmosphere during 3h. Then a solution of compound **103** 4.95 g (17.25 mmol, 4 eq.) in anhydrous tetrahydrofuran (12 mL) was introduced via a cannula. The resulting solution was refluxed until all magnesium reacted, and then cooled down to room temperature. The reaction mixture was transferred in a cooled solution of 1 g of 1,2-bis(dichlorophosphino)ethane (4.31 mmol, 1 eq.) in 5 mL of anhydrous THF and stirred at room temperature for 18h. The mixture was then quenched with 10 mL of saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution, extracted with 2x20 mL of AcOEt and 2x20 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were washed with 10 mL of water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50:50) to obtain 920 mg (23 %) of a visqueous white oil **102**.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 0.19 (s, 24H, H-a); 0.96 (s, 36H, H-b); 1.98 (s, 4H, H-3); 6.77 (d, 8H, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.7 Hz, H-2); 7.20-7.44 (m, 8H, H-1).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): -5.00 (CH<sub>3</sub>, C-a); 25.41 (CH<sub>3</sub>, C-b); 29.23 (CH<sub>2</sub>, C-3); 119.83 (CH, C-2); 134.93 (CH, C-1); 156.34 (Cq, C-O).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): -14.38 (s, P).

### 1,2-bis(bis(4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl)phosphorothioyl)ethane **104**

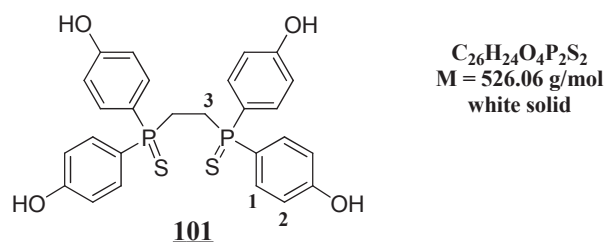


To a solution of compound **102** (1.02 g, 1.44 mmol, 1 eq.) in anhydrous toluene (20 mL) under argon atmosphere, were quickly added 606 mg of S<sub>8</sub> (2.33 mmol, 2.1 eq.). The resulting mixture was refluxed for 24 hours, then cooled to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6) to give 894 mg of the expected product **104** as a white solid (82 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>), δ (ppm): 0.14 (s, 24H, H-a); 0.89 (s, 36H, H-b); 2.59 (s, 4H, H-3); 6.99 (d, 8H, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.7 Hz, H-2); 7.54-7.60 (m, 8H, H-1).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>), δ (ppm): 0.00 (CH<sub>3</sub>, C-a); 23.02 (CH<sub>3</sub>, C-b); 29.27 (CH<sub>2</sub>, C-3); 120.12 (CH, C-2); 132.98 (CH, C-1).

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, acetone-d<sub>6</sub>), δ (ppm): 41.96 (s, P = S).

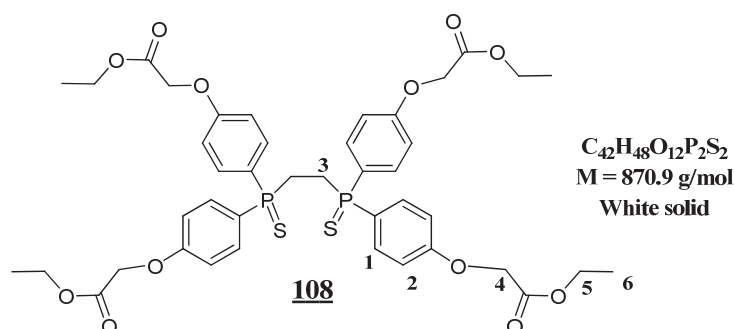
**1,2-bis(bis(4-(hydroxyphenyl)-phosphirotiol)ethane 101**

560 mg (1.70 mmol, 10 eq.) of  $Cs_2CO_3$  were added to a solution of 169 mg of **104** (0.170 mmol, 1eq.) in a mixture of DMF/ $H_2O$  (10:1) (combined solvent). The reaction mixture was refluxed at  $125^\circ C$  during 48 h, and then the DMF was removed under vacuum. The organic residue was quenched with aqueous HCl 1 M, and a white precipitate was formed upon addition of 10 mL  $CH_2Cl_2$ . The solid was filtered and dried under vacuum. 88 mg (98 % yield) of the deprotected product **101** was obtained as a white solid.

$^1H$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 2.59 (s, 4H, H-3); 6.99 (d,  $^3J_{1-2} = 8.2$  Hz, 8H, H-2); 7.63-7.68 (m, 8H, H-1); 9.06 (s, 4H, OH).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 29.24 ( $CH_2$ , C-3); 115.7 (CH, C-2); 132.73 (CH, C-1); 160.47 (Cq, C-O).

$^1P$  NMR (162MHz, acetone- $d_6$ ,  $\delta$  (ppm): 42.61 (s; P=S)

**1,2-bis(bis(4-(ethylphenoxyacetate)phosphirotiol)ethane 108**

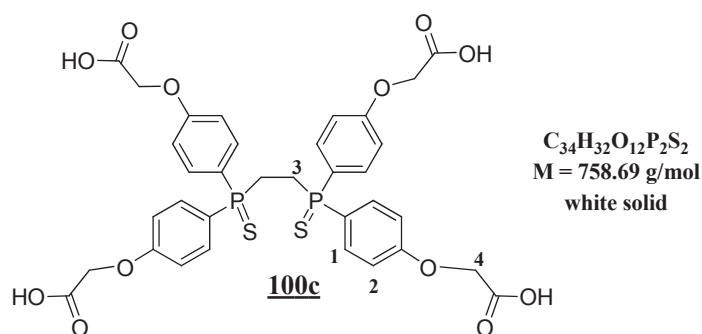
To a solution of compound **101** (126 mg, 0.239 mmol, 1 eq.) in acetone (15 mL), oven-dried  $K_2CO_3$  (603 mg, 3.59 mmol, 15 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 3h. 2.0 mL of ethyl 2-bromoacetate (36 mmol, 15 eq.) were added and the mixture was refluxed for 48 h. Then 20 mL of water were added and the mixture was extracted with 25 mL of  $CH_2Cl_2$ , dried with  $MgSO_4$ , filtrated, and solvents were removed under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt 6:4 then  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1) to afford the corresponding **108** as a white solid (98 mg, 49.5 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 1.22 (t, 12H,  $^3J_{6-5} = 7.0$  Hz, H-6); 2.55 (s, 4H, H-3); 4.18 (q, 8H,  $^3J_{5-6} = 7.0$ , H-5); 4.79 (s, 8H, H-4); 7.06 (d, 8H,  $^3J_{2-1} = 8.7$  Hz, H-2); 7.65-7.70 (m, 8H, H-1).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 13.49 (CH<sub>3</sub>, C-6); 28.8 (CH<sub>2</sub>, C-3); 60.94 (CH<sub>2</sub>, C-5); 64.35 (CH<sub>2</sub>, C-4); 132.49 (CH, C-1, C-2); 158.02 (Cq, C-O).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 43.10 (s, P=S).

