



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR Sciences Exactes et Naturelles

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Physique - Nanosciences

Par

Nicolas Bouchonville

Soutenance le 12 Décembre 2011

Nouveau nano-matériau hybride – nanocristaux de CdSe/ZnS couplés à la bactériorhodopsine – pour des applications en optoélectronique et en biologie : élaboration et caractérisations structurale et optique.

Directeurs de thèse

Pr. Michel Troyon et Pr. Michael Molinari

Jury :

Jean-Pierre Aimé	DR CNRS (CBMN, Bordeaux)	Rapporteur
Pierre-Emmanuel Milhiet	DR CNRS (CBS, Montpellier)	Rapporteur
Stefan Haacke	PR (IPCMS, Strasbourg)	Examinateur
Jérôme Plain	PR (LNIO, Troyes)	Examinateur
Michel Troyon	PR (LMEN, Reims)	Directeur
Michaël Molinari	PR (LMEN, Reims)	Co-Directeur

N° attribué par la bibliothèque

|| R | E | I | | | | |

A mes parents, à Elise

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Jean-Pierre Aimé et Pierre-Emmanuel Milhiet pour leur travail de rapporteur et pour les remarques pertinentes et constructives qu'ils ne manqueront pas d'apporter sur mon manuscrit, ainsi que les Professeurs Stefan Haacke et Jérôme Plain pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je tiens également à remercier le Pr. Michel Troyon qui m'a accueilli au Laboratoire de Microscopies et d'Etude de Nanostructures (LMEN) qu'il dirige, ainsi que pour son encadrement. Mes sincères remerciements vont également à l'égard du Pr Igor Nabiev, qui m'a très bien intégré dans ce projet, qui m'a apporté énormément de connaissances et toute sa clairvoyance scientifique au long de ses trois années passées à travailler ensemble.

Je remercie également le Pr Michael Molinari pour son implication dans mon travail, son aide souvent précieuse et le temps qu'il a bien voulu m'accorder pour co-encadrer cette thèse. Je voudrais aussi lui témoigner toute ma gratitude pour toute l'expérience qu'il a bien voulu partager avec moi, ainsi que pour les nombreux problèmes de tout ordre qu'il m'a aidé à résoudre, son apport scientifique ayant été d'une grande aide durant ma thèse.

Mes remerciements se portent également à Alyona Sukhanova et au Pr Mikhaïl Artemyev pour la transmission de leur savoir-faire en termes de solubilisation et de caractérisation de QDs, ainsi que pour l'aide appréciable qu'ils ont pu m'apporter concernant les solutions colloïdales et les problèmes récurrents rencontrés avec ce type de matériel.

Je souhaite remercier Nicolas Dumélié pour sa joie de vivre, mais surtout pour son implication dans le traitement de mes images AFM et dans la modélisation de l'effet FRET. Je remercie également Franck Delavoie pour les images MET et pour son aide en préparation d'échantillons biologiques, Christine Terryn pour les mesures de FLIM qu'elle a effectué ainsi que Gaëlle Roullin et Thomas Courant pour leur aide avec le Zeta Sizer et la caractérisation de mes particules. Mes remerciements s'adressent aussi à Gilles Rousserie, autre doctorant effectuant sa thèse dans l'EA 3798 de l'URCA qui m'a aidé pour certains problèmes de biologie et pour la biotinylation de mes membranes.

Je souhaite également associer à ce travail, tous mes collègues qui m'ont fait passer trois années très agréables. Je garderai en souvenir toutes ces discussions, parfois enflammées, scientifiques ou non, mais qui m'ont permis de travailler dans une atmosphère saine et

détendue. Ils resteront pour toujours mes premiers collègues et j'espère des amis. Ils ont tous un jour ou l'autre, contribué à cette thèse directement ou indirectement. Ils ont été d'un bon soutien dans les moments de doute et m'ont fait part de leur expérience pour les passer sans trop de difficultés. Pour tout cela, MERCI à tous.

Mes pensées vont également vers toutes les personnes qui ont dû me supporter pendant ces trois années, je pense bien sûr à ma famille. Certes, elle n'a toujours rien compris à mon travail et semble parfois douter que s'en est un, mais elle a mis un point d'honneur à être présente pour moi et m'encourager dans la difficile entreprise qu'est le travail de thèse. Enfin, je ne puis finir sans remercier celle qui partage ma vie depuis plusieurs années maintenant et qui était à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments de ce doctorat. Pour tout ce travail de l'ombre qu'elle seule connaît et tout simplement pour ce qu'elle est et représente pour moi, je remercie tout particulièrement Mlle Elise Cotelle.

Nicolas Bouchonville

Résumé

Ce travail est consacré à l'élaboration et à la caractérisation d'un nouveau matériau hybride présentant des propriétés de transfert d'énergie, à base de la protéine photochromique bactériorhodopsine (bR) acceptrice d'énergie et de boîtes quantiques (QDs) de CdSe/ZnS fluorescentes donneuses d'énergie. Le but est d'essayer d'améliorer et d'utiliser les propriétés photochromiques et photochimiques de la bR en utilisant un transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) qui peut exister avec des QDs semiconductrices. Ce nouveau matériau hybride pourrait servir dans divers domaines, tels que des commutateurs optiques ou les cellules photovoltaïques.

Les propriétés physiques d'un tel composé et son efficacité dépendant fortement de sa structure, ce travail à consister à élaborer le complexe bR/QD et à le caractériser par microscopie à force atomique (AFM) et par spectrométries optiques (fluorescence, absorption) afin de mettre en évidence un éventuel effet FRET entre bR/QDs. Nous avons montré qu'en modifiant la charge de surface des QDs nous pouvons optimiser l'efficacité du FRET. Cet effet provient d'une modification des forces électrostatiques entraînant un arrangement des QDs différent à la surface des membranes en fonction de leur charge de surface. En renforçant la liaison bR/QD à l'aide de biotine et de streptavidine, nous avons atteint une efficacité maximale de FRET de 80 %.

Lors de nombreuses expériences que nous avons menées, nous avons montré par AFM et dichroïsme circulaire que la présence de QDs accélère fortement le processus de monomérisation de la bR par du détergent ce qui pourrait avoir des applications en biologie.

Mots-clés : Bactériorhodopsine, membrane pourpre, quantum dots, FRET, Microscopie à force atomique, photoluminescence, dichroïsme circulaire

Abstract

In this work, we built and characterized a new hybrid material with energy transfer properties made from photochromic protein Bacteriorhodopsin (bR) which is the energy acceptor and CdSe/ZnS fluorescent quantum dots (QDs) which are the energy donor. Our aim was to improve the photochromic and photo-physical bR properties by using a Förster resonance energy transfer (FRET) which should exist in presence of semiconductor QDs. This new hybrid material should have applications in many fields such as optical switching or photovoltaics.

Since optical properties and efficiency of such a material are highly dependent of its structure, our work was to develop and characterize bR/QD complex by atomic force microscopy (AFM) and optical spectrometries (fluorescence, absorption) in order to demonstrate FRET between bR and QDs. By tuning QDs surface charges, we proved that we were able to optimize FRET, by optimization of the electrostatic interactions between bR and QDs. This effect was due to a better organization of QDs on the membrane surface when interactions were optimized. We also showed that when QD and bR are linked by biotin streptavidin link they revealed the maximum FRET efficiency of 80 %.

During all these experiments, we showed that QDs could induce a quicker detergent monomerization of bR. This is supported by AFM images and circular dichroism measurements. This effect should find applications in biology.

Keywords: Bactériorhodopsin, purple membranes, quantum dots, FRET, atomic force microscopy, photoluminescence, circular dichroïsm

Liste des abréviations

ADP : Adénosine di-phosphate

ATP : Adénosine tri-phosphate

AFM : Microscope à force Atomique (Atomic Force Microscope)

BC : Bande de Conduction

bR(s) : Bactériorhodopsine(s)

BSA : Sérum Albumine Bovin (Bovine Serum Albumin)

BV : Bande de Valence

C-AFM : Microscopie à force atomique avec sonde conductrice (Conductive AFM)

CD : Dichroïsme Circulaire (Circular Dichroism)

D-A : Donneur- Accepteur

DOR : Dispersion Optique Rotatoire

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)

FLIM : Microscopie de Temps de Vie de Fluorescence (fluorescence lifetime imaging microscopy)

FRET : Transfert d'Énergie par Résonance de Förster (Förster Resonance Energy Transfer)

FWHM : Largeur à mi-hauteur (Full Width Half Maximum)

ML : Monocouche (monolayer)

PEG : Polyéthylène Glycol

PL : Photoluminescence

PM(s) : Membrane(s) Pourpre(s) (purple membrane)

PVA : Poly(Vinyl Alcohol)

QD(s) : Boîte(s) Quantique(s) (quantum dots)

QY : Rendement Quantique (Quantum Yield)

SNOM : Microscope Optique à Champ Proche (scanning near-field optical microscopy)

SR I ou II : Senseur Rhodopsine I et II

STM : Microscope à Effet Tunnel (scanning tunneling microscopy)

TF : Transformée de Fourier

TOPO : Tri-n-octyl Phosphinoxide

WM(s) : Membrane(s) Blanche(s) (white membrane)

WRE : cycle « écriture-lecture-

Table des matières

Remerciements.....	iii
Résumé.....	v
Abstract	vi
Liste des abréviations.....	vii
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux ou des illustrations	xi
Liste des annexes	xvii
Introduction.....	1
Première partie : Etude Bibliographique.....	3
I. Contexte scientifique	4
II. La Bactériorhodopsine.....	9
A. Généralités sur la bR	9
B. Applications	15
III. Les boîtes quantiques à base de semi-conducteurs	28
A. Généralités sur les QDs	28
B. Applications	40
IV. Principe de fonctionnement du matériau hybride	46
A. Formulation générale du FRET.....	46
B. Schéma de fonctionnement du composant.....	49
Deuxième partie : Matériels et Méthodes.....	52
I. Matériels	53
A. Les membranes.....	53
B. Les Quantum dots.....	54
II. Caractérisation optique.....	59

A.	La spectrométrie d'absorption UV-visible.....	59
B.	Le spectrofluorimètre	62
C.	Mesure par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	64
D.	Microscopie à temps de vie de Fluorescence (FLIM).....	64
E.	Dichroïsme circulaire	66
III.	Microscopie à force atomique	70
A.	Microscope et pointes.....	70
B.	Imagerie de la bR	71
C.	Protocole d'imagerie du complexe bR/QD	78

Troisième partie : Mise en évidence et optimisation du transfert d'énergie par effet FRET entre QDs et bR

I.	Mise en évidence du transfert d'énergie entre QDs et bR – effet FRET.....	84
A.	Transfert d'énergie entre bR et QD.....	84
B.	Influence des PMs sur le temps de vie de PL des QDs.....	89
C.	Influence de J sur le transfert d'énergie.....	91
D.	Influence de la distance bR/QD	95
E.	Conclusion.....	101
II.	Optimisation des interactions QDs/bR – recherche de l'efficacité maximale.....	102
A.	Mise en évidence par mesure de PL.....	102
B.	Mise en évidence des interactions par AFM	106
C.	Influence du pH sur le FRET	111
D.	Synthèse des résultats expérimentaux	114
E.	Discussion des résultats / Comparaison entre r_{\min} et distance associée au FRET.....	116
F.	Problème de l'homo-FRET	119
G.	Conclusion.....	120
III.	Renforcement des interactions bR/QD.....	121

IV. Conclusion	125
Quatrième partie : Influence des QDs sur la monomérisation de la bR par du Triton X-100	126
I. Mesures de FRET	128
A. Mesure de FRET en statique	128
B. Imagerie par AFM.....	130
II. Influence des QDs sur la monomérisation de la bR.....	133
A. Influence du Triton seul sur le réseau de bR.....	134
B. Influence des QDs sur le réseau de bR.....	134
C. Influence des QDs sur la monomérisation de la bR par le Triton	137
III. Bilan et Discussion	143
IV. Conclusion	147
Conclusion générale et perspectives	148
Travaux associés	154
Bibliographie.....	157
Annexes.....	174

Liste des tableaux ou des illustrations

FIGURE 1 : PHOTOGRAPHIE D'UN LAC VIOLET DERRIERE LES REMPARTS D'AIGUES-MORTES. SA COULEUR, CARACTERISTIQUE DES MARAIS SALANTS NATURELS OU ARTIFICIELS, EST DUE A LA PRESENCE DE NOMBREUSES BACTERIES HALOBACTERIUM SALINARUM DANS L'EAU.	10
FIGURE 2 : SCHEMA D'UNE HALOBACTERIE ET SON PRINCIPE GENERAL DE PHOTOSYNTHESE. SA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE CONTIENT UN RESEAU CRISTALLIN 2D DE BR PARFAITEMENT ORIENTEE DANS UNE SEULE DIRECTION ET DE LIPIDES PERMETTANT DE STABILISER LA MEMBRANE [19]. CES MEMBRANES SONT APPELEES MEMBRANES POURPRES A CAUSE DE LEUR COULEUR INTENSE. LES AUTRES COMPOSANTS PARTICIPANT A LA PHOTOSYNTHESE DE LA BR SONT L'ATPASE, L'HALORHODOPSINE AINSI QUE LES FLAGELLES.	10
FIGURE 3: PROPRIETES STRUCTURELLES ET PHYSICO CHIMIQUE DES PMS.	12
FIGURE 4 : STRUCTURE DE LA BR [30,34]. ON DISTINGUE AU TRAVERS DES 7 HELICES, LE RETINAL, LIE A LA LYSINE 216.	13
FIGURE 5 : PHOTOCYCLE DE LA BR ET SPECTRES D'ABSORPTION CORRESPONDANT.	14
FIGURE 6 : APPLICATIONS TECHNIQUES DE LA BR.	16
FIGURE 7 : SCHEMA D'UNE QD CŒUR/COQUILLE DE CdSe/ZNS ENTOURE DE TOPO.....	29
FIGURE 8 : SCHEMA DE BANDE DES CONDUCTEURS, SEMI-CONDUCTEURS ET ISOLANTS.	30
FIGURE 9 : SCHEMA DES NIVEAUX D'ENERGIE DE DEUX ATOMES DE SILICIUM COUPLES, NE TENANT COMPTE QUE DES NIVEAUX S ET P.....	31
FIGURE 10 : REPRESENTATION SIMPLE DE LA STRUCTURE DE BANDE D'UN SEMI-CONDUCTEUR MASSIF, EN FONCTION DU VECTEUR D'ONDE K, EN NE TENANT COMPTE QUE DES NIVEAUX D'ENERGIE S ET P. E_g EST LA LARGEUR DE LA BANDE INTERDITE.	31
FIGURE 11 : STRUCTURE DE BANDE DU CdSe MASSIF NE TENANT COMPTE QUE DES NIVEAUX S ET P. LES VALEURS D' E_g , DU COUPLAGE SPIN ORBITE Δ_{so} , DU MOMENT ANGULAIRE J ET DES MASSES EFFECTIVES SONT INDIQUEES.	32
FIGURE 12 : ABSORPTION ET PHOTOLUMINESCENCE DE QDS DE CdSe DE DIFFERENTS DIAMETRES.	35
FIGURE 13 : QDS DE CdSe/ZNS DANS LE CHLOROFORME DONT LE CŒUR VARIE ENTRE 2 ET 6 NM (DE DROITE A GAUCHE).....	36
FIGURE 14 : FLUORESCENCE ET RENDEMENT QUANTIQUE DE CŒURS DE CdSe RECOUVERTS PROGRESSIVEMENT PAR DU ZNS. LE MAXIMUM DE FLUORESCENCE EST ATTEINT POUR 1,2 MONOCOUCHE DE ZNS. LE GRAPHIQUE EST TIRE DE [93].....	37
FIGURE 15 : ALIGNEMENT DES BANDES DANS DES STRUCTURES CŒUR/COQUILLE DE TYPE I, II ET I INVERSE [113].	37
FIGURE 16 : SCHEMA DECRIVANT LES PROCESSUS MIS EN JEU LORS DES ETATS ALLUMES ET ETEINTS DANS LES QDS [123].....	40