### 1,2-bis(bis(4-(phenoxyacetic acid)phosphirotiol)ethane 100c



To a solution of 182 mg of compound 108 (0.239 mmol, 1eq.) in ethanol (10 mL) was added 1.5 mL of a solution of NaOH (15 % w/w). The resulting mixture was refluxed for 4 h, and ethanol was removed under reduced pressure. The crude mixture was extracted with 2x20 mL of ethyl acetate. The recombined organic phases were dried with MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified using recrystallization in cyclohexane to afford to the corresponding 100c as a white solid (104 mg, 67 %).

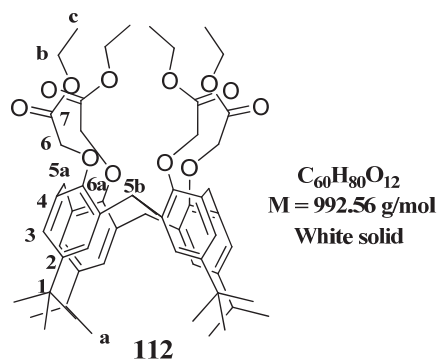
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 2.55 (s, 4H, H-3); 4.18 (s, 8H, H-4); 7.04 (d,  $^3J_{2-1} = 8.7$  Hz 8H, H-2); 7.78 (m, 8H, H-1).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 25.8 (CH<sub>2</sub>, C-3); 64.59 (CH<sub>2</sub>, C-4); 114.79 (Cq, C-P); 134.93 (CH, C-1, C-2); 158.4 (Cq, C-O).

$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 42.79 (s, P=S).

## IV.2. Synthesis of lead ion ligand

### 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetraethoxycarbonylmethyleneoxy-calix[4]arene **112**

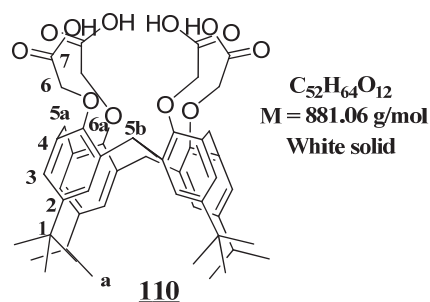


4 g (6.17 mmol, 1 eq.) of 4-*tert*-Butylcalix[4]arene and 12.9 g (92.6 mmol, 15 eq.) of  $K_2CO_3$  in 100 mL of acetone were left under strong stirring for 1h at room temperature. 10.36 g (61.7 mmol, 10 eq.) of ethylbromoacetate were added and the mixture was refluxed for 48h. The solvent was removed under vacuum and the mixture was acidified with 25 mL of HCl 1 M, extracted with 3x30 mL of  $CH_2Cl_2$ . The combined organic phases were dried ( $MgSO_4$ ) and concentrated under reduced pressure, and a white solid was precipitated upon addition of 10 mL methanol. The solid was filtered and dried under vacuum to obtain 4.5 g of compound **112** (75 %).

$^1H$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 1.02 (s, 36H, H-a); 1.22 (t,  $^3J_{c-b} = 7.3$  Hz, 12H, H-c); 3.14 (d,  $^2J = 13.0$  Hz, 4H, H-5a); 4.13 (q,  $^3J_{b-c} = 7.2$  Hz, 8H, H-b); 4.68 (s, 8H, H-6); 4.72 (d,  $^2J = 12.9$  Hz, 4H, H-5b); 6.77 (s, 8H, H-3).

$^{13}C$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 13.67 ( $CH_3$ , C-c); 31.74 ( $CH_2$ , C-5a, C-5b); 31.78 ( $CH_3$ , C-a); 33.58 (Cq, C-1); 60.06 ( $CH_2$ , C-b); 71.30 ( $CH_2$ , C-6); 125.38 (CH, C-3); 133.12 (Cq, C-4); 144.40 (Cq, C-2); 153.35 (Cq, C-6a); 170.54 (Cq, C-7).

### 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetracarboxymethyleneoxy-calix[4]arene **110**

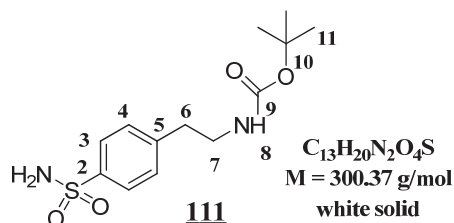


To a 4 g solution of compound **112** (2.28 mmol) in ethanol (50 mL), were added 18 mL of an aqueous solution of NaOH (15 % w/w). The resulting mixture was stirred for 20 mn at room temperature, then refluxed overnight and ethanol was removed under reduced pressure. The mixture was acidified with 25 mL of HCl 0.1 M, and a white solid was precipitated upon addition of 30 mL of cyclohexane. The solid was filtered and dried under vacuum to afford the corresponding **110** as a white solid 6.7 g (94 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.21 (s, 36H, H-a); 4.36 (s, 8H, H-6); 3.41 (d,  $^2J = 14.6$  Hz, 4H, H-5a); 4.59 (d,  $^2J = 11.4$  Hz, 4H, H-5b); 6.93 (s, 8H, H-3).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta$  (ppm):** 29.35 ( $CH_2$ , C-5a, C-5b); 29.85 ( $C_q$ , C-1); 30.45 ( $CH_3$ , C-a); 75.04 ( $CH_2$ , C-6); 125.79 ( $CH$ , C-3); 134.43 ( $C_q$ , C-4); 147.71 ( $C_q$ , C-2); 150.43 ( $C_q$ , C-6a); 174.04 ( $C_q$ , C-7).

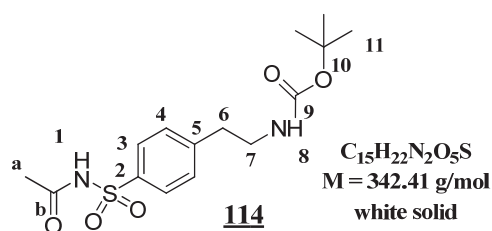
### ***tert*-butyl 4-sulfamoylphenethylcarbamate **111****



To a solution of 5.45 g of di-*tert*-butyl carbonate ( $Boc$ )<sub>2</sub>, (0.025 mol, 1 eq.) in 6 mL of *t*-butanol, were slowly added 5 g of 4-(2-aminoethyl)-benzosulfonamide (0.025 mol, 1 eq.) in 14 mL of *t*-butanol. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the resulted crude solid was washed by cyclohexane and dried under vacuum to afford the corresponding **111** as a white solid 7.1 g (94.5 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm):** 1.34 (s, 9H, H-11); 2.74 (t,  $^2J_{6-7} = 6.4$  Hz, 2H, H-6); 3.14 (t,  $^2J_{6-7} = 6.4$  Hz, 2H, H-7); 7.35 (d,  $^3J_{4-3} = 8.2$  Hz, 2H, H-4); 7.72 (d,  $^3J_{3-4} = 8.2$  Hz, 2H, H-3).

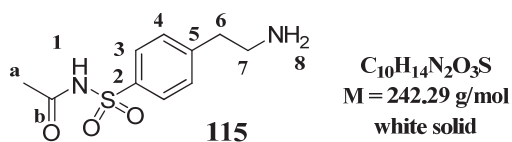
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm):** 31 ( $CH_3$ , C-11); 34.00 ( $CH_2$ , C-6, C-7); 76.33 (C-O, C-10); 127.00 ( $CH$ , C-3, C-4); 136.49 ( $C_q$ , C-2); 148.02 ( $C_q$ , C-5); 151 ( $C_q$ , C-9).

***tert*-butyl 4-(*N*-acetylsulfamoyl)phenethylcarbamate 114**

600 mg of compound **111** (2 mmol, 1 eq.) and 1.5 g of potassium hydride (12.5 mmol, 6 eq.) 35 % in oil were dissolved in 35 mL of anhydrous THF. The mixture was stirred for 30 mn at room temperature, 471 mg of distilled acetyl chloride (6 mmol, 5.44 mL, 3 eq.) were added then stirred overnight. The exceeded KH was neutralized by methanol and solvent was removed under reduced pressure. A yellow solid was precipitated upon addition of a mixture cyclohexane, dichloromethane, acetone 1:1:1; the solid was filtered and dried under vacuum to afford the corresponding **114** as a white solid 500 mg (73 %).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.86 (s, 3H, H-a); 1.29 (s, 9H, H-11); 2.89 (t,  $^3J_{6-7} = 6.9$  Hz, 2H, H-6); 3.40 (t,  $^3J_{7-6} = 6.9$  Hz, 2H, H-7); 7.38 (d,  $^3J_{4-3} = 7.3$  Hz, 2H, H-4); 7.98 (d,  $^2J_{3-4} = 7.4$  Hz, 2H, H-3).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.52 (CH<sub>3</sub>, C-a); 27.79 (CH<sub>3</sub>, C-11); 35.87 (CH<sub>2</sub>, C-6); 44.28 (CH<sub>2</sub>, C-7); 76.53 (C-O, C-10); 128.18 (CH, C-3); 129.34 (CH, C-4); 136.92 (Cq, C-2); 148.62 (Cq, C-5); 151.00 (Cq, C-9).

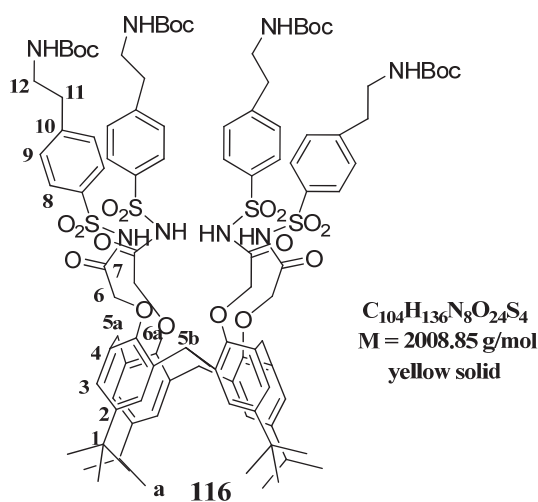
***N*-(4-(2-aminoethyl)phenyl)sulfonyl)acetamide 115**

To a solution of 300 mg (0.872 mmol, 1 eq.) of compound **114** in 15 mL of dichloromethane, were added 134  $\mu$ L (1.74 mmol) of trifluoroacetic acid (96 %). The mixture was stirred at room temperature for 3h. The solvent was removed under reduced pressure and the resulted crude solid was washed by cyclohexane and dried under vacuum to afford the corresponding **115** as a yellow solid 203 mg (96 %).

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 1.89 (s, 3H, H-a); 2.93 (t,  $^3J_{6-7} = 6.4$  Hz, 2H, H-6); 3.13 (t,  $^3J_{7-6} = 6.4$  Hz, 2H, H-7); 7.38 (d,  $^3J_{4-3} = 7.8$  Hz, 2H, H-4); 7.98 (d,  $^3J_{3-4} = 7.1$  Hz, 2H, H-3).

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 22.90 (CH<sub>3</sub>, C-a); 32.68 (CH<sub>2</sub>, C-6); 39.97 (CH<sub>2</sub>, C-7); 127.18 (CH, C-3); 129.09 (CH, C-4); 136.40 (Cq, C-2); 143.74 (Cq, C-5); 173.46 (Cq, C-b).



**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl–25,26,27,28-tetrakis-[(*tert*-butyl-4-phenethylcarbamate)-1-sulfonyl]carbamoylmethoxy]–calix[4]arene 116**

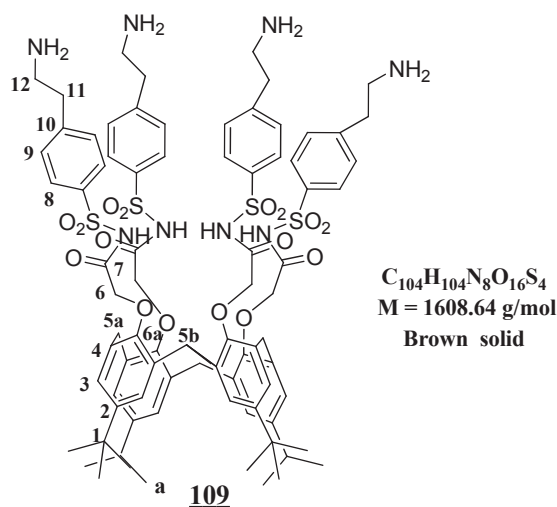
To a solution of compound **110** 2 g (2.27 mol, 1 eq.) in 15 mL of toluene, were added 10.8 mL of oxalyl chloride (56.75 mmol, 6 eq.) diluted in 5 mL of toluene. The mixture was refluxed during 4h30 mn then solvent was quickly removed under reduced pressure. The resulted crude solid was dissolved in 15 mL of THF and added to a solution of compound **111** 4.09 g (13.8 mmol; 6 eq.) and potassium hydride 3.1 g (27.24 mmol, 6 eq, 35 % in mineral oil) in 20 mL of THF. The mixture was stirred at room temperature for 16 hours. Exceeded KH was neutralized by methanol and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting crude solid was purified by chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 6:4 then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1). The obtained yellow solid was washed with HCl 1 M prepared in 20 mL Millipore water to afford the corresponding **116** as a white solid (1.2 g, 33 %).