FIGURE 17 : TEMPS DE VIE DE DIFFERENTS FLUOROPHORES ORGANIQUES ET DES QDS SOUS ILLUMINATION CONSTANTE [124].....	41
FIGURE 18 : CELLULES DE TYPES MDA-MB-435S ET MCF-7 RESPECTIVEMENT INCUBEES AVEC DES QDS CdSe/ZNS VERTES ET ROUGES. APRES INCUBATION DANS DES BOITES DE PETRI DIFFERENTES, ELLES ONT ETE MELANGEES SUR LE MEME SUBSTRAT. CHAQUE LIGNEE CELLULAIRE PEUT ALORS ETRE SUIVIE GRACE A SA FLUORESCENCE. L'IMAGE PRESENTEE ICI EST UNE IMAGE DE CONTRASTE DE PHASE SUPERPOSEE A L'IMAGE DE FLUORESCENCE [126].	42
FIGURE 19 : EXEMPLE DE PUCE DE DETECTION AVEC PLUSIEURS COULEURS DE QDS CODANT POUR PLUSIEURS ANTICORPS DIFFERENTS (A). LA PARTIE (B) REPRESENTE DES MICROBILLES EN SOLUTION MARQUEES AVEC DES QDS DE DIFFERENTES COULEURS. LEUR ATTACHEMENT A LA SURFACE D'UNE CELLULE PEUT ETRE SUIVI PAR CYTOMETRIE EN FLUX. ON PEUT DONC TESTER PLUSIEURS TYPES DE RECEPTEURS A LA SURFACE DE LA MEME CELLULE [127].	44
FIGURE 20 : DEPENDANCE DE L'EFFICIENCE DU FRET EN FONCTION DU RAPPORT R/R_0 [137].	48
FIGURE 21 : SCHEMA DU COMMUTATEUR OPTIQUE. UNE QD EST IMMOBILISEE A LA SURFACE D'UNE MEMBRANE POURPRE. ON DISTINGUE LE RESEAU CRISTALLIN DE LA BR ET EN ROUGE LE RETINAL (AU MILIEU DE LA BR EN VIOLET). DANS LA PARTIE A, L'ENERGIE DE LA QD EST TRANSFEREE PAR EFFET FRET JUSQU'A LA BR, LA QD NE FLUORESCe PLUS. DANS LA PARTIE B, LE RETINAL EST ABSENT OU DANS UN ETAT NE PERMETTANT PAS LE TRANSFERT D'ENERGIE. LA QD FLUORESCe. ON PEUT CONSIDERER CES DEUX ETATS COMME DEUX BITS D'INFORMATION DIFFERENTS, L'UN ETANT UN 1 L'AUTRE UN 0.	49
FIGURE 22 : SPECTRES D'ABSORPTION DE LA BR DANS SON ETAT M (COURBE BLEUE) ET DANS SON ETAT O (COURBE ROUGE), AINSI QUE LES SPECTRES DE PL DE QDS EMETTANT A DIFFERENTES LONGUEURS D'ONDE. IL Y A RECouvreMENT ENTRE LE SPECTRE D'ABSORPTION DE LA BR SOUS LA FORME O ET NON SOUS LA FORME M. GRACE AU FRET, IL PEUT Y AVOIR TRANSFERT D'ENERGIE DANS UN CAS, MAIS PAS DANS L'AUTRE.	50
FIGURE 23 : SCHEMA D'UN COMMUTATEUR OPTOELECTRONIQUE A BASE DE QDS ET BR.	51
FIGURE 24 : REPRESENTATION DU CYSTEAMINE (A GAUCHE) ET DE LA CYSTEINE (A DROITE).	55
FIGURE 25 : ECHANGE DE LIGANDS A LA SURFACE D'UNE QDS	55
FIGURE 26 : POLYETHYLENE GLYCOLS MODIFIES UTILISES POUR LA SOLUBILISATION DES QDS EN MILIEU AQUEUX. EN HAUT PEG-COOH, AU MILIEU PEG-OH ET PEG-NH ₂ EN BAS.	57
FIGURE 27 : 2-(DIMETHYLAMINO)ETHANETHIOL	58
FIGURE 28 : SCHEMA SIMPLIFIE D'UN SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE. APRES PASSAGE DANS UN MONOCHROMATEUR L'APPAREIL ENREGISTRE EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE L'ABSORPTION DE L'ECHANTILLON PAR RAPPORT A L'ABSORPTION DE LA REFERENCE (SOLVANT SEUL).	60
FIGURE 29 : SCHEMA D'UN SPECTROFLUORIMETRE.	62
FIGURE 30 : SPECTRE DE CD DE LA BR DANS L'UV (STRUCTURE SECONDAIRE) ET DANS LE VISIBLE (RETINAL).	67
FIGURE 31 : SPECTRE DE CD DE BR EN PRESENCE DE 2% EN VOLUME DE TRITON X-100, EN FONCTION DU TEMPS ET A 20°C. PLUS LE TEMPS APRES AJOUT DU TRITON EST LONG PLUS LES AMPLITUDES DE CD DECROISSent. LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES A 2, 13, 30, 46, 60, 80, 125 ET 200 MINUTES [152].	68

FIGURE 32 : AFM NANOSCOPE III A DU LMEN. 1) TABLE ANTIVIBRATOIRE 2) TETE AFM 3) CAMERA 4) SCANNER 5) CELLULE POUR L'IMAGERIE EN MILIEU LIQUIDE 6) SYSTEME DE VIBRATION DE LA CELLULE FLUIDE 7) POINTE ET ATTACHE 8) ARRIVEE/SORTIE DE FLUIDE	71
FIGURE 33 : IMAGES TOPOGRAPHIQUES AFM MONTRANT UN AMAS DE PMS REPLIEES ET AGREGUES DUE A UNE QUALITE DE TAMPON INCERTAINE (A GAUCHE) ET DES PMS PARFAITEMENT DEPOSEES (A DROITE). LES ECHELLES VERTICALES SONT EN NM.	74
FIGURE 34 : IMAGES AFM A GRANDE ECHELLE. LES IMAGES A) ET B) SONT DES IMAGES EN MODE CONTACT, LES IMAGES C) ET D) EN TAPPING. IMAGES REALISEES A L'AIDE DE POINTE OTR-4 DE 0,08 N/M. LES ECHELLES VERTICALES SONT EN NM.	75
FIGURE 35 : IMAGES TOPOGRAPHIQUES AFM DE PMS LAISSANT APPARAITRE LE RESEAU DE BR. LES IMAGES A) ET B) SONT DES IMAGES ENREGISTREES EN MODE CONTACT, ALORS QUE C) ET D) SONT DES IMAGES EN MODE TAPPING. LA DIFFERENCE DE RESOLUTION ENTRE LES DEUX MODES EST FLAGRANTE. IMAGES REALISEES A L'AIDE DE POINTE OTR-4 DE 0,08 N/M. LES ECHELLES VERTICALES SONT EN NM.	77
FIGURE 36 : IMAGES AFM DE LA SURFACE D'UNE PM AVEC DEUX POINTES DIFFERENTES REALISEES EN MODE CONTACT. L'IMAGE DE GAUCHE EST ENREGISTREE A L'AIDE D'UNE POINTE NP DE RAYON DE COURBURE DE 30 NM ENVIRON, ALORS QUE CELLE DE DROITE EST ENREGISTREE AVEC UNE POINTE OTR-4 DE RAYON DE COURBURE DE 15 NM. LES ECHELLES VERTICALES SONT EN NM.	78
FIGURE 37 : IMAGES TOPOGRAPHIQUES REALISEES A L'AFM A L'AIR EN MODE TAPPING. L'IMAGE DE GAUCHE MONTRE UN GRAND NOMBRE DE MEMBRANES DEPOSEES LES UNES SUR LES AUTRES ET DES AMAS DE QDs. L'IMAGE DE DROITE EST UN ZOOM DE L'IMAGE DE GAUCHE MONTRANT TRES CLAIREMENT QUE LES QDs NE SONT PAS DEPOSEES SUR LES MEMBRANES ET QU'ELLES SONT AGREGUES DANS LES INTERSTICES ENTRE LES MEMBRANES. ..	79
FIGURE 38 : QDs SOLUBILISEES A LA CYSTEINE EN PRESENCE DE DEUX SOLUTIONS TAMPONS DIFFERENTES, L'UNE CONTENANT DU $MgCl_2$ ET L'AUTRE NON. LE TUBE DE GAUCHE ETANT LA SOLUTION STOCK, DANS DE L'EAU.	80
FIGURE 39 : IMAGES AFM REALISEES EN MODE TAPPING D'UN ECHANTILLON DE BR/QD. ELLES ONT ETE REALISEES AVEC DES POINTES OTR-4 DE CONSTANCE DE RAIDEUR DE 0,08 N/M.	82
FIGURE 40 : A GAUCHE : SPECTRES D'ABSORPTION DE LA BR DANS LES PMS (VIOLET) ET DANS LES WMS (ORANGE) AINSI QUE LE SPECTRE DE PL DES QDs UTILISEES. A DROITE : COURBE REPRESENTANT L'INTENSITE DE PL DES QDs EN FONCTION DU RAPPORT MOLAIRES BR/QD.	85
FIGURE 41 : IMAGES FLIM DE QDs EN PRESENCE DE PMS A DROITE ET SEULES A GAUCHE. SUR L'IMAGE DE GAUCHE, ON NE DISTINGUE QU'UNE SEULE POPULATION DE QDs ALORS QUE DEUX POPULATIONS APPARAISSENT DISTINCTEMENT SUR L'IMAGE DE DROITE : LA POPULATION EN CONTACT AVEC LES PMS (ROUGE) ET LA POPULATION EN CONTACT AVEC LE SUBSTRAT (VERT). LES QDs ATTACHEES AUX PMS ONT UN TEMPS DE VIE PLUS COURT QUE CELLES DEPOSEES SUR LE SUBSTRAT. ON PEUT ALORS REPERER LES PMS GRACE AU TEMPS DE VIE DES QDs. LES HISTOGRAMMES REPRESENTENT LE NOMBRE DE PIXEL EN FONCTION DU TEMPS DE VIE MOYEN DE LEUR PL.	90
FIGURE 42 : SPECTRES D'ABSORPTION ET DE PL DE QDs EMETTANT A 570 NM, 610 NM ET 650 NM UTILISES POUR LA MODIFICATION DE L'INTEGRAL DE RECOUVREMENT.	92

FIGURE 43 : SPECTRE D'ABSORPTION DE LA BR ET SPECTRES D'EMISSION DES TROIS LOTS DE QDS UTILISES. IL MONTRE LA DIFFERENCE DE RECOUVREMENT ENTRE LES SPECTRES D'EMISSION DES QDS ET L'ABSORPTION DE LA BR. LE TABLEAU A DROITE DONNE LES VALEURS DES INTEGRALES DE RECOUVREMENT J.	92
FIGURE 44 : COURBES REPRESENTANT LA VARIATION DE LA PL DES TROIS LOTS DE QDS EN FONCTION DU RAPPORT MOLAIRES BR/QD.	93
FIGURE 45 : TABLEAU DONNANT LES VALEURS DE L'INTEGRALE DE RECOUVREMENT ET DU RAYON DE FÖRSTER POUR LES TROIS TYPES DE QDS UTILISEES. IL DONNE EGALEMENT LES VALEURS DES RENDEMENT QUANTIQUES NECESSAIRES AUX CALCULS DE R_0	94
FIGURE 46 : COURBES REPRESENTANT LA DECROISSANCE DE PL DE QDS SOLUBILISEES AVEC DE LA CYSTEINE OU DU PEG-COOH EN FONCTION DU RAPPORT MOLAIRES BR/QD.	96
FIGURE 47 : TABLEAU RECAPITULANT LES CARACTERISTIQUES DES QDS UTILISEES, LES RAYONS DE FÖRSTER ASSOCIES, LES EFFICIENCES MESUREES PAR PL AINSI QUE LES DISTANCES CALCULEES GRACE A CES EFFICIENCES DANS LE CAS D'UN MODELE FRET A UN ACCEPTEUR.	97
FIGURE 48 : SCHEMA REPRESENTANT LA DISTANCE LA PLUS COURTE ENTRE LE RETINAL ET LE CENTRE DE LA QD, SI CETTE DERNIERE EST PLACEE JUSTE AU-DESSUS DE LA PROTEINE.	98
FIGURE 49 : SCHEMA REPRESENTANT A GAUCHE LE TRIANGLE EQUILATERAL FORME PAR LES BR A L'INTERIEUR DU TRIMERE ET UNE QD DEPOSE AU CENTRE DE CE TRIMERE. LE POINT G ETANT LE CENTRE DE GRAVITE DU TRIANGLE ET D LA DISTANCE ENTRE G ET UNE BR. LA DISTANCE BR A BR A ETE MESUREE A 3,5 NM. SUR LA FIGURE DE DROITE, R EST LA PLUS PETITE DISTANCE SEPARANT LE CENTRE DE LA QD AU RETINAL ET R LE RAYON DE LA QDS. CE RAYON COMPREND TOUTES LES COUCHES DE LA QD (CŒUR, COQUILLE DE ZNS ET LIGANDS).	99
FIGURE 50 : TABLEAU RECAPITULANT LES CARACTERISTIQUES DES QDS UTILISEES, LES RAYONS DE FÖRSTER ASSOCIES, LES EFFICIENCES MESUREES PAR PL AINSI QUE LES DISTANCES CALCULEES GRACE A CES EFFICIENCES DANS LE CAS D'UN MODELE FRET A ACCEPTEURS MULTIPLES.	101
FIGURE 51: TABLEAU MONTRANT LA DEPENDANCE DES DIAMETRES HYDRODYNAMIQUES ET POTENTIELS ZETA DES QDS EN FONCTION DES LIGANDS A LEUR SURFACE.	103
FIGURE 52 : COURBES REPRESENTANT LA DECROISSANCE DE PL DE QDS SOLUBILISEES A L'AIDE DE PEG-OH (ROUGE), PEG-COOH (BLEUE), CYSTEINE (VERTE) ET CYSTEAMINE (NOIRE) EN FONCTION DU RAPPORT MOLAIRES BR/QD.	104
FIGURE 53 : IMAGES TOPOGRAPHIQUES (A, B, C) ET DE PHASE (D) DE PMS ET DE QDS CYSTEINEES. LES IMAGES A) ET B) MONTRENT QUE LA QUASI-TOTALITE DES QDS SONT DEPOSEES A LA SURFACE DU MICA ET NON A LA SURFACE DES PMS. LES INTERACTIONS PMS QDS SONT PLUS FAIBLES QUE LES INTERACTIONS QDS MICA. LES IMAGES C) ET D) SONT RESPECTIVEMENT UNE IMAGE TOPOGRAPHIQUE ET UNE IMAGE DE CONTRASTE DE PHASE DE LA MEME ZONE. ELLES MONTRENT BIEN QUE TRES PEU DE QDS SONT A LA SURFACE DES PMS. LES ECHELLES DE HAUTEUR SONT EN NANOMETRES (A, B, C) ET EN DEGRES (D).	107
FIGURE 54 : IMAGES AFM DE TYPE TOPOGRAPHIQUE (A, B, D) ET DE CONTRASTE DE PHASE (C). CES IMAGES MONTRENT CLAIREMENT QUE LES QDS SONT AGREGES SUR LE BORD DE LA MEMBRANE, A L'INTERFACE AVEC LE MICA. ...	108

FIGURE 55 : IMAGES TOPOGRAPHIQUES AFM DE PMS EN PRESENCE DE QDS AMINEES. L'IMAGE A) DE 10 μM DE LARGE MONTRE UNE VUE D'ENSEMBLE DE L'ECHANTILLON. LES QDS NE SEMBLENT PAS ETRE DEPOSEES SUR LE MICA. EN ZOOMANT SUR LES MEMBRANES, ON DISTINGUE DES AGREGATS A LEUR SURFACE (CAS DES IMAGES B) ET C)). L'IMAGE B) FAIT 2 μM DE LARGE ET PRESENTE UN ECHANTILLON SUR LEQUEL LA CONCENTRATION EN QDS EST FAIBLE. TRES PEU DE QDS SONT DEPOSEES SUR LES MEMBRANES. SUR L'IMAGE C) (DE 500 NM DE LARGE) ON DISTINGUE TROIS ZONES. LES ZONES DEFINIES PAR LES FLECHES NOIRES SONT LA SURFACE DU MICA. LA ZONE DEFINIE PAR LA FLECHE BLANCHE EST UNE ZONE COMPLETEMENT RECOUVERTE PAR LES QDS. DE NOMBREUX AGREGATS SONT VISIBLES, LA CONCENTRATION EN QDS ETANT TRES ELEVEE. EN ZOOMANT DANS CETTE ZONE, ON OBTIENT L'IMAGE D) (TRAITEE PAR TRANSFORMEE DE FOURRIER).	109
FIGURE 56 : IMAGES AFM ET PROFILS ASSOCIES, COMPARANT LES RESEAUX DE BR ET DE QDS. L'IMAGE DE GAUCHE EST L'IMAGE DE BR ALORS QUE CELLE DE DROITE EST L'IMAGE DES QDS QUASI-EPITAXIEES SUR UNE PM. LE RESEAU DE BR A POUR PARAMETRE DE MAILLE 6,2 NM ALORS QUE CELUI DES QDS EST DE 6,09 NM. ILS SONT QUASIMENT IDENTIQUES.....	110
FIGURE 57 : TABLEAU DONNANT LES EFFICIENCES DE FRET DES QDS CYSTEAMINEES ET CYSTEINEES AINSI QUE LES DISTANCES ASSOCIEES A CES TRANSFERTS.....	112
FIGURE 58 : COURBE REPRESENTANT LA PL DE QDS PEG-OH EN FONCTION DU RAPPORT MOLAIRES BR/QD. LE PH DE LA SOLUTION EST DE 5,0 POUR LA COURBE BLEUE, 7,0 POUR LA COURBE ROUGE ET 8,8 POUR LA COURBE NOIRE.	113
FIGURE 59 : COURBE REPRESENTANT LA HAUTEUR DES PMS MESUREE PAR AFM EN FONCTION DU PH. [172].....	114
FIGURE 60 : SCHEMA MONTRANT LES INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES ET LE FRET ASSOCIES A CHAQUE TYPE DE QDS UTILISEES. LE A) REPRESENT LES QDS CYSTEINEES, LE B) LES QDS AMINEES, LE C) LES QDS PEG-COOH, ET LE D) LES QDS PEG-OH. LES FLECHES INDIQUENT LE FRET, ET LEUR COULEUR L'INTENSITE DE CE DERNIER. LES + ET - INDIQUENT LES CHARGES DE SURFACE.	114
FIGURE 61 : TABLEAU RECAPITULANT LES PROPRIETES DES QDS UTILISEES, LES EFFICIENCES DE TRANSFERT MESUREES AINSI QUE LES R_{MIN} ET LES DISTANCES CALCULEES GRACE A L'EFFICIENCE DE TRANSFERT.	116
FIGURE 62 : REPRESENTATION DE LA SULFO-NHS BIOTINE.....	122
FIGURE 63 : COURBE REPRESENTANT L'INTENSITE DE PL DE QDS STREPTAVIDINEES EN FONCTION DU RAPPORT BR/QD. LA COURBE VERTE REPRESENT LA BIOTINE SIMPLE, LA ROUGE LA BIOTINE LC ET LA BLEUE LA BIOTINE LCLC. ..	122
FIGURE 64 : TABLEAU RECAPITULANT LES LONGUEURS DES DIFFERENTES BIOTINES UTILISEES AINSI QUE LES EFFICIENCES DE TRANSFERT MESUREES ET LES DISTANCES APPARENTES CALCULEES GRACE A NOTRE MODELE THEORIQUE.	123
FIGURE 65 : COURBES REPRESENTANT LA PL DE QDS CYSTEINEES EN PRESENCE DE BRs ET DE TRITON X-100. LE RAPPORT BR/QDS ET DE 1/4. LA COURBE VERTE A ETE ENREGISTREE AVEC DES PMS ALORS QUE LA ROSE L'A ETE AVEC DES WMS. LA COURBE NOIRE REPRESENT LA PL DES QDS SEULES DANS LE TRITON A LA MEME CONCENTRATION.....	129
FIGURE 66 : SPECTRES D'ABSORPTION DE LA BR APRES TRAITEMENT AU TRITON X-100. LES SPECTRES ONT ETE ENREGISTRES APRES 0 MIN, 6 HEURES, 12 HEURES ET 24 HEURES DE PRESENCE DE LA BR DANS LE TRITON.	130