**F:** 254-256°C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>), δ (ppm):** 1.15 (s, 36H, H-a); 1.34 (s, 36H, H-Boc); 2.79 (m, 8H, H-11); 3.25 (m, 4H, H-5a); 3.34 (m, 8H, H-12); 4.10 (s, 8H, H-6); 4.14 (m, 4H, H-5b); 7.20 (s, 8H, H-3); 7.24-7.46 (m, 8H, H-9); 8.01(d, <sup>3</sup>J<sub>10-9</sub> = 10.1 Hz, 8 H, H-10).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>), δ (ppm):** 29.19 (CH<sub>3</sub>, C-a); 30.74 (CH<sub>2</sub>, C-5a, C-5b, C-11); 31.98 (CH<sub>3</sub>, C-Boc); 36.72 (CH<sub>2</sub>, C-12); 59.64 (CH<sub>2</sub>, C-6); 127.11 (CH, C-3); 128.54 (CH, C-8); 130.50 (CH, C-9).

**ES HRMS:** m/z: calcd for C<sub>104</sub>H<sub>136</sub>O<sub>24</sub>N<sub>8</sub>S<sub>4</sub>Na: 2031.8550; found: 2031.8442 [M+Na<sup>+</sup>].

**5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl–25,26,27,28-tetrakis-[(4-(2-aminoethyl)phenyl-1-sulfonyl)carbamoylmethoxy]–calix[4]arene 109**

To a solution of 500 mg (0.31 mmol, 1.1 eq.) of compound **116** in dichloromethane (20 mL), were added 19.1 mL (2.48 mmol, 8 eq.) of trifluoroacetic acid (96 %). The mixture was stirred at room temperature 3 hours under argon. The solvent was removed under reduced pressure and the resulted crude solid was washed by cyclohexane and dried under vacuum to afford the corresponding **109** as a brown solid 427 mg, (85.5 %).

**F:** 220-226°C

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm):** 1.15 (s, 36 H, H-a); 2.79 (m, 8H, H-11); 3.25 (m, 4H, H-5a); 3.34 (m, 8H, H-12); 4.10 (s, 8H, H-6); 4.14 (m, 4H, H-5b); 7.20 (s, 8H, H-3, H-2); 7.22-7.43 (m, 8H, H-9); 8.01(d,  $^3J_{10-9} = 10.1 \text{ Hz}$ , 8H, H-10).

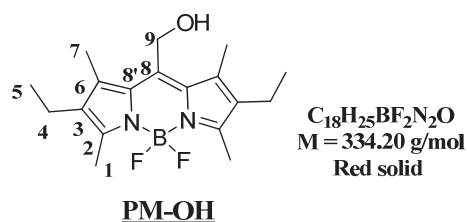
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm):** 30.33 ( $\text{CH}_3$ , C-a); 30.68 ( $\text{CH}_2$ , C-5); 33.08 ( $\text{CH}_2$ , C-11); 37.96 ( $\text{CH}_2$ , C-12); 49.20 ( $\text{CH}_2$ , C-6); 125.59 (CH, C-3); 130.06 (CH, C-8); 130.89 (CH, C-9).

**ES HRMS:**  $m/z$ : calcd for  $C_{84}H_{104}O_{16}N_8S_4Na$ : 1608.6431; found: 1631.6331 [ $M+Na^+$ ].

# V.Chapter V: Porous material for mercury and lead detection

## V.1. Synthesis of the bodipy derivatives

### Synthesis of PM-OH:



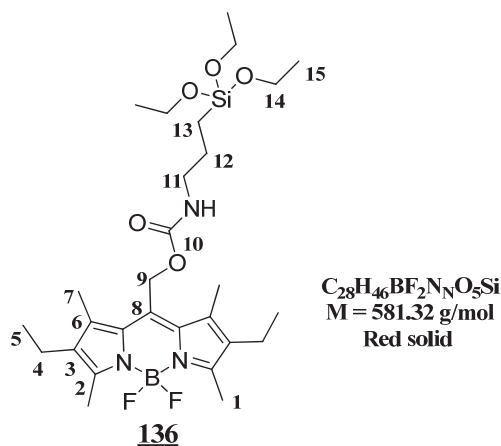
To a solution of 500 mg (1.32 mmol, 1 eq.) of PM 605 dye in 900 mL of THF/H<sub>2</sub>O mixture (1/1 v:v), were added 745 mg (13.28 mmol, 10 eq.) of KOH. After stirring for 1h at room temperature, THF was removed under vacuum. After neutralisation of the medium with 100 mL of NH<sub>4</sub>Cl, the aqueous phase was extracted with 3 × 100 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and the crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/cyclohexane 80:20) to afford 330 mg of the desired BDP-OH (75 %).

F: 224-226°C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 1.05 (t, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 7.8 Hz, 6H, H-5); 2.34-2.45 (m, 12H, H-1, H-7); 2.50-2.52 (m, 4H, H-4); 4.92 (s, 2H, H-9).

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 12.72 (CH<sub>3</sub>, C-5); 14.79 (CH<sub>2</sub>, C-4); 17.61 (CH<sub>3</sub>, C-1, C-7); 56.41 (CH<sub>2</sub>, C-9); 108.55 (Cq, C-3); 118.89 (Cq, C-6); 123.88 (Cq, C-8'); 134.98 (Cq, C-8); 146.53 (Cq, C-3).

### Synthesis of PM-Si 136:



To a solution of 330 mg (0.99 mmol, 1 eq.) of PM-OH in 25 mL of anhydrous toluene, were added 155.8 mg (1.28 mmol, 1.3 eq.) of propyltriethoxysilane isocyanate. After refluxing for 18h, the solvent was removed under vacuum and the resulted crude solid was purified by chromatography  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  then  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  98:02 to afford the corresponding **136** as a red solid (213 mg, 37 %).

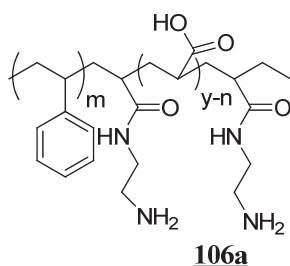
**F:** 132-135°C

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 1.05 (t,  $^3J_{5-4} = 7.33$  Hz, 6H, H-5); 1.25 (t,  $^3J_{15-14} = 6.87$  Hz, 9H, H-15); 2.29 (s, 6H, H-7); 2.38-2.40 (m, 10H, H-4, H-11, H-12, H-13); 2.50 (s, 6H, H-1); 3.82 (q,  $^3J_{14-15} = 6.87$  Hz, 6H, H-14); 5.07 (s, 2H, H-9).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm):** 12.22 ( $\text{CH}_3$ , C-5); 14.31 ( $\text{CH}_2$ , C-4); 18.31-18.52 ( $\text{CH}_2$ , C-7, C15, C1); 35.82 ( $\text{CH}_2$ , C-12); 40.02 ( $\text{CH}_2$ , C-13); 57.52-57.80 ( $\text{CH}_2$ , C-9, C-13, C-14); 108.53 (Cq, C-3); 118.87 (Cq, C-6); 123.83 (Cq, C-8 $^{\prime}$ ); 134.98 (Cq, C-8); 146.54 (Cq, C-3); 156.03 (Cq, C-10).

## V.2. Modification of poly(styrene-*b*-acrylic acid)

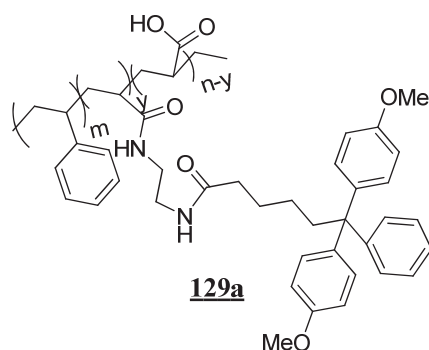
### Volume Amidation of poly(styrene-*b*-acrylic acid) **106a**



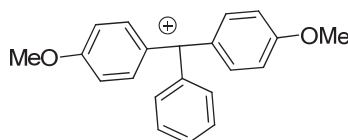
To a solution of 3 g (0,364 mmol 1 eq) of commercial product PS-*b*-PAA in 40 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , were added 382 mg (2 mmol, 5,5 éq) of ethyl-3-3 dimethyl aminopropyl carbodiimide (EDC), and 410 mg (2 mmol, 2 éq) of 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT). The mixture was stirred 45 mn under argon at room temperature. 246 mg of ethylene diamine (4,1 mmol) were added, and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. 20 mL of  $\text{NaHCO}_3$  were added, then the mixture was extracted with 15 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried with  $\text{MgSO}_4$ , filtrated, and solvent was removed under reduced pressure to afford the corresponding product **106a** as a white solid 1.1 g.

**IR ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ):** 1550 (COOH); 1650 (OH); 1725 (CONH).

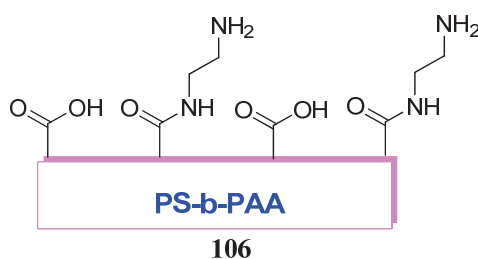
**Elemental analysis:** 8.36 % of acid groups have reacted with ethylene diamine.

**Amine quantification 129a**

To a solution of 3.8 mg of s-SDTB in 5 mL of THF were added 60 mg of compound **106a**. The mixture was stirred during 1 hour under argon at room temperature then the solvent was removed under reduced pressure. The resulted solid was washed by 25 mL water and dried under vacuum to afford the corresponding **129a** as a red solid 20 mg.



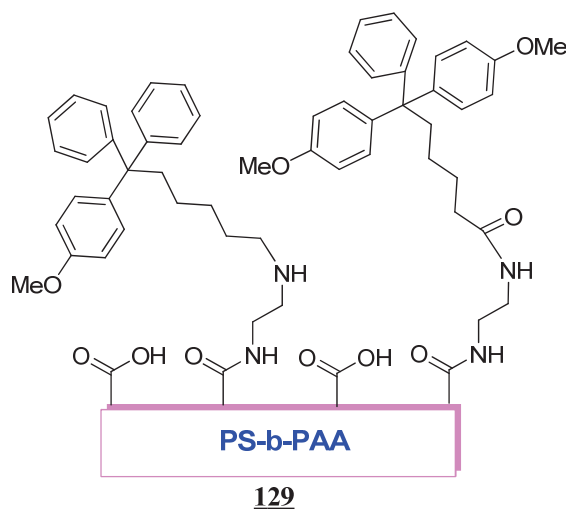
14 mg of compound **129a** were dissolved in 5 mL of perchlorid acid at 35 % the mixture was stirred during 1hour at room temperature then filtered. The measure of the absorbance of the resulting cation 4,4'-(phenylmethylene)bis(methoxybenzene), ( $\epsilon = 70000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) shows that 8.36 % of carboxylic acid groups were converted to amide.

**Surface Amidation of poly(styrene-*b*-acrylic acid) 106**

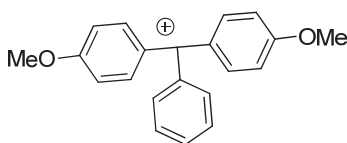
A solution of PS-*b*-PAA was prepared by dissolving 100 mg of PS-*b*-PAA in a mixture of 1 mL dioxane, 1 mL of toluene and stirred over night. A film of the block copolymer was prepared on a glass plate by centrifugation and dried at 50°C during 12 h. The film was immersed during 2 hours in a solution of 5 mL of ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (80.5 mg, 0.1M), 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT) (102.5 mg, 0.1M) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then washed twice with millipore water. After 6 hours of drying at 75 °C, the infrared spectrum shows that amide function was formed with a peak at 1725 cm<sup>-1</sup>.

IR ( $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 1550 (COOH); 1650 (OH); 1725 (CONH).

### Amine quantification **129**

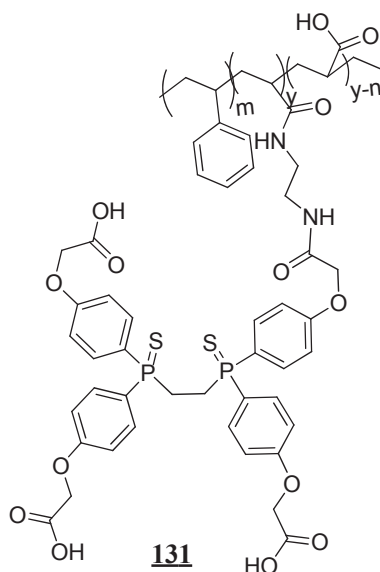


A film of compound **106** was immersed during 1 hour in a solution of 3.8 mg of s-SDTB in 5 mL of Millipore water then washed twice with Millipore water and dried under argon to afford the corresponding product **129**.