FIGURE 67 : IMAGES AFM DE PMS APRES QUELQUES MINUTES EN PRESENCE DE TRITON X-100 A 0,4 % EN VOLUME ET DE QDS.	131
FIGURE 68 : IMAGES AFM D'ECHANTILLONS DE PMS TRAITEES AVEC DU TRITON X-100 ET DES QDS. ELLES NE LAISSENT APPARAITRE QUE QUELQUES FRAGMENTS DE MEMBRANES ET AUCUNE QD NE SE TROUVE SUR LE SUBSTRAT OU SUR LES PMS APRES RINÇAGE.	132
FIGURE 69 : SPECTRE DE CD DE LA BR DANS L'UV (STRUCTURE SECONDAIRE) ET DANS LE VISIBLE (RETINAL).	133
FIGURE 70 : SPECTRES DE CD DE BR EN PRESENCE DE TRITON X-100 A 0,4% EN VOLUME APRES DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION.	134
FIGURE 71 : SPECTRES DE CD DE BR SEULE ET DE BR EN PRESENCE DE DIFFERENTS RATIOS DE QDS.....	135
FIGURE 72 : SPECTRES DE CD DE BR EN PRESENCE DE QDS ET DE TRITON X-100 A 0,4% EN VOLUME A DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION.	137
FIGURE 73 : IMAGES AFM DU RESEAU DE BR A L'INTERIEURE DES PMS APRES 3 HEURES PASSEES INCUBEES AVEC DU TRITON X-100 A 0,4 % EN VOLUME, SANS QDS A GAUCHE ET AVEC QDS A DROITE.	139
FIGURE 74 : IMAGES AFM ET TRANSFORMEES DE FOURIER ASSOCIEES. CES IMAGES ONT ETE REALISEES APRES 5 HEURES D'INCUBATION AVEC DU TRITON, SANS QDS A GAUCHE ET AVEC QDS A DROITE.	140
FIGURE 75 : IMAGES AFM ET TF ASSOCIEES APRES 6 HEURES EN PRESENCE DE TRITON ET SANS QDS A GAUCHE, AVEC A DROITE.	141
FIGURE 76 : IMAGE AFM ET TF ASSOCIEE DE LA SURFACE D'UNE PM APRES 24H D'INCUBATION AVEC DU TRITON ET SANS QDS.....	142
FIGURE 77 : SCHEMA DU COMMUTATEUR OPTO-ELECTRIQUE A BASE DE QDS ET DE BR.	151
FIGURE 78 : COURBE DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE. (A CARACTERISE L'INTENSITE DE L'EFFET COTTON)	180
FIGURE 79 : SPECTRES DE CD ASSOCIES A DES STRUCTURES EN HELICE A (LIGNE PLEINE), EN FEUILLETS B ANTI PARALLELES (TIRETS), EN COUDE B DE TYPE I (POINTS) ET EN STRUCTURE IRRÉGULIERE (TIRETS ET POINTS) [183].	184
FIGURE 80 : SCHEMA D'UN AFM. LA DEFLECTION DU MICROLEVIER EST DETECTEE GRACE AU MOUVEMENT D'UN LASER SUR LA PHOTODIODE 4 CADRANS. L'ECHANTILLON EST DEPLACÉ GRACE A UNE PLATINE DE BALAYAGE XYZ A BASE DE QUARTZ PIEZOELECTRIQUE.	186
FIGURE 81 : FORCE DERIVEE DU POTENTIEL DE LENNARD-JONES.	187
FIGURE 82 : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT D'UN ZETASIZER.....	176

Liste des annexes

ANNEXE 1 : PRINCIPE DE LA MESURE DE TAILLE ET DE POTENTIEL ZETA A L'AIDE DE LA DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE.....	175
ANNEXE 2 : PRINCIPE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE	178
ANNEXE 3 : PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM).....	185

Introduction

Depuis plusieurs années maintenant, les matériaux hybrides organique/inorganique sont de plus en plus étudiés. Ils présentent souvent l'avantage d'être peu cher et de représenter de bonnes alternatives à la technologie à base de silicium utilisée actuellement dans la micro-électronique. Cette technologie se rapprochant un peu plus chaque jour de ses limites, autant d'un point de vue physique (température, taille de gravure, etc.) que d'un point de vue pratique (prix de plus en plus exorbitants des métaux, par exemple), il y a nécessité d'explorer de nouvelles pistes. Les matériaux hybrides organique/inorganique sont donc une alternative ambitieuse, dans laquelle les propriétés physico-chimiques des matériaux biologiques peuvent être renforcées grâce à l'apport de nanoparticules.

Ce travail de thèse effectué au LMEN et avec l'équipe du Pr Nabiev du PCDH/DAT, s'est inséré dans un projet plus vaste inscrit dans cette thématique et portant sur l'utilisation de la protéine membranaire Bactériorhodopsine (bR) couplée à des boîtes quantiques de semi-conducteurs (QDs). Dans ce projet, le but est d'essayer d'améliorer et d'utiliser les propriétés photochromiques et photochimiques de la bR en utilisant un transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) qui peut exister avec des QDs. La photoluminescence (PL) des QDs devrait être modulée à l'aide du photocycle contrôlable de la bR. Ce photocycle, qui n'est autre qu'un changement brutal d'absorption de la protéine, peut se retrouver modifié par une excitation extérieure de type lumineuse ou magnétique par exemple. Les changements d'absorption pendant ce cycle étant très importants d'un point de vue photochromique, le FRET peut moduler la PL des QDs. Ce nouveau matériau hybride pourrait servir dans divers domaines, tels que les cellules photovoltaïques ou l'optoélectronique.

Cependant, les propriétés physiques d'un tel composé et son efficacité vont fortement dépendre de sa structure. Le nombre de bRs par QD, la répartition homogène ou non de ces dernières à la surface des membranes contenant les bRs, la distance entre bR et QD sont autant de paramètres à caractériser pour que le composé soit fonctionnel. C'est donc dans cette optique que s'est orienté mon travail, passant de la « fabrication » du complexe bR/QD à sa caractérisation par microscopie à force atomique (AFM) afin de mettre en évidence l'organisation de la bR et des QDs et par diverses méthodes optiques (absorption, PL, etc.) afin de mettre en évidence un éventuel effet FRET en fonction de l'organisation bR/QDs.

Première partie :
Etude Bibliographique

I. Contexte scientifique

L'industrie microélectronique à base de silicium a été l'un des moteurs de la technologie moderne grâce notamment à l'invention du transistor en 1947 [1] et du circuit imprimé en 1958 [2,3]. Jusqu'à aujourd'hui, la prédiction de Gordon Moore (co-fondateur de la société Intel) s'est avérée assez réaliste. Il annonçait en 1965, que le nombre de transistors incorporés dans une puce carrée devrait doubler tous les 24 mois [4], ce qui s'est quasiment vérifié à quelques corrections près [5]. Entre 1971 et 2001, le nombre de transistors sur les processeurs a doublé tous les 1,98 ans confirmant cette loi.

Cependant, les lois de la physique ne permettent pas de diminuer indéfiniment la taille des composants et à l'approche du domaine nanométrique certains problèmes se posent [6]. La finesse lithographique ou même les fluctuations thermiques sont des problèmes récurrents à cette échelle [7].

De plus, depuis plusieurs dizaines d'années, les seuls paramètres de développement tels que la fiabilité, le coût et bien sûr l'efficacité pour le développement de nouveaux matériaux et de nouveaux composants électroniques ne sont plus les uniques critères à prendre en compte. Maintenant, en plus des fortes contraintes de rentabilité, la pression internationale se porte sur des matériaux toujours aussi performants, de plus en plus petits mais également écologiques, recyclables et économes en énergie. Ceci nous amène à des matériaux de plus en plus sophistiqués et de plus en plus compliqués à fabriquer avec des méthodes traditionnelles, mais surtout avec des matériaux traditionnels. C'est pourquoi les recherches dans le domaine des matériaux hybrides organique/inorganique se sont beaucoup développées.

En effet, on retrouve des traces des matériaux hybrides organique/inorganique développés de façon commerciale depuis les années 40 [8]. Cependant, le plus gros « boum » de développement de ces matériaux est arrivé dans les années 90 avec la naissance de la communauté travaillant sur la méthode sol-gel.

Le développement des matériaux hybrides est surtout dû aux propriétés naturelles de certains composés biologiques, tels que l'ADN, qui n'avaient jamais été exploitées. De plus, leur couplage à des matériaux de type conventionnel (tels que les semi-conducteurs et le silicium notamment) permet d'entrevoir de nouvelles possibilités de composés. Enfin, le

développement des nanotechnologies a énormément aidé au fort engouement réservé à ces matériaux. La découverte de nouveaux matériaux comme les nanotubes de carbone a donné naissance à de nouveaux types de détecteurs à molécules biologiques comme l'ADN [9], mais également à des capteurs hybrides détectant certains ions métalliques [10].

Les matériaux hybrides sont aujourd'hui étudiés dans de nombreux domaines, tels que les piles à combustibles [11], les matériaux photochromiques [12], les cellules solaires [13], les batteries [14], les fibres optiques [15], la génération de lumière [16], etc. Cette liste n'est bien entendu pas exhaustive et l'énumération de toutes les possibilités d'utilisations des matériaux hybrides pourrait être infinie.

Avec l'exploitation de ces matériaux hybrides de nouveaux domaines d'application se développent donc comme la bioélectronique ou la biophotonique. Ces domaines sont prometteurs, puisqu'ils permettent des manipulations très précises sur des molécules de taille importante (via des mutations génétiques) ou même des assemblages très sophistiqués de molécules. Les plus gros efforts en bioélectronique sont aujourd'hui dirigés vers les couches minces, les biocapteurs et les éléments photoniques à base de protéines. Bon nombre de biomolécules sont actuellement utilisées dans les laboratoires, mais une seule d'entre elles nous a intéressés : la bactériorhodopsine. Nous verrons par la suite que cette protéine membranaire possède des propriétés physiques particulières, faisant d'elle un candidat intéressant pour la bioélectronique ou la biophotonique de demain.

Cependant, les molécules biologiques ne présentent pas toujours tous les avantages nécessaires et il faut souvent les coupler à d'autres objets pour étoffer leurs propriétés. Pour cela, la meilleure solution est souvent de travailler avec des matériaux hybrides, organique/inorganique, permettant d'accéder aux propriétés nécessaires à la réalisation d'un composé efficace. On trouve par exemple comme composés inorganiques très largement utilisés les boîtes quantiques à base de semi-conducteurs (QDs). Ces particules ont de nombreux avantages pour l'optoélectronique. En effet, elles ont la particularité d'avoir un spectre d'absorption très large et un spectre d'émission très étroit. Elles sont également solubles dans un très grand nombre de solvants et présentent bien sûr une taille de l'ordre de quelques nanomètres. Elles sont souvent utilisées sous forme de particules individualisées ou sous forme de petits agrégats organisés.

Ce travail de thèse a consisté à coupler les propriétés spécifiques d'absorption et d'émission de la bR et des QDs de CdSe/ZnS, dans le but de créer un matériau hybride capable de servir dans des domaines tels que l'optoélectronique pour des applications dans le domaine de la commutation optique par exemple. Ce sujet de thèse est à la base du développement d'une nouvelle thématique au laboratoire liée à la caractérisation par microscopie champ proche d'objets biologiques en milieu fluide et l'utilisation et la fonctionnalisation de QDs semi-conductrices. Au commencement de cette thèse, les sujets de prédilection du LMEN portaient sur la caractérisation par microscopie champ proche de nanostructures « solides » et le développement de méthodes de caractérisation originales en champ proche. Très peu de travaux existaient au laboratoire sur la caractérisation d'objets biologiques par microscopie à force atomique et encore moins sur le développement de nanomatériaux hybrides organique/inorganique. Une grande partie du travail de thèse a donc consisté à développer les mesures AFM en milieu fluide sur la bR dans un 1^{er} temps et sur le système bR/QDs ensuite et à mettre au point les techniques de fonctionnalisation de surface des QDs afin de comprendre les mécanismes expliquant l'extinction de la PL des QDs lors de la mise en présence avec la bR.

Ce travail de thèse sera présenté en 4 chapitres :

- ➔ Dans le 1^{er} chapitre, une étude bibliographique approfondie a été menée sur les 2 « briques » de base de notre nanomatériaux hybrides, la bR et les QDs de CdSe/ZnS afin de bien comprendre les propriétés spécifiques de ces objets et de justifier leur utilisation pour la mise au point d'un commutateur optique. L'intérêt du couplage bR/QDs CdSe/ZnS, le principe de base de ce matériau hybride ainsi que le mécanisme de transfert d'énergie FRET sur lequel est basé son fonctionnement sont détaillés dans un second temps afin de servir de base à la discussion des résultats obtenus.
- ➔ Dans le second chapitre, les expériences de caractérisation utilisées pour cette thèse et les méthodes de fonctionnalisation de surface des QDs ainsi que de préparation du matériau hybride sont présentées. En particulier, les parties concernant les nouveaux outils développés et utilisés au laboratoire (AFM en milieu fluide, préparation des QDs, dichroïsme circulaire) ont été détaillées car cette thèse est la 1^{ère} du laboratoire portant sur cette thématique. Les techniques de fonctionnalisation de la surface des QDs permettant de faire varier leur charge de surface et l'épaisseur de la coquille

entourant le cœur « actif » sont explicitées. De même, la partie concernant les mesures AFM effectuées sur la bR seule ou sur le complexe bR/QDs – mesures qui constituent une partie importante et essentielle du travail – contient les éléments justifiant le choix des conditions expérimentales (mode contact ou intermittent, type de pointes, mise au point du tampon de mesure, etc.) pour avoir les meilleures images possibles.

→ Le troisième chapitre de cette thèse concerne la présentation des résultats obtenus lors de la mise au point du nanomatériau hybride bR/QDs pour les applications de commutation. Dans un 1^{er} temps, nous avons mis en évidence que le couplage de QDs émettant dans la bande d'absorption de la bR provoque bien une diminution importante de l'intensité d'émission des QDs laissant à penser qu'il y a bien un transfert d'énergie pour les bons paramètres expérimentaux de couplage (rapport QDs/bR, longueur d'onde d'émission des QDs, etc). Cet effet n'existant pas si l'élément absorbant de la bR (le rétinale) n'est pas présent dans la bR, ces résultats semblent bien provenir d'un transfert d'énergie de type FRET entre QDs et bR. Afin de confirmer l'existence du FRET mais également d'essayer de maximiser cet effet, nous avons préparé des QDs avec différents groupes greffés en surface, groupes induisant une variation du potentiel de surface des QDs et également de la distance entre le cœur émetteur de la QDs et le rétinale absorbeur de la bR. Les résultats expérimentaux obtenus aussi bien au niveau des caractérisations optiques que des caractérisations structurales par AFM et les résultats théoriques attendus en utilisant la théorie régissant le FRET sont compatibles ce qui laisse à penser que nous avons bien un transfert d'énergie entre les QDs et la bR. En choisissant convenablement les caractéristiques des QDs, nous montrons que par interaction électrostatique, il est possible d'avoir une quasi-épitaxie des QDs sur les trimères de bR. Si les résultats obtenus dans le cas d'interactions électrostatiques bR/QDs sont prometteurs, l'utilisation de ce type d'interaction « faible » pour un éventuel transfert technologique reste problématique : nous avons donc montré dans la dernière partie de ce chapitre qu'il était possible d'obtenir le même effet en réalisant des liaisons covalentes entre bR et QDs. Ce chapitre se termine sur les perspectives de ce travail pour la mise au point d'un commutateur optique ou électrique utilisable.

→ Lors de nombreuses expériences que nous avons menées en AFM pour la détermination des bons paramètres d'imagerie, nous avons démontré qu'en présence

de détergent, il semblait y avoir un effet important des QDs sur l'organisation cristalline de la bR. Dans le 4^{ème} chapitre, l'effet de la présence conjointe de QDs et de détergent sur l'organisation de la bR a été étudié par AFM et par dichroïsme circulaire. La présence de QDs semble accélérer fortement le processus de monomérisation de la bR et de fluidification de la membrane ce qui pourrait avoir des applications intéressantes en biologie.

Enfin, les différents résultats obtenus dans cette thèse et les perspectives en découlant seront rappelés dans la conclusion finale.

II. La Bactériorhodopsine

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que de nombreux matériaux biologiques sont étudiés et utilisés pour la création d'objets hybrides. Notre choix s'est porté sur une protéine très connue, puisqu'elle fut découverte en 1971 par Oesterhelt et Stoekienus [17]. Elle est toujours très étudiée et utilisée dans différents systèmes. Elle a notamment fait l'objet de plusieurs milliers d'articles scientifiques depuis sa découverte en 1971 dont plus d'une centaine en 2010 (source Science Direct).

Nous nous proposons donc dans les paragraphes qui suivent de faire un rappel de ses propriétés. Une liste non exhaustive des domaines pour lesquels elle est actuellement étudiée sera dressée et quelques systèmes innovants qui l'intègrent seront présentés.

A. Généralités sur la bR

1. De la membrane pourpre à la bR

La bR est une protéine très utilisée de nos jours dans la recherche, du fait de ses très nombreuses propriétés physico-chimiques et structurelles que nous allons lister ici. Cependant, attardons-nous un peu plus sur son origine.

La bR est l'unique protéine membranaire que l'on trouve dans les membranes pourpres (PMs), fragments appartenant à la bactérie : *Halobacterium Salinarum*. Ces bactéries vivent dans des conditions extrêmes de salinité et en présence de très peu d'oxygène dans l'eau. C'est pourquoi on les retrouve souvent dans les marais salants (voir *Figure 1*). Elles survivent notamment grâce à la présence de bR dans leurs membranes cytoplasmiques. En effet, la seule source d'énergie qui subsiste, une fois que tout le matériel organique a été consommé par oxydation, est la lumière du soleil. Les *H. Salinarum* ont donc dû s'adapter et ont développé des capacités phototrophes (voir *Figure 2*). La molécule clé de ces bactéries n'est autre que la bR. Le taux de transformation de l'énergie solaire en énergie chimique est d'environ 15% dans le cadre d'un système utilisant la bR alors qu'il est de 35 % dans le cadre d'un système à base de chlorophylle [18].

La bR se trouve dans des patchs à l'intérieur des bactéries sous la forme d'un réseau cristallin hexagonal 2 dimensions, dans lequel les protéines sont parfaitement orientées. Leur groupe carboxyle terminal est situé du côté cytoplasmique de la membrane. Ces patchs sont appelés les membranes pourpres (PMs). Ces membranes sont stabilisées par environ 19

lipides par bR [19]. Les PMs peuvent recouvrir jusqu'à 80 % de la surface des bactéries, sous la forme d'un ou plusieurs patchs.



Figure 1 : Photographie d'un lac violet derrière les remparts d'Aigues-Mortes. Sa couleur, caractéristique des marais salants naturels ou artificiels, est due à la présence de nombreuses bactéries *Halobacterium salinarum* dans l'eau.

Chaque bR agit comme une pompe à proton, les emmenant de l'intérieur vers l'extérieur de la bactérie. La bactérie se sert de cette pompe pour en tirer son énergie. En effet, après absorption d'un photon la bR transporte un proton à l'extérieur de la bactérie. Grâce à ce procédé, elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique et elle peut également se servir du gradient de proton ainsi créé comme stockage d'énergie. Comme dans toute cellule vivante, ce gradient de proton est ensuite utilisé par l'ATPase pour régénérer l'ATP à partir de l'ADP.

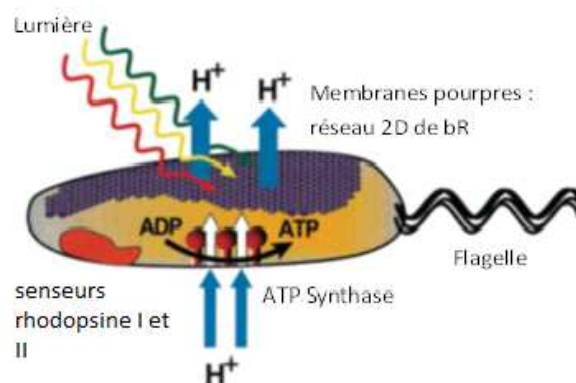


Figure 2 : Schéma d'une halobactérie et son principe général de photosynthèse. Sa membrane cytoplasmique contient un réseau cristallin 2D de bR parfaitement orientée dans une seule direction et de lipides permettant de stabiliser la membrane [19]. Ces membranes sont appelées

membranes pourpres à cause de leur couleur intense. Les autres composants participant à la photosynthèse de la bR sont l'ATPase, l'halorhodopsine ainsi que les flagelles.

De plus, les capteurs Rhodopsine I et II (SRI et SRII) détectent si la lumière est capable d'activer le photocycle. Une lumière verte ou jaune peut l'activer, mais une lumière bleue le ralentit. Les différentes longueurs d'ondes sont testées par SRI et SRII et permettent d'activer ou non les flagelles (par une série de réactions en chaîne), permettant de déplacer les bactéries quand les conditions lumineuses sont favorables. On trouve également une halorhodopsine qui permet de contrôler la concentration de Chlore à l'intérieur de la bactérie, grâce à un système de pompe à Chlore.

La bR est parfaitement organisée en réseau hexagonal à l'intérieur des PMs. Cette propriété est suffisamment rare pour être notée. En plus de l'organisation trimérique hexagonale, il existe une forme orthorhombique du réseau de bR [20]. Par ailleurs, cette organisation en réseau cristallin confère aux PMs des propriétés assez extraordinaires, faisant de ce matériel un très bon candidat pour les biotechnologies. En effet, cette cristallinité confère à la bR une stabilité substantielle vis-à-vis des attaques chimiques et thermiques [21,22]. La bR supporte des températures jusqu'à 140 °C dans sa forme sèche et de 80°C dans sa forme hydratée [23]. Ces propriétés sont perdues quand on change ce réseau hexagonal, par exemple en monomérisant la bR. Les PMs sont très sensibles aux solvants polaires comme l'eau [24], mais très peu aux solvants organiques comme l'hexane par exemple [25,26,27]. De plus, les PMs présentent des propriétés analogues au silicium puisqu'elles peuvent faire avec des protons ce que le silicium fait avec des électrons. Chaque bR est en effet capable de convertir la lumière solaire en un déplacement de protons unidirectionnel. Ceci empêche la réduction du gradient ainsi créé par diffusion des protons au travers de la membrane. Ceci est encore une fois dû à cette organisation en réseau hexagonal, qui est suffisamment compacte pour ne pas permettre aux protons de repasser à l'intérieur de la bactérie.

En outre, les PMs sont stables pendant plusieurs années, même au contact de l'air et à température ambiante. Elles ne sont pas sensibles au pH entre 0 et 12 et résistent très bien à d'importantes forces ioniques (jusqu'à 3 M de NaCl). Elles résistent également à la plupart des attaques de protéases. Elles conservent leurs activités optique et photochimique pendant plusieurs années même sous forme déshydratée. Ceci peut être vérifié par un échantillon de multicouches de PMs orientées, fabriqué et conservé par le Professeur Váró depuis 1983 et présentant toujours la même activité photoélectrique [28]. Le tableau de la *Figure 3* présente un résumé des principales propriétés des PMs. Toutes ces propriétés et notamment celles de

stabilité, en font un matériel intéressant pour le développement d'objets hybrides. Cependant, la bR présente d'autres avantages, dans l'optique d'utilisation à grande échelle de cette protéine, que nous allons voir dans la partie suivante.

<u>Propriétés Structurelles :</u>	<ul style="list-style-type: none"> - ratio molaire entre bR et lipides de 1 pour 19 - les PMs sont formées d'un réseau cristallin hexagonal de trimère de bR uniformément orientées vers l'extérieur - leur densité est de 1,18 g/cm³ (mesuré par flotaison) - leur indice de réfraction est compris entre 1,45 et 1,55 - leur épaisseur est de 5 nm
<u>Propriétés physico chimiques :</u>	<p>stables envers :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la lumière du soleil même en présence d'air ou d'oxygène - augmentation de la température 80°C dans l'eau, 140°C sous forme séchée - pH entre 0 et 12 - force ionique jusqu'à 3 M NaCl - attaque par la plupart des protéases <p>elles conservent leur couleur et leur activité photochimique même quand l'eau est enlevée</p> <p>elles sont sensibles à des solvants polaires tels que l'eau, l'éthanol ou l'acétone mais pas ou peu vis à vis des solvants non polaires comme l'hexane</p>

Figure 3: Propriétés structurelles et physico chimique des PMs.

2. Structure et photocycle de la bR

a) Structure

C'est une petite protéine intégrale de 248 acides aminés pour une masse molaire de 24 KDa [29]. Elle présente une structure en 7 hélices α (structure appelée opsine) [30] (voir Figure 4) et un rétinol responsable de son activité photochromique. Cette structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X [31,32] et par microscopie électronique à transmission [30,33]. Elle forme une cage dans laquelle est attaché, à la lysine 216, le rétinol. Il est incliné d'environ 20° par rapport à la surface extérieure de la membrane. Seules les boucles reliant les hélices sont accessibles pour une éventuelle attaque par des protéases, ce qui lui confère une plus grande stabilité comme nous l'avons vu avant.

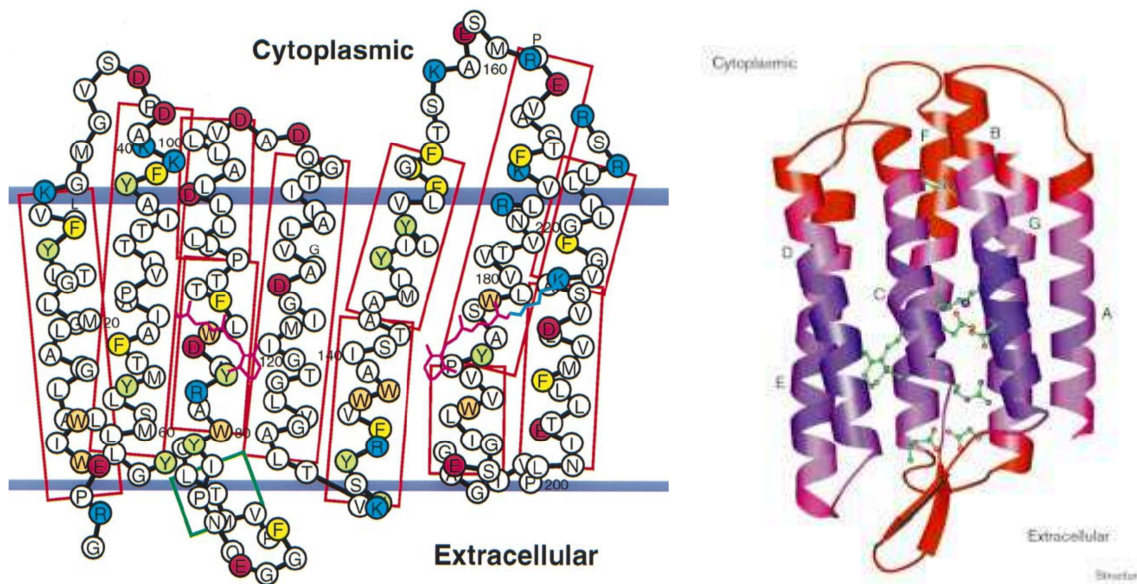


Figure 4 : Structure de la bR [30,34]. On distingue au travers des 7 hélices, le rétinale, lié à la lysine 216.

b) Photocycle

Les propriétés photochromiques de la bR sont dues à son rétinale lié à la lysine 216. Il n'est présent que sous deux formes dans la bR 13-cys ou tout-trans. Lorsque la protéine est illuminée, une photo-isomérisation du rétinale se produit et la bR passe par une multitude d'états intermédiaires, c'est son photocycle. Ce photocycle est couplé à ses fonctions biologiques et correspond donc au transport d'un proton. La durée de ce photocycle est d'environ 10 ms. Comme la bR n'a pas besoin de temps pour redémarrer un cycle [35], elle peut pomper une centaine de protons par seconde si elle est sous illumination suffisante. Cependant, même sous une forte illumination solaire, la protéine n'est jamais saturée en lumière et n'est donc jamais à son rendement maximum.

Après absorption d'un photon, la protéine passe par une multitude d'états nommés par une lettre annotée d'un indice correspondant au maximum de son spectre d'absorption. Ils sont définis par leurs propriétés spectroscopiques (principalement leur maximum d'intensité) et correspondent tous à une étape du transport du proton à l'intérieur de la protéine. Bien que ce photocycle soit étudié depuis plus de 30 ans, il y a toujours des zones d'ombre dans la compréhension du passage du proton au travers de la bR. La Figure 5 nous montre un photocycle simple de la bR, ainsi que les spectres d'absorption correspondant à chaque état. Les flèches épaisses correspondent à des transitions photochimiques, alors que les fines sont des relaxations thermiques. Les lettres droites sont des états correspondant à une

conformation tout-trans du rétinale alors que les lettres en italique correspondent à une conformation 13-cys. En outre, lorsque la bR est complètement plongée dans le noir, elle passe sous une forme dite « adaptée au noir » (dark adapted en anglais) qui n'est autre qu'un rapport de 4 : 6 entre les états D et B. Si on remet la bR à la lumière, en quelques minutes, elle repasse dans l'état dit « adapté à la lumière » (light adapted) qui n'est autre que les bR dans l'état B. C'est à partir de là que commence le photocycle. Toutes les transitions dans le cycle sont réversibles, sauf celles entre M^I et M^{II} [36,37]. Ceci vient du fait que l'azote de la base de Schiff n'est plus accessible qu'à la moitié du tunnel côté cytoplasmique et plus du tout du côté extracellulaire. Cette réorientation est certainement à l'origine du transport du proton.

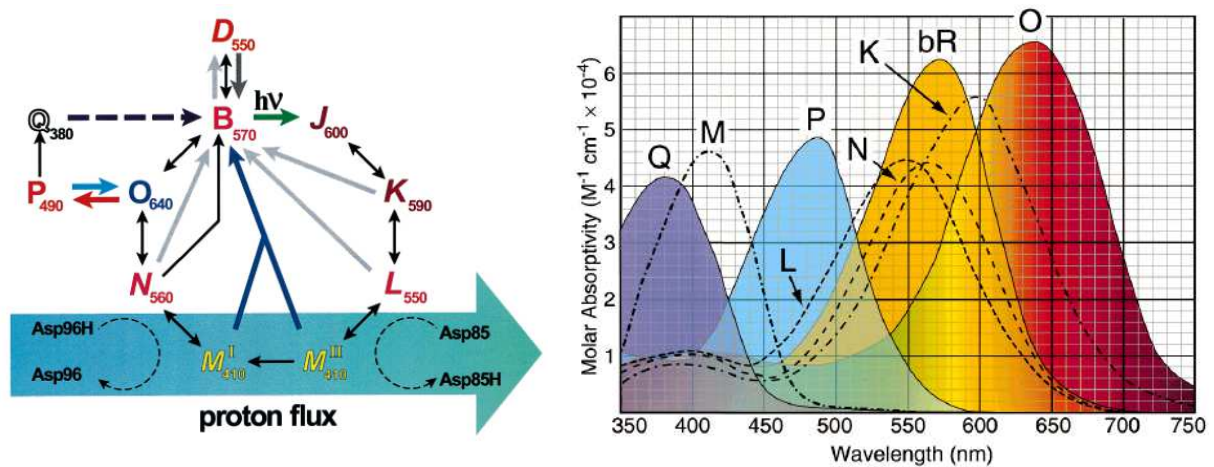


Figure 5 : Photocycle de la bR et spectres d'absorption correspondant.

Tous les états de la bR ont des caractéristiques physico-chimiques différentes. Il y a d'abord pour chaque état un spectre d'absorption propre, avec un maximum noté en indice de la lettre donnant son nom à l'état. De plus, chaque état possède un coefficient d'extinction molaire différent des autres et la base de Schiff peut y être protonée (B, J, K, L, N, O) ou non (M^I et M^{II}). En outre, plusieurs transitions sont des transitions thermo dépendantes et peuvent être stoppées par une température suffisamment basse (-190°C pour bloquer le passage de K vers L, par exemple).

En plus du photocycle, il y a des états qui ne sont pas peuplés dans des conditions physiologiques, ce sont les états P et Q. Ils contiennent le rétinale sous une forme 9-cys [38,39]. Ceci n'est possible que si le rétinale est excité depuis un état tout-trans et que dans le même temps, l'Asp85 est protoné (Asp85H). Ceci n'arrive à la bR naturelle que pour de faibles valeurs de pH [40,41] ou après une dé-ionisation [42,43]. Les PMs deviennent alors des membranes bleues [44]. Ce nom est bien sûr dû à la couleur des membranes ainsi

formées. Cependant ces membranes ne sont pas très stables, elles tendent à s'agréger et à blanchir. D'autres façons d'obtenir ces membranes bleues ont donc été testées. La première consiste à remplacer l'Asp85 [45] par un autre acide aminé qui aurait un pKa lui permettant d'être sous une forme non chargée dans la gamme de pH qui nous intéresse [46]. L'autre possibilité consiste à enlever le groupe carboxyle par mutation. On obtient alors le mutant BR-D85N qui possède un Asn85 plutôt qu'un Asp85. Ces mutations permettent d'obtenir des membranes bleues à température ambiante mais elles ne permettent pas d'augmenter le rendement de conversion du tout-trans vers le 9-cis qui n'est que de 0,02% [47]. La conversion inverse présente une efficacité environ 50 fois plus grande mais reste toujours dans le domaine du pour cent.

B. Applications

Depuis sa découverte en 1971, la bR a été beaucoup étudiée et de nombreuses applications ont découlé de ces recherches. Dans les paragraphes qui suivent, une liste non exhaustive des applications diverses et variées trouvées pour cette protéine est effectuée. Après nous être intéressé aux applications techniques simples de la bR, nous verrons qu'elle est étudiée pour le stockage de données ou comme un matériau photochromique moléculaire.

1. Les différentes applications techniques de la bR

Le transport d'un proton débute grâce à l'absorption d'un photon et est immédiatement suivi par une séparation de charges. Ce début du cycle de la bR influence énormément les propriétés photo-électriques de la protéine. Le transport du proton au travers de la bR nécessite la déprotonation puis la reprotonation de la base de Schiff du rétinol. Ceci cause alors un déplacement important (environ 150 nm) du maximum d'absorption de la protéine. On passe en un temps très court de l'état B vers l'état M avec une absorption à 412 nm. On peut imaginer facilement la bR dans un système d'écriture d'informations photochromiques. De plus, la fonction première de la bR n'est autre que le transport de charges et on imagine aisément qu'elle peut être utilisée à grande échelle, pour la désalinisation de l'eau de mer ou des systèmes artificiels de photosynthèse [48,49].