A film of compound **129** was immersed in 5 mL perchloric acid at 35 % during 1 hour at room temperature then unstuck film was dissolved in acetonitrile and filtered. The measure of the absorbance of the resulting cation 4,4'-(phenylmethylene)bis(methoxybenzene) at 497 nm ( $\epsilon = 70000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) shows that  $1,25 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$  carboxylic acid on film were converted to amide.

### V.3. Porous material for mercury detection **131**

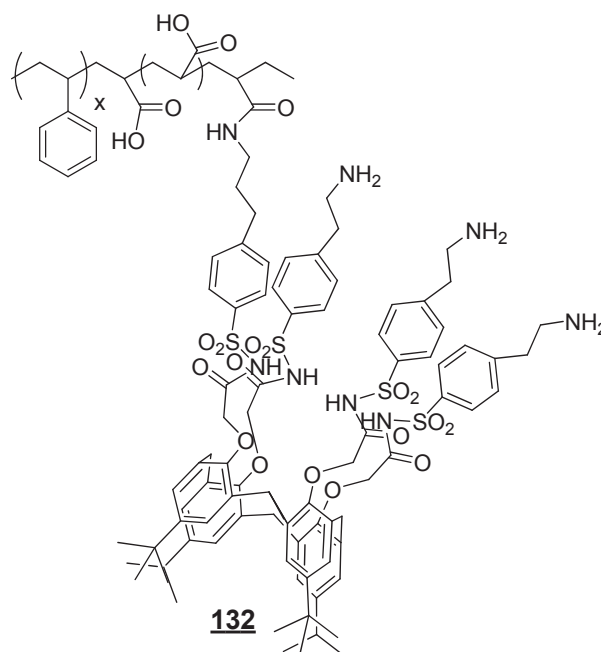


To a solution of 1 g of compound **100c** in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , were added 191 mg of ethyl-3,3-dimethylaminopropylcarbodiimide (EDC), 205 mg of 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT). The mixture was stirred 45 mn under argon at room temperature. 226 mg of compound **106a** were added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then solvent was removed under reduced pressure; the resulting solid was washed with 20 mL of water and dried under vacuum to afford the corresponding product **131** as a white solide  $m = 1.058$  g.

**IR** ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 725 (P=S); 1550 (COOH); 1650 (OH); 1725 (CONH).

**Elemental analysis:** 14.2 % of amidated PS-b-PAA were grafted by the mercury ligand

#### V.4. Porous material for lead detection **132**



To a solution of 800 mg of compound **109** in 15 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , were added 191 mg of Ethyl-3-3 dimethyl aminopropyl carbodiimide (EDC), 205 mg of 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT). The mixture was stirred during 1 h under argon at room temperature. 72 mg of compound **105** were added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then the solvent was removed under reduced pressure; the resulting solid was washed with 20 mL of water and dried under vacuum to afford the corresponding product **132** as a brown solid  $m = 780$  mg.

**Elemental analysis:** 18.9 % of amidated PS-b-PAA were grafted by the lead ion ligand



## VI. Protocol for the determination of stability constants of the complex of fluoroionophore and metal ion

Hellma quartz cells ( $3.0 \times 1.0 \text{ cm}^2$ ) were used for the fluorescence and UV measurements. The UV measurements were carried out in Uvikon 943, the spectra ranges from 190 to 900 nm, the precision is 0.1 nm. Emission spectra were carried out in two kinds of Jobin-Yvon spectrofluorimeters, linked with a computer under Windows XP system and DATAMax V.1.03 software of Galactic Industries Corporation & Instruments S.A.

- **SPEX 1681 Fluorolog spectrofluorimeter:** It is equipped with double monochromators (excitation and emission), which are made of 1200 groves  $\text{mm}^{-1}$  (the dispersion is  $3.77 \text{ nm mm}^{-1}$ ) and are corrected for the photomultiplier response. A 450 W xenon arc lamp was used as the light source. And the spectral range is from 200 to 900 nm. The pass bands of excitation and emission monochromators are adjusted individually by the slits from 0.5 to 5.0 mm. The excitation and emission beam can be polarized independently.

- **FluoroMax-3:** The light source in this case was a Xenon arc lamp (150 W). The spectral range ranged from 200 to 900 nm. The band pass of the monochromator of excitation and emission were adjusted separately by computer (0.5 to 10 nm).

The stability constants of metal ion complex had been determined by spectrophotometric measurement. The fluorescent spectra were registered by progressively increasing the concentration of metal ion in a ligand solution with concentration of  $C_0$ . The concentration of ligand was kept unchanged in  $C_0$ , when adding the metal ion. The ionic force is not fixed by an external salt to prevent an additional complex between the salt and the ligand. When the excitation of fluorescence is situated out of the isosbestic point, the fluorescence spectra are systematically corrected by the evolution of absorbance (except special mention). As a consequence, the variation of fluorescence intensity are independent of the variation of absorbance. The thermodynamical constants were determined by using the Specfit Global Analysis System V3.0 for 32-bit Windows system, which provided the complexation constants with a good accuracy. SPECFIT is a tool for fitting complex models of emission lines, absorption lines, and continua to 1-dimensional spectra. This software uses singular value decomposition and non-linear regression modeling by the Levenberg-Marquardt method.

## VII. Protocol for the fabrication of microchips for lead, mercury and cadmium detection

### VII.1. Materials and equipments

Materials: SU8 photoresist (MicroChem, Newton, MA), SU8 photoresist developer (MicroChem), Acetone, Isopropyl alcohol, Sylgard 184 Silicone Kit (Dow Corning, Mid-land, MI), Silicon (Si) wafer. Mold release: hexamethyldisilazane. Equipment: UV mask aligner (Karl Suss MJB 3), Photoresist spinner (Karl Suss Model CT62), Oven or hot plate.

### VII.2. Fabrication of bilayered microchannel mold

The primary resin used is the negative photoresist SU8 (GM 1070, Gersteltec, Switzerland). The structure of SU8 is as Schéma 1. The main steps of our process are: mask manufacture, spin-coating of the SU8 resin on a silicon wafer, soft bake, UV exposure, post-exposure bake, development, rinsing and drying. Our protocol is optimized for definition of two layers (75  $\mu\text{m}$  microchannel + 25  $\mu\text{m}$  staggered herringbone mixer) SU8 structures on a silicon wafer.