Le tableau suivant (*Figure 6*) regroupe les principales applications de la bR décrites dans la littérature. Elles sont groupées par propriété utilisée. Bien sûr, la plupart utilisent les propriétés photochromiques de la bR. On trouve donc des applications du type photoélectrique, de stockage longue durée d'informations ou même l'holographie.

<u>Transport de charge :</u> - -	fabrication d'ATP dans des réacteurs Désalinisation de l'eau de mer Conversion d'énergie solaire en électricité
<u>Photoélectrique :</u> - -	détection de la lumière ultra rapide rétines artificielles détecteur de mouvements
<u>Photochromique :</u> -	Stockage d'informations (2D, 3D, holographie) traitement d'information (filtres optiques, réseaux neuronaux, interférométrie, ...)

Figure 6 : Applications techniques de la bR.

L'utilisation des fonctions biologiques de la bR comme pompe à proton photo-activée fut l'une des premières applications de la bR proposée. Malheureusement, des problèmes techniques ont empêché d'arriver à une échelle suffisante pour que les PMs soient utiles à l'industrie photoélectrique. Le problème est en fait assez simple. Il faut tout d'abord créer des membranes synthétiques semblables aux PMs naturelles sur plusieurs mètres carrés sans aucun défaut et avec les mêmes propriétés. C'est-à-dire que toutes les bRs de ces films doivent être parfaitement orientées et qu'aucun proton ne peut traverser la membrane par les interstices entre les protéines ou les lipides. Ceci représente un premier problème. Cependant, imaginons tout de même que nous soyons capables de créer ces films (impossible à ce jour), la membrane de bR doit être en contact avec une solution qui sera déprotonée. Pour que la cellule fonctionne, il faut que les charges ne puissent traverser la membrane qu'en passant dans le circuit électrique et non en traversant la membrane dans les deux sens. Si notre hypothétique film venait à avoir un défaut ou à se détériorer on aurait alors un court-circuit et la génération du courant serait alors impossible. La seule solution serait alors un film capable de s'auto-réparer.

D'autres applications ont été développées ou au moins proposées, mais sans réels détails sur les possibilités ou les principes. La plupart évoque l'effet « d'anesthésiques » sur le photocycle de la bR et leurs utilisations potentielles. On trouve également des biocapteurs pour pesticides, mais aussi la bR peut servir d'indicateur dans les réacteurs enzymatiques et même dans des systèmes de détection des radiations de hautes énergies. La génération de second harmonique avec la bR est possible, mais ne semble pas vraiment compétitive par rapport à la technologie actuellement utilisée. Nous ne parlerons plus de ses applications par la suite mais elles montrent que d'ici quelques années, d'autres applications seront certainement apparues.

2. Photovoltaïsme, Photoélectricité

L'électronique biomoléculaire est définie comme l'étude des biomolécules naturelles ou modifiées (chromophores, protéines, etc.) capables d'être implantées dans des éléments électroniques ou optoélectroniques. Grâce à ses propriétés spécifiques, la bR a été fortement étudiée pour l'électronique biomoléculaire. Cependant, deux principaux problèmes apparaissent. Le premier est qu'elle doit parfaitement s'intégrer au composant et le second est que l'interface (bR/reste du système) doit être optimisée pour atteindre les propriétés maximales du composant.

De toutes les applications de la bR, les applications photoélectriques sont celles qui nécessitent l'orientation des PMs la plus importante. En effet, l'orientation des PMs va influencer fortement le photo-courant créé, puisque le transport de charge ne se fait que dans un seul sens. Pour avoir un courant maximal il faut donc trouver des méthodes permettant d'orienter parfaitement les PMs. De ce fait, bon nombre de solutions à ce problème ont vu le jour, comme par exemple la méthode Langmuir-Blodgett [50,51], des méthodes immuno-chimiques [52], l'électro-sédimentation, les liaisons spécifiques anticorps-antigènes [53], etc. Les avantages et inconvénients de chaque méthode ont été traités par ailleurs [54,55]. En outre, ces méthodes ne permettent que rarement de couvrir de grandes surfaces (de quelques μm^2 à quelque mm^2). L'orientation de ces films est souvent estimée grâce à la mesure et la direction du photo-courant créé par le composant sans prouver réellement l'orientation du film. Cette méthode indirecte est à l'origine de conclusions souvent contradictoires et confuses [56].

De nombreuses études électrochimiques ont été menées sur les caractéristiques optoélectroniques de la bR, la plupart traitant de la tension photovoltaïque [53], mais quelques-unes discutent tout de même du photo-courant créé par les films de bR [57]. Par exemple, Komaya *et al.* ont travaillé sur la réponse électrique de monocouches de bR en liquide [52,58,59]. Ils ont fabriqué une cellule photo-électrochimique dans laquelle était immobilisé un film de bR, entouré par une électrode conductrice transparente d'un côté et un gel électrolyte de l'autre. Lorsque cette cellule est illuminée, un photo-courant de transition est créé. Ce courant dépend du sens de l'orientation de la bR par rapport à l'électrode (côté cytoplasmique contre l'électrode ou contre le gel). Aucun courant ne fut créé de façon continue avec cette méthode. Depuis, Horn et Steinem [60] ont décrit un nouveau modèle de cellule, dans laquelle la bR est adsorbée dans une bicouche lipidique nommée « Nano-black lipid », autosupportée au-dessus d'aluminium poreux. Le diamètre moyen des pores est de

280 nm et ce système montre une grande stabilité sous illumination constante. De plus le courant créé n'est pas seulement un courant de transition, c'est aussi un courant constant.

Les capacités photovoltaïques de multicouches de bR déposées sur une électrode conductrice ont aussi été enregistrées [61,62,63]. Ces études ont montré que ces films présentent une différence de potentielle constante sous illumination, même si elle reste très faible. Elle est également accompagnée d'un faible courant de transition. Ils sont tous deux dus au déplacement de charge à l'intérieur de la bR elle-même qui commence par la photo-isomérisation du rétinol [59]. Le temps de réaction de la bR dans ce type d'échantillon peut descendre jusqu'à 10^{-11} seconde si le contact avec l'électrode est bien établi. Cependant, les propriétés photoélectriques de ces échantillons dépendent fortement du taux d'humidité ambiant [61,62], reflétant ainsi parfaitement l'influence de l'eau sur le photocycle et sur la redistribution des charges induite par l'illumination de la bR.

Outre la tension photovoltaïque, on trouve aussi un courant traversant la bR dans des systèmes photoélectriques. La plupart des valeurs de photo-courant sont comprises entre 0,2 et 40 $\text{pA.cm}^{-2}.\text{ML}^{-1}$, sauf deux exceptions décrites dans les références [57,64]. Dans l'un de ces deux cas [57], la bR était enfermée dans un transistor de GaAs, la photo-activité de la bR était alors mesurée grâce à la valeur du courant source/drain dans le transistor qui ne passe pas à travers la bR. Dans l'autre cas, l'environnement local de la bR peut être considéré comme étant une solution, la bR était incorporée dans un gel de poly(vinyl alcohol) (PVA) et elle ne servait que comme une pompe à proton. Même dans ces conditions, il fallait une tension externe de 20 V et une lampe de 600 mW.cm^{-2} de puissance. Dans les deux cas, on est très éloigné des mesures standards de courant au travers de films de bR.

On trouve également des tests de transport électronique réalisés avec un microscope à effet tunnel (STM) [65,66]. Cependant la bR fut utilisée plus pour trouver les conditions optimales pour l'obtention de mesures reproductibles avec des échantillons biologiques. On est donc assez loin des mesures de propriétés électriques. Pourtant, on trouve tout de même des informations sur ces mesures, puisqu'elles ont été réalisées avec une tension de 5,5 V et un courant de 2 pA. Si on utilise des valeurs plus hautes de courant on risque d'endommager la protéine [67]. Malgré la détection d'un courant tunnel, on ne peut vraiment conclure sur la nature de ce courant. En effet, on peut penser que ce courant est principalement dû à une émission de champ et à la présence d'états électroniques vides dans la protéine. De manière générale il y a discussion (théorique et expérimentale) sur l'origine des courants tunnels à travers les molécules biologiques. Cette discussion est notamment alimentée par les conditions extrêmes utilisées pour enregistrer les images et par les faibles rayons de courbures

des pointes STM. C'est pourquoi la microscopie à force atomique avec des sondes conductrices (C-AFM) s'est développée pour les molécules biologiques. Elle a plusieurs avantages sur le STM. Tout d'abord, il y a contact direct entre la pointe (électrode) et l'échantillon. Ensuite, la force entre l'échantillon et la pointe est parfaitement contrôlée et finalement, on peut enregistrer en continu les propriétés électriques de l'échantillon puisqu'on mesure le courant le traversant. Malgré cela, la détection d'un courant n'a jamais été possible. Le courant, s'il existe, est trop faible pour être détecté. On peut tout de même enregistrer des images avec cette méthode, mais on considère le zéro quand la pointe balaye une membrane de 5 nm. On a donc le zéro quand la pointe balaye la surface des PMs, mais on visualise bien les membranes si le substrat est conducteur. Avec cette méthode, on peut aussi enregistrer des courbes courant-tension, mais les mesures ne sont pas très reproductibles. Dans le cas où ces mesures sont reproductibles, elles sont faites à de telles tensions qu'elles ne sont pas vraiment utilisables. Pour qu'elles deviennent utilisables, il faudrait diminuer les valeurs des tensions ou augmenter la taille des sondes. Mais dans ce cas, des courts circuits empêchent la reproductibilité des résultats. On trouve tout de même, quelques mesures sur des multicouches [68] et sur des PMs [65,66].

La bR montre donc des propriétés photoélectriques intéressantes pour une molécule biologique. Un courant électrique peut être créé par la bR, même s'il est faible (3×10^{-19} A par trimère de bR), il est au moins 4 ordres de grandeur plus important que pour des peptides sans eau et avec une épaisseur de 5 nm. Cependant, les mécanismes de transport de ce courant ne sont pas connus mais semblent être dépendants du rétinol de la protéine. Il profite aussi du fait que la bR est une pompe à proton mais les mécanismes restent inconnus à ce jour. Nous avons également vu que la bR peut être intégrée dans des jonctions planes et solides et qu'elle conserve sa fonctionnalité.

3. Stockage de données

Le stockage de données à long terme et haute densité est un des domaines où les techniques optiques ont été développées. La sécurité des données, la densité de stockage, le taux de transfert des données et le temps d'accès à ses dernières sont des paramètres critiques. Le système doit avoir un minimum de parties amovibles car cela diminue les risques de défaillance du système. Enfin, le système doit conserver son intégrité même si le courant est coupé. La bR possédant différents états optiques, elle représente comme tous les matériaux photochromiques un bon candidat pour le stockage de données. On peut par exemple imaginer des données stockées grâce aux états B et M de la bR. Si on considère qu'on peut coder

directement les trimères de bR dans leur état naturel, on pourrait stocker plus de 150 000 lignes d'information par mm, là où aujourd'hui avec les meilleures méthodes (Blu-ray) optiques conventionnelles on se trouve à 3125 lignes/mm. Cependant, il faudrait un graveur capable d'atteindre ces résolutions (environ 10 nm). Pour le moment les seuls appareils capable d'y arriver sont les microscopes optiques à champ proche (SNOM). Le problème est que ces appareils sont analytiques et qu'ils ne peuvent atteindre les taux de transfert requis.

Les matériaux photochromiques tels que la bR ont un autre handicap important qui est que la lecture, comme l'écriture, se fait par illumination. Une illumination non contrôlée provoquerait la perte des données. Il faut donc trouver une méthode pour que la lecture ne modifie pas les données stockées. Le « gating » est le procédé qui décrit le fait que la lecture nécessite une première méthode et que l'écriture nécessite l'ajout d'une seconde pour ne pas dénaturer l'information durant la lecture. Ceci implique que la lecture seule ne peut effacer l'information puisque l'écriture se fait par une autre méthode. Dans le cas des matériaux photochromiques comme la bR, il faut donc que la lecture se fasse de façon optique mais qu'un deuxième effet physique soit mis en jeu pour l'écriture. Dans le cas du stockage magnéto-optique, la lecture est faite grâce à une tête magnétique mais l'écriture nécessite la présence d'un laser. Ce genre de disque peut être manipulé sans trop de précaution.

Un dernier point est moins crucial que les autres mais nécessite tout de même d'être noté, c'est le nombre de cycles « écriture-lecture-effacement » (WRE) des données. Il doit être de quelques centaines de milliers dans le cas du stockage longue durée. Le facteur le plus important étant la densité de stockage.

Les matériaux photochromiques sans gating ne sont pas dépourvus de tout intérêt. On trouve pour les molécules biologiques comme la bR des applications. Elles ne se limitent pas aux méthodes de stockage 2 dimensions actuelles ; elles explorent des techniques telles que le stockage en 3 dimensions ou même l'holographie. Les techniques 3 dimensions augmentent les capacités d'un système de façon drastique, alors que l'holographie permet de réaliser des composants dans lesquels l'information est adressable. Elle permet également d'avoir des mémoires associatives.

a) Le stockage 2 D

Pour le stockage 2D, le même système que pour les CD-Roms est étudié. Une tête fait à la fois l'écriture et la lecture et le support d'information bouge au-dessus ou en-dessous de cette tête. Les limitations d'un tel système sont doubles. La première est la précision du mouvement mécanique de la tête et son positionnement plus ou moins précis. La seconde est

la longueur d'onde de la lumière utilisée pour la lecture de l'information. Le standard est aujourd'hui le Blu-ray, avec une longueur d'onde de 405 nm. Bien sûr, les SNOM actuels atteignent des résolutions de l'ordre de 10 nm, mais ils ne sont pas adaptés à la lecture rapide ni même à l'industrialisation. C'est pourquoi les efforts se portent plus vers la diminution de la longueur d'onde puisque la diminution d'un facteur 2 de la longueur d'onde entraîne une augmentation d'un facteur 4 de la densité d'information sur le support. Dans ce type de stockage, 10^4 ou 10^5 cycles WRE sont suffisants donc même si on veut utiliser un matériau photochromique on peut en trouver sans trop de difficulté [69] [70].

Depuis longtemps, les effets d'un champ électrique sur le photocycle de la bR sont connus [71]. De plus, avec l'apparition du mutant BR-D85N, un nouvel effet fut découvert. La bR peut avoir un mécanisme de gating [72]. Ils ont ouvert une nouvelle direction pour utiliser la bR dans un système de stockage 2D, mais personne ne peut prédire quand et si elle deviendra un jour une technique compétitive.

Un autre système de gating pour la bR a été développé, il utilise un système à deux photons. Il est bien connu que la bR, dans les membranes bleues, peut être convertie en une forme 9-cis de son rétinol, créant ainsi des membranes roses. De plus, les états O et P ont les mêmes fonctionnalités et l'excitation par un photon pour passer de l'état B à l'état O est possible, tout comme l'absorption d'un second photon pour passer de l'état O à l'état P. Ceci est vrai même avec de la bR de type naturel [73]. C'est le principe de base pour le stockage de données à base du « photocycle secondaire » [74] (« Branched Photocycle » en anglais) qui peut également être utilisé pour le stockage 3D.

b) Le stockage 3D

Le stockage 3D semble être plus adaptable à la bR. En effet, on trouve 3 possibilités pour utiliser la bR dans ce type de système : le stockage holographique, le stockage utilisant le « photocycle secondaire » et le dernier utilise l'absorption à deux photons.

Ce dernier est atteint grâce à deux rayons laser [75]. Chaque rayon apporte la moitié de l'énergie nécessaire au passage de la bR de l'état B à l'état M ou vice versa. La transition à deux photons dépend du produit des intensités des deux parties (proportionnel à I^2). À l'intérieur du volume d'interaction, la probabilité est suffisante pour qu'une transformation de la population d'un état vers l'autre soit mesurable. Les longueurs d'onde utilisées doivent remplir la condition sine qua none :

$$1/\lambda_{excitation} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2 \quad (Eq 1)$$

Ceci est vérifié si on utilise $2/\lambda_{excitation}$ pour chaque rayon ; c'est-à-dire avec des lasers à 820 nm et 1140 nm, pour atteindre les transitions à 410 nm et 570 nm respectivement [76]. Cependant, sur le chemin des rayons il est important de prendre en compte les absorptions à deux photons non désirées. C'est pour cela qu'il est avantageux de prendre deux longueurs d'onde différentes qui respectent l'équation précédente. C'est un avantage certain de pouvoir choisir deux longueurs d'onde pour lesquelles la bR est quasiment transparente. Dans ce cas, l'absorption à un photon n'est pas un phénomène compétitif. De plus, la bR montre une section efficace très importante pour l'absorption à deux photons, ce qui fait d'elle un candidat très sérieux pour le stockage 3D via cette méthode [75] encore que le système doit être refroidi si on veut qu'il fonctionne. Le dernier problème de cette méthode est la lecture de l'information. En effet, un seul point dans le volume doit créer un signal nous permettant de connaître l'état photochromique et donc donner une valeur de 0 ou de 1. C'est un problème fondamental, discuté en détail par différents auteurs [77]. Les propriétés photochromiques de la bR permettraient peut être de régler ce problème.

L'autre approche mentionnée dans la littérature pour le stockage d'informations à long terme utilisant la bR est un système à deux fois un photon. Dans un premier temps, un laser vert fait passer la bR de son état B à l'état J [78]. Une fois arrivée là, la bR passe par une série de relaxations thermiques jusqu'à l'état O. Le temps caractéristique du passage de J à O étant connu, toutes les bR peuvent être excitées en même temps depuis cet état O. Un laser rouge les fait donc passer de O vers P pour atteindre le fameux état 9-cis de leur rétinol. Une dernière relaxation les fait passer de P vers Q. Il faut forcément une excitation pour passer de P ou Q vers B. On peut donc envisager cette solution comme viable, mais le problème réside dans le taux de transfert de O vers P qui reste très faible à ce jour et qui doit sensiblement être amélioré pour arriver à des taux de transfert équivalents à ceux qu'on trouve actuellement sur des disques durs conventionnels.

c) Stockage holographique et mémoire associative

Lors d'un stockage par holographie, toute une page d'information est gravée en même temps. Aujourd'hui on peut de cette façon stocker simultanément plus de 10^6 bits d'information en parallèle. Après écriture d'une page, le support pivote d'un angle prédéfini ou se déplace et on peut de nouveau écrire sur la nouvelle page. On peut ainsi écrire plusieurs

informations au même endroit. Cependant, plus on stocke de pages au même endroit plus le contraste diminue sur les pages écrites précédemment.

Pour lire l'information il suffit de présenter la page dans la même position géométrique que lors de sa gravure et la lire avec un laser de référence. L'hologramme qui en sort permet la lecture en parallèle de toutes les données comprises sur cette page.

Le stockage par holographie permet la lecture rapide d'une grande quantité d'information et est le plus simple système pour réaliser des mémoires à contenu adressable ou mémoires associatives. Comme la bR peut être utilisée pour faire de l'holographie, on la retrouve dans le développement de matériau spécifique à la fabrication de mémoire associative. De plus, pour le moment, aucun matériau conventionnel n'est capable de réaliser de tels composants et les propriétés holographiques de la bR couplées à ses propriétés électroniques peuvent représenter une alternative crédible au développement des mémoires holographiques.

De manière générale, les raisons d'utiliser la bR pour le stockage à long terme de données ne sont pas évidentes. Il faut d'abord prouver que ses différentes propriétés optiques et électroniques apportent un plus au stockage de données. Cependant, puisque toutes les propriétés de la bR ne sont pas encore connues et que les mécanismes de la pompe à proton ne sont pas encore parfaitement maîtrisés, il est important de tenter d'apporter avec la bR une alternative aux procédés conventionnels de stockage de l'information.

4. Traitement de l'information

Le traitement de l'information par méthode optique est l'application qui convient probablement le mieux à la bR. En effet, le nombre de cycles WRE est beaucoup plus important que lors du stockage à long terme et l'état de la bR peut être modifié un nombre très important de fois. Sa capacité à être modifiée rapidement et sa grande stabilité en font un matériau de tout premier ordre pour ce type d'application. En effet, il est très rare de trouver des matériaux photochromiques naturels avec une telle stabilité et la synthèse de tels composés serait extrêmement difficile, voire impossible. C'est pourquoi un composé naturel tel que la bR ne peut être mis de côté. La bR, permettant un grand nombre de cycles WRE et une rapidité d'exécution importante, peut être utilisée dans des applications en temps réel telles que la reconnaissance de réseaux et l'interférométrie.

En plus de la réversibilité de la bR, on trouve d'autres propriétés intéressantes qui seules ne permettraient pas de faire de la bR un candidat sérieux, mais qui se montreraient utiles pour la fabrication de composants électroniques. On trouve par exemple dans ces

propriétés : le changement d'indice de réfraction (utile pour la conjugaison de phase ou l'interférométrie), la non-linéarité optique (filtrage ou reconnaissance de réseaux), etc. Voyons donc en détail ce que la bR permet de faire dans le traitement des données.

a) Filtrage non linéaire

Deux types de filtrage non linéaire ont été décrits avec la bR. Le premier utilise la photo-réponse non linéaire de la bR et la seconde méthode le filtrage de Fourier. Dans les deux cas, l'utilisation d'une seconde longueur d'onde permet un contrôle fiable du système.

Si on considère un photocycle de la bR simple, on peut se permettre de ne considérer que 2 états : B et M. L'état M étant l'état le plus stable de tous les intermédiaires, on peut le considérer comme un état stable. En effet, si on abaisse suffisamment la température, les relaxations thermiques ne sont pas possibles et l'état M est stable. Il faut alors absorption d'un photon bien spécifique pour relancer le processus de retour à l'état B. Il faut de même un photon pour activer le photocycle et donc passer de B à M. En résumé, un photon de 570 nm permet de passer de B à M et un photon de 410 nm permet de revenir de M vers B.

Les propriétés d'absorption non linéaires de la bR sont effacées avec le photocycle. En effet, si on considère un cycle à 2 états comme précédemment, on peut arriver à modéliser le photo-blanchiment de la bR. En effet, en passant de l'état B à M elle devient en partie transparente à 530 nm. En fait, la bR filtre les faibles intensités et laisse passer la quasi-totalité des fortes intensités. Elle permet donc de filtrer des images et d'augmenter leur contraste. Le seuil de ce filtrage ainsi que toutes les propriétés de ce filtre dépendent du temps de vie de l'état M. Ce principe de fonctionnement pour l'augmentation de contraste est assez vieux [79], mais l'utilisation de ce type de filtrage dans le plan de Fourier est plus nouveau et bien plus efficace [80,81].

En effet, dans le plan de Fourier d'une lentille la distribution d'intensité est très large. L'ordre zéro représente la valeur moyenne de la luminosité de l'image et un rapport exponentiel existe entre les ordres. Ceci permet la suppression du bruit par passage au travers d'un film de bR. En effet, elle permet d'éliminer ou au moins de réduire sensiblement les ordres les plus faibles et ainsi réduire le bruit. Une activation photochimique de la bR permet de contrôler simplement le système, en le maintenant dans l'état M grâce à un laser de couleur vert. On peut ainsi couper différents ordres dans la transformée de Fourier de l'image et améliorer sa qualité.

b) Conjugaison de phase

En photolithographie, un masque partiellement transparent est utilisé pour graver une résine photosensible. Plus l'intensité de la lumière est forte et plus le temps d'exposition doit être court. Dans le cas d'utilisation d'un laser comme source, on peut après le passage du masque utiliser un amplificateur optique, ce qui provoque une distorsion dans le front d'onde. On utilise alors un miroir à conjugaison de phase pour annihiler ces distorsions et ré-amplifier le signal. Une lame semi transparente permet alors de faire sortir du système la lumière amplifiée et parfaitement en phase.

Plusieurs groupes ont montré un intérêt certain pour ce type de miroir en utilisant la bR [82,83,84]. Comme le système est très dur à stabiliser, un composé actif comme la bR est très appréciable. En effet, elle peut très bien compenser les variations lentes du système ou les dérives constantes, mais son plus gros avantage est son faible taux de diffraction qui est de l'ordre de quelques pourcents dans un film de bR.

c) Reconnaissance de formes

La reconnaissance de formes grâce à l'holographie est une méthode qui permet de comparer directement deux images. Prenons le cas de la recherche d'un mot spécifique dans toute une page de texte. La reconnaissance de formes peut par interférométrie donner les positions exactes du mot que l'on cherche dans cette page de texte. En effet, on injecte simultanément les deux images dans un interféromètre, l'une correspondant au mot cherché et l'autre au texte complet. La corrélation des deux images donne tout de suite les positions du mot recherché grâce à des points lumineux. Cependant, ce n'est pas le seul avantage de ce type de mesure, il peut en plus dire si le mot affiché dans le texte est bien le même que celui d'origine ou si c'est un mot très ressemblant. Un corrélateur holographique ne donne pas uniquement la position mais il donne aussi le degré de similitude. Dans le cas d'une ressemblance parfaite, la corrélation atteint son maximum et il donne une valeur plus faible pour des mots ressemblants.

Il y a quelques années, un corrélateur holographique à base de bR a vu le jour dans un laboratoire [85,86]. La vitesse et le rapport signal-bruit étaient tous deux excellents, les valeurs expérimentales atteignant les valeurs théoriques du système [87]. Un corrélateur adaptatif, c'est-à-dire un corrélateur capable de détecter un mot ayant tourné ou changé de taille, a même été construit [88]. Il n'y a pas un seul composé qui puisse rivaliser avec la bR dans ce type de système à ce jour, mais les applications de la corrélation holographique sont

très minces pour le moment. Cependant, ce type d'appareil pourrait servir un jour si le besoin s'en fait sentir.

d) Interférométrie holographique

L'interférométrie holographique est une technique très efficace dans l'analyse de la déformation d'objet. Elle peut atteindre une résolution de l'ordre du centième de longueur d'onde, elle est non destructive et plutôt rapide.

Les premiers articles où la bR fut utilisée dans ce domaine traitent d'un interféromètre à fibre optique [89,90]. Il utilisait des films de bR pour contrôler la croissance de cristaux [91] ou réaliser des analyses vibrationnelles [92].

5. Conclusion

L'utilisation de la bR comme commutateur moléculaire en optoélectronique et autres applications semble être techniquement faisable. Cependant, les avancées ne sont pas suffisantes pour passer du niveau de la recherche en laboratoire à l'industrialisation à grande échelle. Les seules raisons qui feraient passer de l'électronique actuelle à une électronique à base de biomatériaux tels que la bR seraient un gain en performance, or pour le moment ce n'est pas encore le cas.

La bR représente plus un échantillon test pour une nouvelle approche aux nanotechnologies. La possibilité de la modifier génétiquement pour améliorer ses performances en fait un échantillon parfait pour tester de nouveaux principes de fonctionnement de composant électroniques à base de biomatériaux. Elle présente également des propriétés physico chimiques extrêmement importantes telles que la stabilité physique, chimique et même optique. Elle conserve également dans de nombreuses conditions sa fonctionnalité de pompe à proton.

La recherche sur l'intégration de la bR en électronique n'a commencé qu'il y a 30 ans et n'a pas été aidé par le fait que la bR ne peut remplacer directement un composé dans l'électronique actuelle. Il faut repenser les méthodes de fabrication et les principes de fonctionnement de nos ordinateurs pour pouvoir un jour espérer intégrer la bR dans notre vie quotidienne.

C'est pourquoi nous avons décidé de la coupler à des nanoparticules fluorescentes semi-conductrices permettant d'augmenter ses capacités et d'ouvrir de nouveaux horizons à l'électronique biomoléculaire. Nous avons choisi de les coupler à des boîtes quantiques de

CdSe/ZnS. Nous allons donc maintenant décrire leurs propriétés, d'où elles les tirent et bien entendu leurs applications.

III. Les boîtes quantiques à base de semi-conducteurs

Les nanocristaux à base de semi-conducteurs ou boîtes quantiques (QDs « quantum dots » en anglais) représentent à elles seules tout l'intérêt des nanotechnologies. En effet, en passant de matériaux massifs à de petites particules les propriétés physiques de la matière évoluent de manière impressionnante. Les propriétés physiques d'un matériau massif peuvent être modifiées en modifiant sa taille. C'est bien là toute l'utilité des nanotechnologies. Les QDs en sont un parfait exemple. Dans cette partie, nous nous intéresserons donc à ces particules, à l'origine de leurs propriétés physiques, ainsi qu'à leurs applications dans divers types de matériaux.

A. Généralités sur les QDs

En réduisant la taille d'un matériau, ses propriétés physiques changent de façon dramatique. Les QDs ne dérogent pas à cette règle. Les QDs sont des monocristaux de semi-conducteurs de type II-VI, III-V ou IV-VI. Elles sont composées de matériaux tels que le CdSe, le ZnS, le CdTe, InAs, etc. Elles sont assimilables à de petites sphères mais on peut synthétiser ces matériaux sous différentes formes telles que des couches minces, des nano-fils ou des petits bâtonnets appelés « nano-rods ». Il existe différents types de QDs qui ont des propriétés différentes en fonction de la façon dont elles sont fabriquées. Détaillons donc les propriétés des QDs.

1. Structure des QDs

Les QDs sont assimilables à de petites sphères de semi-conducteurs. Elles ont un diamètre pouvant varier de 1 à 10 nm, en général. Elles ne sont pas réellement sphériques puisqu'elles sont composées de monocristaux cristallisés en wurtzite (pour le CdSe) et donc légèrement allongées le long de l'axe de symétrie hexagonal du cœur (ellipticité d'environ 0,1) [93]. Du fait de leur faible taille, elles ne sont composées que de quelques centaines de milliers d'atomes, dont beaucoup se trouvent à la surface. La *Figure 7* montre le schéma d'une QD stabilisée par du tri-n-octyl phosphinoxyde (TOPO). Une QD se compose d'un cœur (core) photoactif inorganique à base de semi-conducteur et de ligands organiques utiles à sa stabilité et à sa solubilité. Le cœur est souvent entouré d'une coquille (shell) pour le protéger et augmenter ses propriétés optiques. Cette coquille est elle-même composée de semi-

conducteur et permet notamment de réduire le nombre de défauts de surface de la QD ou du moins de réduire leurs effets néfastes sur la fluorescence de la QD.

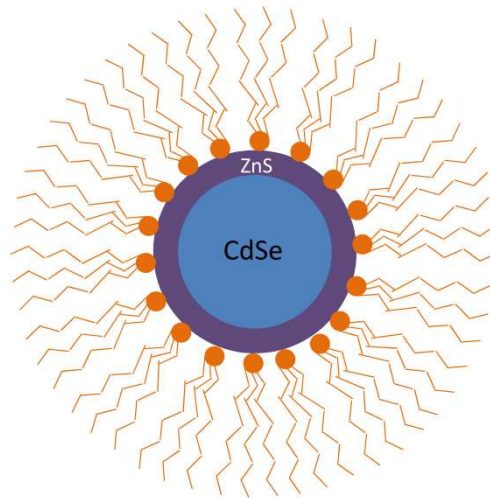


Figure 7 : Schéma d'une QD cœur/coquille de CdSe/ZnS entouré de TOPO

Les QDs sont toutes composées d'un cœur à base de semi-conducteurs II-VI (CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS, ZnSe) [94,95,96,97,98,99,100,101,102], III-V (InP, InAs, GaN, GaP, GaAs) ou alors IV-VI (PbS, PbSe, PbTe). Ces numéros font référence aux groupes auxquels appartiennent les éléments utilisés dans le tableau périodique des éléments. Dans ce travail de thèse nous avons utilisé des QDs à base de CdSe, recouverte par une coquille de ZnS. D'autres matériaux tels que le CdTe ont été utilisés par d'autres groupes, mais leur photostabilité est moins importante que pour le CdSe, il en découle un photo-blanchiment plus rapide.

On trouve également dans la bibliographie la possibilité d'utiliser ces mêmes éléments, mais sous différentes formes, telles que des bâtonnets, des fils ou même des couches minces.

2. Structure électronique et structure de bande

Les matériaux semi-conducteurs présentent la particularité d'avoir leur bande de valence (BV) assez proche de leur bande de conduction (BC). La BV représente les états comblés par les électrons à l'intérieur du matériau, dans laquelle les électrons sont suffisamment liés aux atomes pour ne pas pouvoir se déplacer librement dans le cristal. La bande de conduction représente, elle, comme son nom l'indique la bande responsable de la conduction dans un matériau. A l'intérieur de cette dernière les électrons ne sont que peu liés à leur atome et peuvent se mouvoir d'un atome à l'autre.

Ces deux bandes sont séparées par une bande interdite aux électrons (voir *Figure 8*). La valeur de l'énergie nécessaire pour passer d'une bande à l'autre est appelé « l'énergie de gap » notée E_g . C'est la valeur d' E_g qui définit la limite entre semi-conducteur et isolant. En effet, dans les isolants, la valeur de ce gap est supérieure à la dizaine d'eV, alors qu'il n'est que de quelques eV pour les semi-conducteurs. Dans le cadre des conducteurs, BC et BV se chevauchent, les électrons peuvent donc se déplacer sans aucun problème.

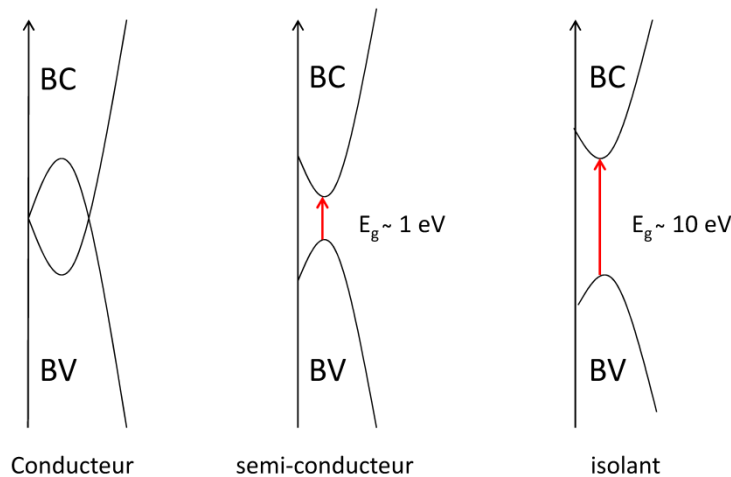


Figure 8 : Schéma de bande des conducteurs, semi-conducteurs et isolants.

Dans le cas des semi-conducteurs, les électrons ont besoin d'énergie extérieure pour pouvoir passer de BV vers BC, alors que dans les isolants l'énergie nécessaire est trop importante pour que l'excitation des électrons soit possible. Cette énergie peut leur être fournie par augmentation de la température, par des chocs avec des particules (photons, électrons) ou par application d'un champ électrique.

Pour bien comprendre cette structure en bande, il faut remonter aux semi-conducteurs massifs. En effet, les propriétés optiques des semi-conducteurs sont liées à leur structure électronique. La structure électronique des semi-conducteurs massifs, se décompose en bandes accessibles ou non aux électrons.