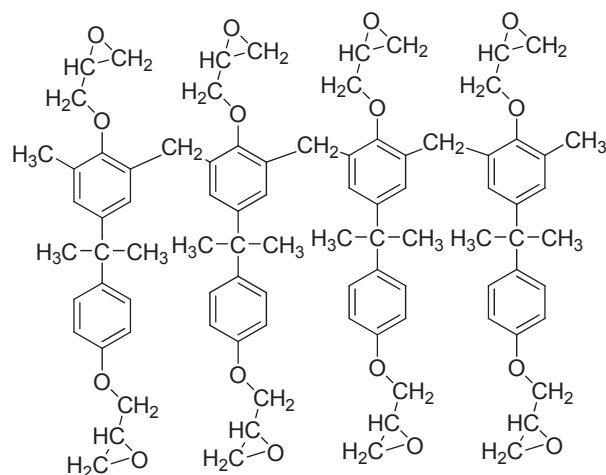


Schéma 1 : The chemical structure of SU-8

#### VII.2.a. Mask manufacture

The masks of the microfluidic devices (Layer 1) and staggered herringbone mixer (SHM) (Layer 2) are designed with Adobe Illustrator. Although glass or quartz masks are used for fabrication of devices with small features, a transparency (much cheaper) can be used as a mask for devices

with relatively large feature sizes ( $>50\ \mu\text{m}$ ). The mask design is simply printed with a high-resolution printer on a regular transparency sheet.

### *VII.2.b. Spin-coating for the first layer*

Center the wafer on the photoresist spinner chuck and apply approximately 1 mL of SU8 photoresist per inch of substrate diameter. To spread the resist, ramp the speed to 2800 r.p.m. at an acceleration of  $300\ \text{r.p.m.s}^{-1}$  and hold for 30 s. The thickness of the microstructure depends on the formulation of SU8 and the final spin speed. The appropriate thickness can be determined using the manufacturer's data sheets for process guidelines. The final thickness of about  $75\ \mu\text{m}$  is obtained.

### *VII.2.c. Soft bake*

To evaporate the solvent and harden the photoresist, the wafer must be soft-baked. To avoid cracking the resist, baking is performed as a two-step process at  $65\ ^\circ\text{C}$  and  $95\ ^\circ\text{C}$ . Bake times are determined by the thickness of the SU8 film. For our  $75\ \mu\text{m}$  thick layer, place the wafer on a  $65\ ^\circ\text{C}$  hot-plate for 1 min, followed by 8 min on a  $95\ ^\circ\text{C}$  hot-plate. Allow the wafer to cool down to room temperature.

### *VII.2.d. Exposure*

Transparency of Layer 1 was stuck on a glass plate as a photomask. Place the photomask on the mask holder of the UV mask aligner (transparency side down). Place the wafer on the chuck of the mask aligner and bring the wafer into contact with the photomask. For  $75\ \mu\text{m}$  thick layer, the negatively-patterned photoresist is obtained through the UV exposure with aligner (Karl Suss MA6, Germany) for 45 s, where the power of  $8\ \text{mW/cm}^2$  is applied with wavelength of  $365\ \text{nm}$  (i-line).

### *VII.2.e. Post bake*

After exposure, the SU8 which has been exposed to UV light is cross-linked by performing a two-step contact bake process. Bake times are determined by the thickness of the SU8 film. For our  $75\ \mu\text{m}$  thick microchannel, place the wafer on a  $65\ ^\circ\text{C}$  hot-plate for 1 min, followed by 12 min on a  $95\ ^\circ\text{C}$  hot-plate. Allow the wafer to cool to room temperature.

### *VII.2.f. Spin coating for the second layer*

To fabricate the second layer of the staggered herringbone mixer, coat first layer with an additional layer of photoresist. Choose an SU8 formulation based on the height of the desired feature. Spin speed and soft bake times will vary based on SU8 formulation and film thickness.

For our 25  $\mu\text{m}$  SHM, spread the SU8 2025 resist at 600 r.p.m. at an acceleration of 300 r.p.m. $\cdot\text{s}^{-1}$  for 5 s, and then ramp to a final speed of 3,000 r.p.m. at an acceleration of 3000 r.p.m.  $\cdot\text{s}^{-1}$  and hold for 25 s.

*VII.2.g. Soft bake*

For a 75  $\mu\text{m}$  thick microchannel plus a 25  $\mu\text{m}$  SHM, place the wafer on a 65°C hot-plate for 3 min followed by 9 min on a 95°C hot-plate. Allow the wafer to cool to room temperature.

*VII.2.h. Exposure*

Using the UV mask aligner, align the alignment markers on the Layer 2 photomask to the alignment marks on the wafer from Layer 1. For 25  $\mu\text{m}$  thick layer 2, the SHM structure is obtained through the UV exposure with aligner (Karl Suss MA6, Germany) for 25 s, where the power of 8 mW/cm<sup>2</sup> is applied with wavelength of 365 nm (i-line).

*VII.2.i. Post bake*

Perform a post-exposure bake (for a 25  $\mu\text{m}$  thick SHM, 65°C for 1 min followed by 95°C) for 7 min. Allow the wafer to cool to room temperature.

*VII.2.j. Development*

Develop the cross-linked SU8 by immersing in SU8 developer. Approximate developing times are based on SU8 film thickness. For a 75  $\mu\text{m}$  thickness layer plus a 25  $\mu\text{m}$  thickness SHM, SU8 is developed for 14 min. Allow additional development time for each layer of features. Rinse the wafer with isopropyl alcohol. Dry with nitrogen. Check the microchannel dimensions using a microscope and profilometer.

### VII.3. Replica of PDMS chip and embedded optical fiber

To produce a replica, the most common PDMS elastomers, Sylgardr184 from DowCorningr, was used. Sylgard is a two part resin system containing vinyl groups (partA) and hydrosiloxane groups (part B) shown in Schéma 2 below. Two components were mixed in the volume ratio of 10:1 (A:B), and poured on the wafer mold.