L'existence de ces bandes vient des liaisons entre les atomes. En effet, il existe des liaisons entre deux ou plusieurs atomes des matériaux semi-conducteurs. Ces liaisons font intervenir les électrons de valence des atomes. Par exemple, prenons deux atomes de Silicium. Ces deux atomes identiques possèdent chacun quatre électrons de valence ($[\text{Ne}] 3s^2 3p^2$). L'interaction entre ces deux atomes crée des orbitales s et p, liantes et antiliantes (voir *Figure 9*).

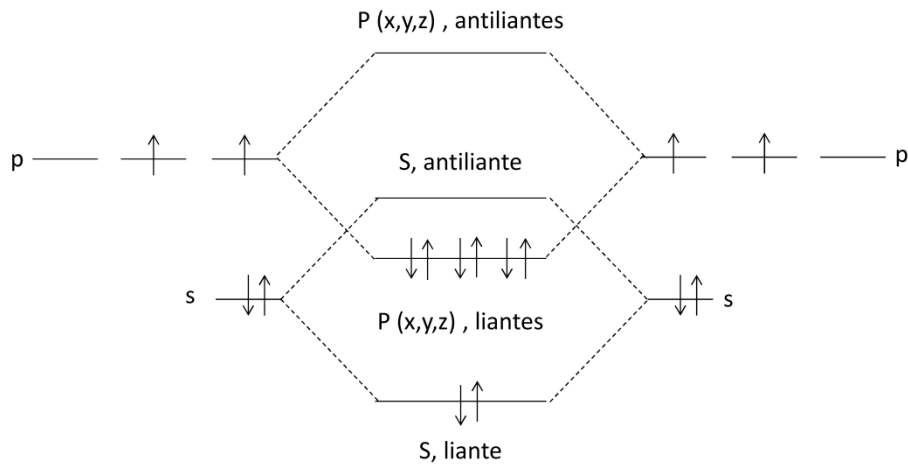


Figure 9 : Schéma des niveaux d'énergie de deux atomes de silicium couplés, ne tenant compte que des niveaux s et p.

Lors de la formation d'un cristal, tous les atomes mettent en commun leurs électrons de valence. Il s'ensuit donc la formation de ces orbitales s, p_x , p_y et p_z . Le grand nombre de ces orbitales donnent naissance à des bandes d'énergie (voir Figure 10). Ainsi la bande de valence est essentiellement constituée d'orbitale p liantes, alors que la bande de conduction est constituée d'orbitales s antiliantes. Entre ces deux bandes apparaît une bande interdite dont la largeur est E_g .

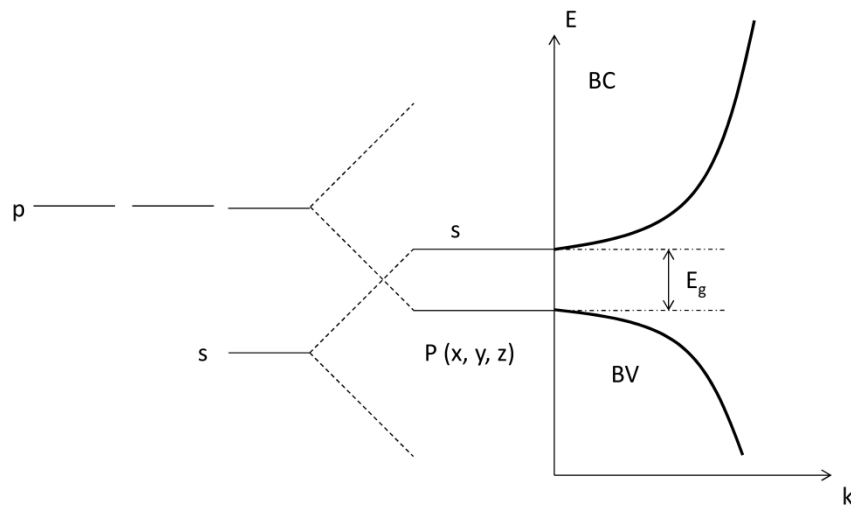


Figure 10 : Représentation simple de la structure de bande d'un semi-conducteur massif, en fonction du vecteur d'onde k , en ne tenant compte que des niveaux d'énergie s et p. E_g est la largeur de la bande interdite.

Dans cette étude ce n'est pas du silicium qui est utilisé, mais un matériau composé d'éléments issus des colonnes II et VI de la classification périodique. Les QDs utilisées étaient composées de CdSe. Le Cd est un élément de type II, il possède deux électrons de

valence sur une orbitale s tel que : $[Cd] = [Kr] 4d^{10} 5s^2$. L'atome de Se est lui un élément de type VI, il possède six électrons de valence. Sa structure est donc $[Se] = [Ar] 3d^{10} 4s^2 4p^4$. Ainsi la BV du cristal de CdSe est principalement formée d'orbitales p du sélénium, alors que la BC est formée principalement d'orbitales s du cadmium. Les niveaux de conduction sont dégénérés deux fois par le spin des électrons et la courbe de dispersion de cette bande peut être considérée comme parfaitement parabolique. En revanche la BC est dégénérée six fois en $k = 0$ et sa courbe de dispersion est plus complexe.

Cette dégénérescence est partiellement levée grâce au fort couplage spin orbite dans le sélénium. En effet, la description des bandes d'énergie doit tenir compte de deux nombres quantiques que sont le moment orbitaire ($I_h=1$) et le moment de spin ($s_h=1/2$). La combinaison de ces deux moments donne un nouveau nombre quantique le moment angulaire J. D'après les valeurs d' I_h et de s_h , J peut prendre les valeurs 1/2 ou 3/2 ($J = I+s$ ou $I-s$), auxquelles correspondent deux bandes séparées, en $k = 0$, par la constante de couplage spin orbite Δ_{SO} . Pour le CdSe, $\Delta_{SO}=420$ meV.

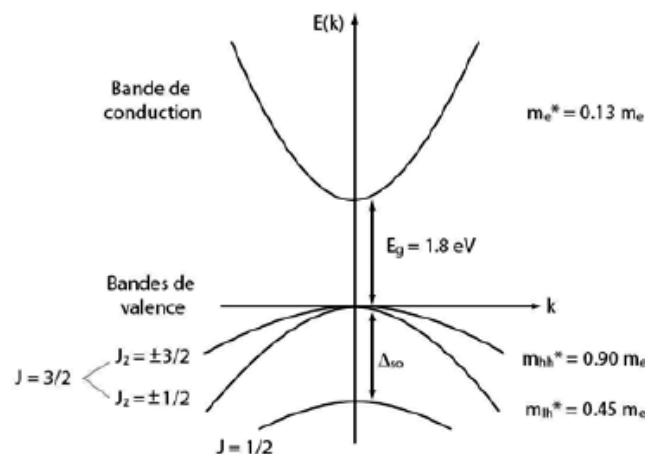


Figure 11 : Structure de bande du CdSe massif ne tenant compte que des niveaux s et p. Les valeurs d' E_g , du couplage spin orbite Δ_{SO} , du moment angulaire J et des masses effectives sont indiqués.

La bande $J = 3/2$ est dégénérée quatre fois en $k = 0$ et se dédouble pour $k \neq 0$, donnant naissance à deux courbures différentes. Ces bandes se distinguent par leur projection du moment angulaire total sur l'axe cristallin : $J_z = \pm 1/2$ pour celle de plus forte courbure et $J_z = \pm 3/2$ pour celle de courbure moindre. La première bande est dite bande de trous « légers » (lh pour light holes) et la seconde, bande de trous « lourds » (hh pour heavy holes). On introduit la notion de masse effective m^* , afin de tenir compte de la courbure de bande que

voit chaque porteur de charge. Dans l'approximation du potentiel parabolique, chaque bande i possède, au voisinage de $k = 0$, une énergie :

$$E(k) = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_i} \quad (\text{Eq 2})$$

Où \hbar est la constante de Planck réduite. On définit m^* par rapport à la masse de l'électron au repos m_e . Par exemple, les électrons dans la bande de conduction du CdSe ont une masse effective de $m_e^* = 0,13 m_e$ (voir *Figure 11*).

3. Influence du diamètre des particules

Les QDs de CdSe possèdent des propriétés directement liées à leur diamètre. La propriété la plus utilisée par la communauté scientifique est la possibilité de modifier la largeur de la bande interdite en modifiant le diamètre de la particule [103,104]. Comme nous l'avons déjà vu, à l'état massif les semi-conducteurs présentent une BC (haute en énergie) et une BV (basse en énergie), séparées par une bande interdite de largeur E_g . Il est possible grâce à une excitation lumineuse de faire passer les électrons de BV vers BC. L'énergie nécessaire à ce processus doit être supérieure à E_g . Dans ce cas, l'électron libère un trou dans BV. Comme l'électron et le trou sont de charge opposée, ils ne peuvent se mouvoir librement l'un par rapport à l'autre à cause des interactions coulombienne, on parle alors de paire électron-trou ou d'exciton. Cet exciton possède une énergie légèrement inférieure à l'énergie de la bande de conduction. En même temps sa fonction d'onde est étendue sur une région large, c'est-à-dire que son rayon est très grand car les masses effectives des porteurs de charge sont petites et que la constante diélectrique est grande.

La diminution de la taille des particules à quelques nanomètres conduit à la situation atypique où l'exciton est plus grand que les dimensions de la particule. Dans les QDs, les porteurs de charges doivent accepter une énergie cinétique plus élevée, ce qui conduit à une augmentation du gap et à un confinement des niveaux énergétiques en valeurs discrètes. Ce phénomène est appelé « confinement quantique » [105]. En raison de cette diminution de diamètre, la structure énergétique passe d'une structure en bandes à une structure en niveaux discrets.

La relation entre le diamètre et E_g des nanocristaux a été développée par Brus en faisant une approximation de particules sphériques [106]:

$$E_g = E_g^{massif} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,786e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 r} \quad (\text{Eq 3})$$

Dans laquelle E_g^{massif} correspond à la largeur de la bande interdite dans le semi-conducteur massif. Elle est aussi la valeur vers laquelle tend E_g si r tend vers l'infini. Le second terme en $1/r^2$ est le terme de confinement quantique calculé selon l'hypothèse d'un puits de potentiel sphérique, dans lequel sont confinés électrons et trous. Le troisième terme décrit l'attraction coulombienne entre l'électron et le trou. ϵ_r et ϵ_0 sont respectivement la permittivité relative du matériau et la permittivité du vide.

La distance séparant électron et trou est appelée rayon de Bohr de l'exciton. Il est noté r_B . Cette distance est fonction du matériau. Il peut être calculé à partir du modèle de Bohr de l'atome d'hydrogène avec les paramètres du matériau semi-conducteur du nanocrystal :

$$r_B = 0,053\epsilon_r m_e \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad (\text{Eq 4})$$

Par conséquent on peut introduire r_B dans l'équation 3 :

$$E_g(eV) = E_g^{massif}(eV) + \frac{2,6}{\epsilon_r r(nm)} \left(2,74 \frac{r_B(nm)}{r(nm)} - 1 \right) \quad (\text{Eq 5})$$

Cette formule permet de façon simple de calculer le gap des QDs de rayon r de différents matériaux. On peut, suivant le type de matériau utilisé, couvrir une large gamme spectrale allant de l'infrarouge à l'ultraviolet, ceci grâce aux variations de la largeur de la bande interdite.

4. Propriétés optiques

Comme nous l'avons vu les propriétés optiques des QDs dépendent de leur diamètre principalement. Elles sont en partie dues au confinement quantique. En effet, l'absorption d'un photon ne se fait que si son énergie est supérieure à E_g . Les spectres d'absorption des QDs sont très spécifiques. On trouve tout d'abord ce qu'on appelle le premier pic excitonique. Ce pic apparaît à cause du confinement quantique, c'est l'énergie minimum qu'il faut fournir à un photon pour qu'il soit absorbé et crée un exciton dans le nanocrystal. Sa position est directement dépendante d' E_g puisqu'on peut calculer sa position grâce à la formule suivante :

$$\lambda_{exciton} = \frac{hc}{E_g} \quad (\text{Eq 6})$$

où $\lambda_{exciton}$ est la longueur d'onde du premier pic excitonique. De ce fait, plus la QD est petite et plus ce pic est décalé vers le bleu puisqu' E_g augmente.

Ensuite, plus on se déplace vers les UV et plus l'absorption du nanocrystal augmente. Elle couvre ainsi une grande partie du visible (suivant la taille de la QD) et l'UV. Les spectres d'absorption de QDs de CdSe de différents diamètres sont proposés sur la *Figure 12*.

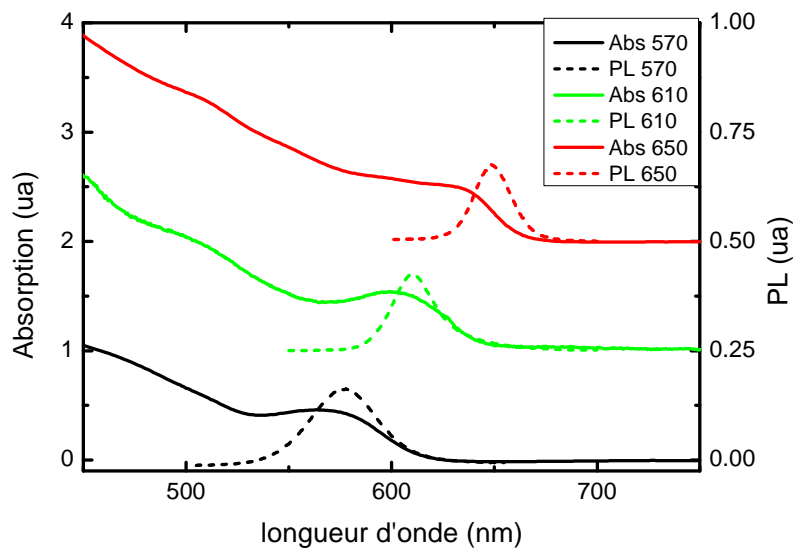


Figure 12 : Absorption et photoluminescence de QDs de CdSe de différents diamètres.

De plus, la forme de ce pic est énormément influencée par la monodispersité de l'échantillon. Plus l'échantillon est monodisperse et plus ce pic sera étroit. Au contraire si l'échantillon est polydispense, son pic excitonique ne sera qu'un petit épaulement.

Sur la Figure 12, on trouve également le spectre d'émission de fluorescence des QDs. Ce spectre est très étroit. Il présente une largeur à mi-hauteur de 20 à 30 nm pour un échantillon de QDs assez monodisperse. C'est d'ailleurs l'un des très gros avantages des QDs par rapport aux fluorophores organiques qui ont souvent des spectres de fluorescence très larges. Dans le cas d'échantillons polydispenses, l'élargissement peut être de 50 à 60 nm.

On voit également sur la Figure 12 que les spectres de PL sont légèrement décalés vers les grandes longueurs d'onde par rapport au premier pic excitonique. Ceci est appelé déplacement de Stokes [107,108]. Il trouve son origine dans la structure électronique du CdSe. En effet, le premier état excité de l'exciton est ($1S_{3/2}S_e$). Cet état est divisé en 5 sous niveaux vibrationnels. Lors de l'absorption d'un photon, l'électron se trouve alors sur l'état le plus haut en énergie (état numéro 5). Il retombe alors sur l'état numéro 3 par une relaxation non radiative, puis retourne à l'état fondamental. Cette dernière relaxation donne naissance à la fluorescence (recombinaison radiative), mais d'autres phénomènes sont en concurrence avec la fluorescence. Le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés est le rendement quantique (QY « quantum yield »). Il permet de rendre compte du rapport entre recombinaison radiative et recombinaison non radiative.

C'est le petit décalage entre les états 5 et 3 qui est responsable du déplacement de Stokes. Cependant, ce déplacement ne pose aucun problème dans le cas des QDs, puisque leur

bande d'absorption est très large dans les UV. On peut donc les exciter très loin de leur fluorescence, ne créant ainsi aucune interférence entre excitation et PL.

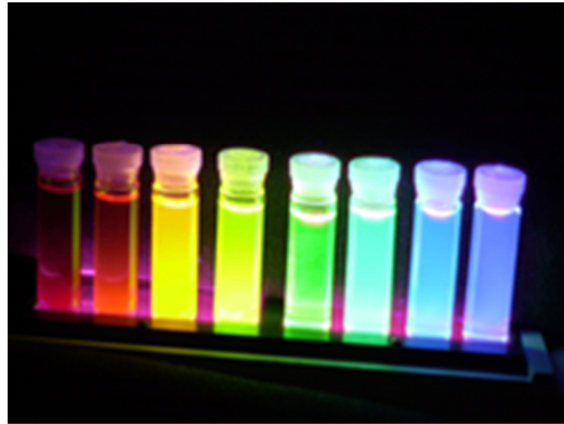


Figure 13 : QDs de CdSe/ZnS dans le chloroforme dont le cœur varie entre 2 et 6 nm (de droite à gauche).

La Figure 13 permet de rendre compte du rôle du diamètre des QDs sur leur longueur d'onde de PL. On voit ici des QDs de CdSe ayant des diamètres allant de 2 (bleues) à 6 (rouges) nanomètres. Leur PL couvre ainsi la majeure partie du spectre du visible. Cette image est très représentative de l'accordabilité des QDs et de la relation entre E_g et diamètre des particules, puisque E_g est inversement proportionnel à la longueur d'onde d'émission des QDs.

5. Structure cœur/coquille

Il existe à la surface des QDs des défauts. Ce sont des liaisons pendantes réactives ou des sites vacants dans le cristal. Ces défauts limitent les performances optiques des QDs et limitent fortement le QY des particules. En effet, ces défauts représentent souvent des sites privilégiés de recombinaison non radiative, en permettant des états dans la bande interdite par exemple. Dans ce cas, la fluorescence associée à ce phénomène est plus haute en longueur d'onde que celle attendue puisque l'électron se désexcite à partir d'un état plus faible en énergie [109,110,111,112]. Les recombinaisons non radiatives deviennent plus probables que les combinaisons radiatives. Il s'ensuit donc que le QY diminue.