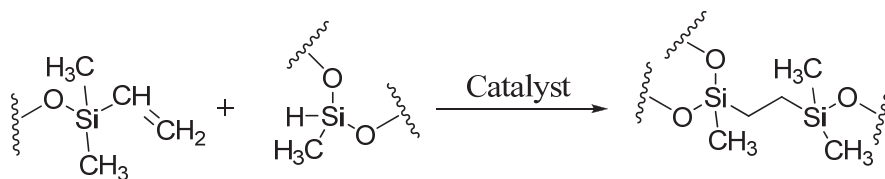


Schéma 2 : PDMS crosslinking

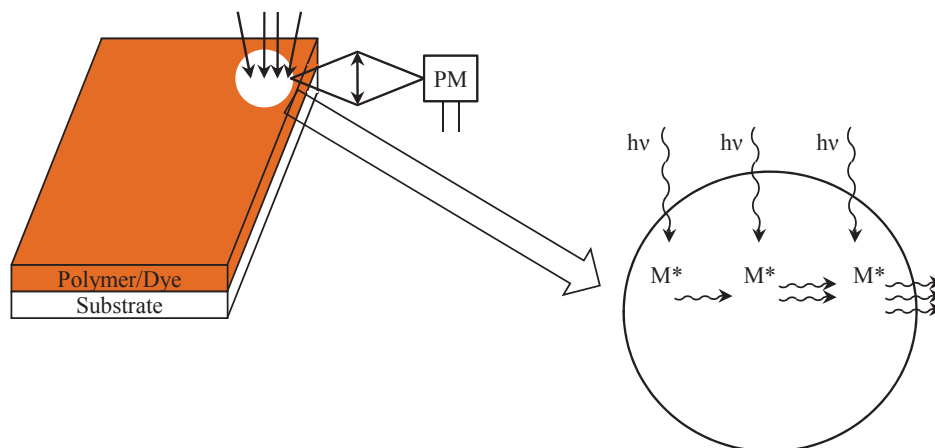
Mixing the two resin components together leads to a cross-linked network of dimethylsiloxane groups. Because this material is flexible, it can be unmolded (peeled off) from the SU-8 master, leaving the master intact and ready to produce another device. After bubbles are eliminated at 100 torr for 30 min evacuation, the PDMS is cured at 75°C for 2 h. The PDMS replica is peeled off from the master, and then the replica and glass coverslip (Marienfeld Micro Slides, Germany) are activated by O<sub>2</sub> plasma (HAR-RICK PLASMA CLEANER/ STERILIZER (PDC-001) for 20 s and sealed each other. A soft bake of the microdevice is then made at 75°C for 5 min. Centimeter lengths of multi-mode optical fiber (Corning, USA) were prepared, stripped of their protective plastic layers, by immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 100 °C. The multi-mode optical fibers were inserted into the embedded optical-fiber channels until their frontends made contact with the thin walls between the fiber channels and the sample channel

## **VII.4. Ligand grafting on the wall of the device**

In the microfluidic device obtained by sticking the PDMS substrate on glass slide by plasma O<sub>2</sub> treatment, a pure solution of 3-(triethoxysilyl)propyl isocyanate was quickly injected. After 30 min of reaction at room temperature, the excess of 3-(triethoxysilyl)propyl isocyanate was purged with compressed air. The wall of the microfluidic device was cleaned three times with 1 mL of anhydrous DMF then purged with compressed air. 6 mg of dye (DANS-1-OH or CalixDANS-3-OH) and 1 mg of CuCl were dissolved in 0.5 mL of anhydrous DMF. The solution was injected in the microfluidic device and the system was heated on a hotplate at 70°C overnight. The excess of dye was removed by cleaning the device four times with 1 mL of DMF and three times with 1 mL of Millipore water. The microfluidic device is then purged with air. The efficiency of the functionalization was observed under UV light.

## **VII.5. Amplified spontaneous emission (ASE)**

Amplified spontaneous emission (ASE) or superluminescence is light produced by spontaneous emission, that has been optically amplified by the process of stimulated emission in a gain medium. ASE is produced when a laser gain medium is pumped to produce a population inversion. If there is a feedback of the ASE by an optical cavity, it may produce laser operation if the lasing threshold is reached.



**Figure 1 :** *Scheme of ASE set-up*

The scheme of an ASE experiment is shown in Figure 1. A cw Nd/YAG laser at 532 nm is focussed on the edge of the film of host/guest (polymer/laser dye) system which is casted on the substrate of a silicon plate covered by a thin film of silica. The emission is observed through the edge of the film. The polymer layer acts as an optical waveguide in which spontaneous emission produced by excitation of the dye molecules is amplified by a process of stimulated emission during the propagation of the beam in the waveguide.



# *Publications et communications*

## **Publications dans des revues scientifiques**

**D. Faye**, J-P Lefevre, J.A. Delaire and I. Leray «*A new selective lead sensor based on a fluorescent molecular probe grafted on a PDMS microfluidic chip*» *Journal of Photochemistry and Photobiology A* **article soumis**

**T. Wu**, L. Zhao, D. Faye, J-P Lefevre, J.Delaire and I. Leray «*A novel fluorimetric sensor for the detection of lead in water by combining a precolumn adsorption and a microfluidic device* » *A article soumis*

## **Communications orales à des congrès et symposium**

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P., Delaire J., Wu T., Lozenko S., Ledoux I, Lebental M., Lautru J., Zyss J. «**Fabrication and evaluation of the heavy metal ions sensor in microfluidic device**» European microfluidique meeting Luzern, Suisse, March 09-10, 2011.

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P., Delaire J., Wu T., Lozenko S., Ledoux I, Lebental M., Lautru J., Zyss J. « **Détection fluorimétrique des ions Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup> en milieu aqueux** » 11<sup>ème</sup> Journées Francophones des Jeunes Physico-Chimistes Grenoble 17-23 octobre 2010.

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P., Delaire J. «**Lead ion detection in a microfluidic device by calixDANS-3-OH**» European microfluidique meeting Manchester, Angleterre, October 12-13, 2011.

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P., Delaire J., Wu T., Lozenko S., Ledoux I, Lebental M., Lautru J., Zyss J. «**Synthesis of fluorescent sensors for mercury, lead and cadmium detection in water**» JCO- journées de chimie organique 2010, Palaiseau, France, September 21-23, 2010.

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P. , Delaire J. «**Synthesis and grafting specific ligands for selective detection of heavy metal ions**» European microfluidique meeting Hanovre, Allemagne, September 15-16, 2009.

**Lozenko S.**, Faye D, Djellali N, Lebental M, Lautru J, Lefevre J-P, Delaire J., Leray I, Wu T., Zyss J, « **Realisation of chemical and bio-sensors based on active polymer microcavities** », 5<sup>ème</sup> Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Le Mans, France, 26-27 January 2010.

**Lozenko S.**, Faye D, Djellali N, Lebental M, Lautru J, Lefevre J-P, Delaire J, Leray I, Wu T., Zyss J, Sergey Ledoux I. « **Specific (bio-)chemical sensing with organic microlasers** ». CLEO 2011, Munich, 23-26 May 2011.



## Communications par affiche à des congrès et symposium

**Faye D.**, Leray I., Lefevre J-P., Delaire J., Wu T., Lozenko S., Ledoux I, Lebental M., Lautru J., Zyss J. « **Micro-laser detection of heavy metal ions by organics nanoporous compounds in a microfluidic channel** » 2<sup>nd</sup> France-Italy Symposium on Photosciences, December 7-10, 2010

**Faye D.**, Wu T., Lefevre J-P., Delaire J., Leray I., Génot V.« **Fluorimetric detection of lead ion in Microfluidic Reactors** » XXIII<sup>ème</sup> IUPAC Symposium on Photochemistry July 11-16, 2010 Ferrara, Italy.