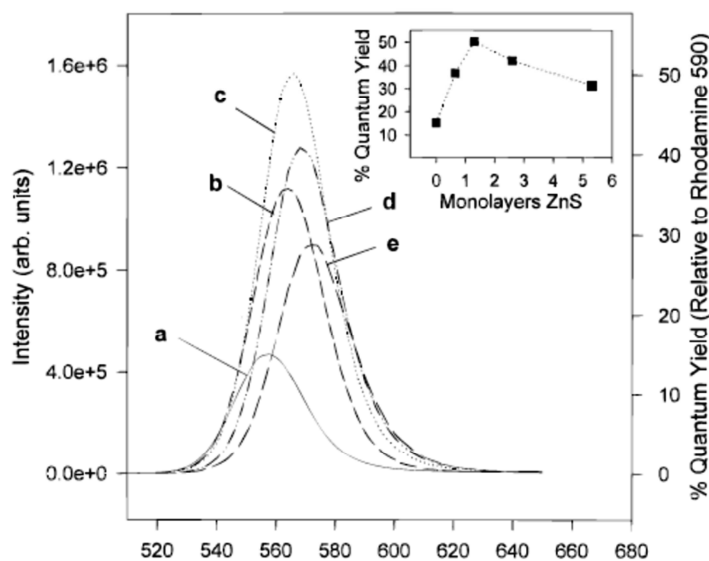


Figure 14 : Fluorescence et rendement quantique de cœurs de CdSe recouverts progressivement par du ZnS. Le maximum de fluorescence est atteint pour 1,2 monocouche de ZnS. Le graphique est tiré de [93]

Pour combler ces défauts, on recouvre la QD d'un second semi-conducteur, souvent de plus grand gap. Dans notre cas, nos cœurs de CdSe ont été recouverts de ZnS. La Figure 14 montre la PL de cœurs de CdSe recouverts progressivement par du ZnS. La PL des QDs est alors progressivement augmentée, puis elle atteint son maximum vers 1,2 monocouche. Si on continue à ajouter du ZnS, alors le QY diminue progressivement. De plus, ce phénomène est couplé à un décalage dans le rouge de quelques nanomètres. Ceci est dû à la possibilité d'extension de la fonction d'onde de l'exciton à l'intérieur de la coquille et donc à une légère baisse du confinement quantique [93].

Il existe trois types de QDs cœur/coquille, en fonction de l'alignement des bandes d'énergies du cœur et de la coquille [113].

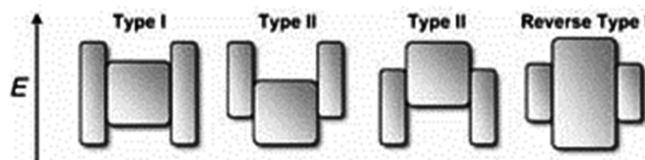


Figure 15 : Alignement des bandes dans des structures cœur/coquille de type I, II et I inversé [113].

Dans le type I, le cœur est recouvert par une coquille faite d'un semi-conducteur de plus grande bande interdite. C'est le cas du CdSe/ZnS qui a été utilisé dans ce travail. Dans ce système, la bande de valence de la coquille est plus basse en énergie que celle du cœur, alors

que sa bande de conduction est plus haute. L'exciton est donc confiné à l'intérieur du cœur. Cependant, une probabilité d'extension de la fonction d'onde de l'exciton dans la coquille existe et donc le confinement est moins important ; la largeur de la bande interdite diminue, la longueur d'onde de fluorescence augmente. Ce phénomène est plus prononcé sur les petits nanocristaux où la fuite de l'exciton a un effet plus important sur le confinement.

Le type I inversé est le système symétrique au type I. Dans cette structure, le cœur a une bande interdite plus large que la coquille. Ses BC et BV sont respectivement plus basse et plus haute en énergie que celles de la coquille. C'est le cas du CdS/CdSe par exemple [114]. Les porteurs de charge se retrouvent donc partiellement délocalisés dans la coquille, un déplacement vers le rouge de la fluorescence est observé et il est modulable grâce à l'épaisseur de la coquille. Cependant, les propriétés photophysiques de ces systèmes sont souvent mauvaises et une troisième partie est ajoutée. On recouvre souvent le système avec un semi-conducteur grand gap, comme dans un type I classique. On trouve par exemple le CdS/CdSe/ZnS [114].

Le type II présente en réalité deux structures symétriques. Dans la première, les BV et BC du cœur sont plus basses que celles de la coquille. Dans la seconde structure c'est l'inverse. Les QDs de type II les plus rencontrés sont celles de CdTe/CdSe ou ZnTe/CdTe. Ces structures sont très étudiées en ce moment car leur émission de fluorescence peut être déplacée jusqu'au proche infrarouge. De plus, la durée de vie de l'exciton est beaucoup plus grande dans ces structures que dans celles de type I, l'électron et le trou pouvant être localisés tous deux dans la coquille ou dans le cœur [115,116].

Un autre paramètre important pour le bon fonctionnement d'une structure cœur/coquille est le désaccord de maille qui peut exister entre les deux semi-conducteurs. Cette contrainte se calcule simplement grâce aux paramètres de mailles élémentaires (a) pour les deux réseaux cristallins. Par exemple, pour le CdSe/ZnS, le désaccord de maille est de 12%. Il correspond à la différence entre les deux paramètres de maille des cristaux, divisée par le paramètre de maille du cœur. Pour le CdSe $a = 4,31 \text{ \AA}$ et pour ZnS $a = 3,82 \text{ \AA}$. Si le désaccord est trop élevé et c'est le cas dans le CdSe/ZnS, la coquille peut compresser le cœur ou à l'inverse le cœur peut faire craquer la coquille. Tout ceci dépend de l'épaisseur de la coquille. De plus, ce désaccord de maille engendre des défauts dans le cristal et donc réduit le QY des QDs. Par exemple, après addition d'une coquille de plus de 1,2 monocouches de ZnS le QY des QDs de CdSe/ZnS diminue [93].

Dans le cas d'un système de type CdSe/ZnSe, le désaccord n'est que de 7%, la diminution du QY n'apparaît qu'après addition de 4 monocouches de ZnSe à la surface du cœur [117].

6. Scintillation

En 1996, il a été découvert que l'intensité de PL des QDs de CdSe sous illumination continue passait par une série d'états brillants et éteints [118]. Ce phénomène est connu sous le nom de scintillation (Blinking en anglais). Dans les faits, la PL d'une QD est constituée d'une multitude de changements abruptes entre un état brillant (dit « on ») et d'un état éteint (dit « off »). Ceci a aussi été reporté pour des QDs de type CdS, CdS/HgS ou CdTe par exemple.

Pour expliquer ce phénomène, il faut comprendre le mécanisme responsable des états éteints. Efros et Rosen ont proposé que ces temps morts sont dus à une recombinaison de type Auger [119]. En effet, pendant cette période la QD serait chargée, un des porteurs étant transféré à l'environnement. Cependant, rien n'empêche la QD de recréer un second exciton, puisque le nombre d'atomes du cristal est tout de même très grand et donc la probabilité de création d'excitons importante. Dans cet état chargé, il est énergétiquement plus favorable à la QD de recombiner cette paire électron-trou et de transférer l'énergie résultante au porteur présent dans le nanocristal. Il s'ensuit donc une absence d'émission puisque cette recombinaison est non radiative. La QD retrouve sa faculté de recombinaison radiative lorsqu'elle retrouve sa neutralité électrique. Etant donné que la recombinaison Auger a une probabilité plus importante d'apparaître que la recombinaison radiative, de l'ordre de plusieurs ordres de grandeur, c'est un bon moyen de recombinaison non radiative. Ce processus est bien sûr régulé par les interactions coulombiennes entre les porteurs de charge à l'intérieur de la QD, dont les faibles dimensions amplifient le phénomène.

Cependant, pour que la loi définie par Efros et Rosen soit vérifiée, il faut y apporter quelques modifications, comme de multiples pièges [120] ou une différence d'énergie fluctuante entre le piège et l'état excité [121]. C'est pourquoi d'autres modèles sont apparus, tels que le modèle de Frantsuzov *et al.* [122], qui ne fait pas apparaître de pièges avec une longue durée de vie. Cependant, ce modèle n'a été démontré que par une seule étude basée sur des mesures statistiques relativement indirectes.

Une étude plus récente de Rosen *et al.* [123], a montré que ces périodes éteintes n'étaient pas dues à une recombinaison Auger. En effet, si elles sont dues à une recombinaison de type Auger, elles sont indépendantes de l'intensité de la lumière excitatrice,

or elles le sont. Ceci prouve donc que la recombinaison Auger seule ne peut expliquer ce phénomène.

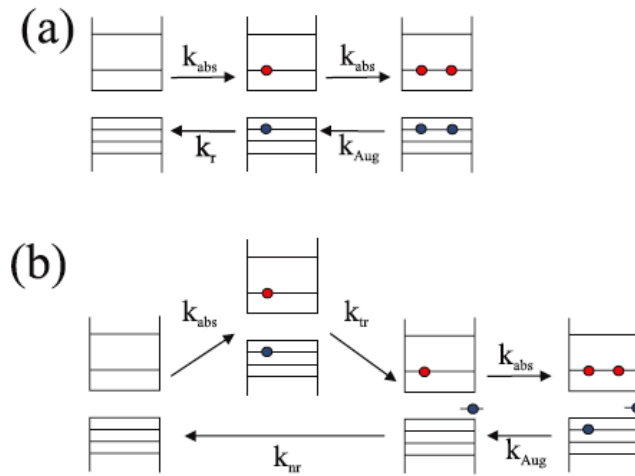


Figure 16 : Schéma décrivant les processus mis en jeu lors des états allumés et éteints dans les QDs [123].

En effet, dans l'état allumé (partie a) de la Figure 16, la constante de création k_{abs} de paires électron-trou est plus importante que la constante de recombinaison radiative k_r . Ceci entraîne la création d'une seconde paire électron-trou. La recombinaison Auger qui s'ensuit éteint donc la QD mais seulement pour quelques centaines de ps. Dans la partie b) de cette même figure, on y voit le mécanisme de l'état éteint des QDs. Dans un premier temps il y a formation d'une paire électron-trou, puis apparition d'un piège (qui peut piéger électron ou trou). Il y a donc possibilité de recombinaison non radiative à partir de cette étape, avec une constante de recombinaison k_{nr} . Si on augmente l'intensité, k_{abs} devient comparable à k_{nr} et l'apparition d'un second exciton est possible. Il y a alors possibilité de recombinaison Auger, non radiative. Cette étude montre donc que la recombinaison Auger seule ne peut expliquer les temps éteints des QDs.

B. Applications

Les QDs ont montré des propriétés optiques innovantes avec notamment une absorption forte dans l'UV et un pic de PL étroit et symétrique. Ces propriétés physico-chimiques uniques leur confèrent la possibilité d'être utilisées dans de nombreux domaines. Elles peuvent être utilisées en biologie, pour faire du marquage par exemple, ou dans de nombreuses applications techniques telles que les panneaux photovoltaïques. Nous étudierons

donc dans cette partie les capacités des QDs en tant que marqueurs, ainsi que les applications techniques qui leur ont été trouvées.

1. Applications en imagerie (marquage)

Plusieurs caractéristiques importantes sont nécessaires à un bon marqueur. Il doit être excitable facilement, avec un rendement quantique assez haut, une fenêtre d'émission étroite, soluble dans les milieux biologiques et les différents tampons, capable de se lier spécifiquement, reproductible en terme de qualité. Dans certains cas, la toxicité, la possibilité de pénétration dans les cellules, ainsi que la possibilité d'analyser plusieurs marqueurs en même temps peuvent être des paramètres non négligeables. Les références en matière de marquage sont bien entendu les fluorophores organiques utilisés depuis plusieurs dizaines d'années.

Les QDs respectent beaucoup de ces contraintes. Comme nous l'avons vu, leur spectre d'absorption très large en fait des marqueurs facilement excitables et plusieurs types de QDs peuvent être excités à la même longueur d'onde. Les possibilités de marquages multiples sont donc très importantes. D'un point de vue optique, leur QY dans l'eau reste souvent faible (<50% en général), mais est compensé par une absorption très forte et une durée de vie très longue (voir *Figure 17*) [124].

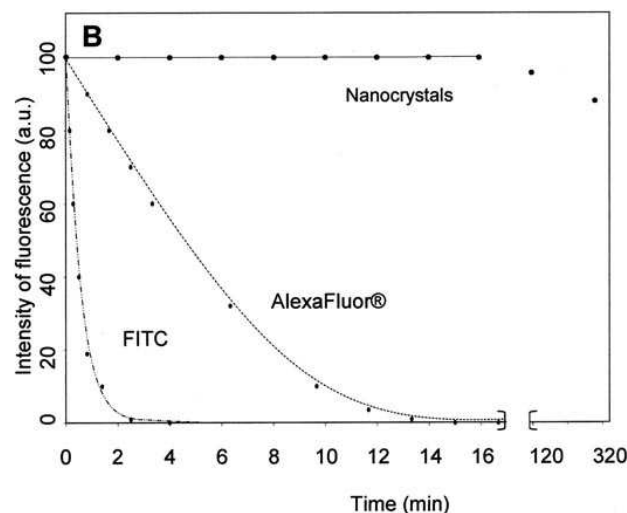


Figure 17 : Temps de vie de différents fluorophores organiques et des QDs sous illumination constante [124].

D'un point de vue optique, les QDs présentent un gros avantage sur les fluorophores organiques, leur accordabilité. Non seulement un type de QDs peut couvrir une grande gamme de longueur d'onde mais en changeant de matériau on peut encore moduler davantage leur PL. On passe ainsi de l'UV au proche infrarouge. De plus, elles ont souvent des QY assez

haut dans toutes ces régions ce qui n'est pas le cas des fluorophores organiques. Une dernière caractéristique des QDs, qui en fait de bons marqueurs, est qu'elles ont une grande section efficace d'absorption à deux photons, contrairement aux fluorophores organiques.

Leur chimie de surface permet également de modifier leur enveloppe et donc de les rendre solubles dans une très large gamme de pH. De plus, suivant la méthode de solubilisation, elles peuvent rester solubles plusieurs mois, voire plusieurs années [125]. Il existe plusieurs méthodes de solubilisation des QDs dans l'eau ; la première est le remplacement des ligands organiques post synthétiques par des ligands polaires tels que l'acide mercaptopropionique ou la cystéine. Une seconde possibilité est d'intercaler de nouveaux surfactants avec ceux présents à la surface de la QD après synthèse. Cependant, avec cette méthode, les surfactants se désorbent plus facilement qu'avec la première méthode. Une dernière méthode peut être de solubiliser les QDs grâce à des interactions stériques à l'aide de polyéthylène glycols (PEGs) par exemple.

On peut également leur attacher des biomolécules comme la biotine ou la streptavidine par exemple. D'autre part, on peut également leur attacher des anticorps ou des enzymes pour différents marquages. Il n'y a pas de méthode générale pour coupler les QDs avec des biomolécules, mais généralement elles sont d'abord dispersées dans l'eau puis les biomolécules sont liées à la QD. Cependant, il est difficile de contrôler l'orientation de ces molécules et quelques fois les QDs sont trop larges et ne peuvent interagir avec le milieu cellulaire à cause des interactions stériques.

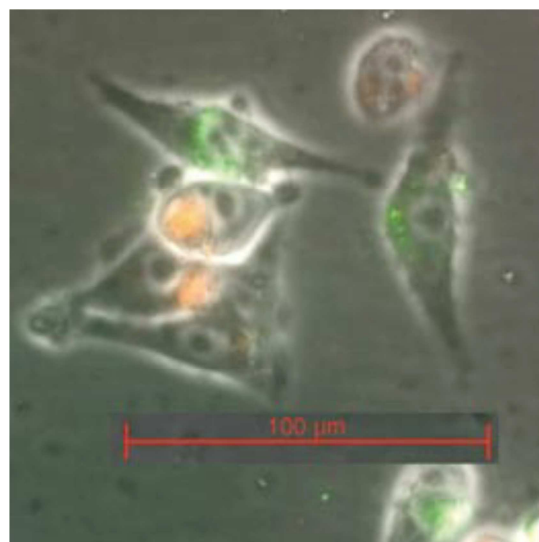


Figure 18 : Cellules de types MDA-MB-435s et MCF-7 respectivement incubées avec des QDs CdSe/ZnS vertes et rouges. Après incubation dans des boîtes de pétri différentes, elles ont été mélangées sur le même substrat. Chaque lignée cellulaire peut alors être suivie grâce à sa

fluorescence. L'image présentée ici est une image de contraste de phase superposée à l'image de fluorescence [126].

Ces fonctionnalisations avec des biomolécules permettent notamment de marquer les cellules. Le marquage extracellulaire est assez fréquemment rencontré. D'un autre côté le marquage intracellulaire est beaucoup plus difficile mais a été réalisé par micro-injection, électroporation, par exemple. Il est aussi possible de les faire pénétrer à l'aide de vésicules chargées en QDs et phagocytées par les cellules.

Le problème le plus important du marquage cellulaire par les QDs est leur cytotoxicité. Tout élément peut être cytotoxique, mais cette propriété n'est pas la plus importante dans le cas de marquage in vitro. Dans le cas de marquage in vivo, cela pose un problème. La toxicité des fluorophores organiques est bien connue et, à l'exception des intercalants de l'ADN, il n'y a pas de problèmes majeurs. Cependant, les QDs sont souvent à base de métaux lourds, tel que le cadmium. Il est important de savoir où et comment est éliminé ce métal, comment il résiste à l'oxydation et quelle est la stabilité des coquilles organiques des QDs. Cependant, on trouve plusieurs études où les QDs sont cytotoxiques et d'autres où elles ne le sont pas. Ceci est souvent dû au Cd^{2+} , aux surfactants des QDs ou à leur agrégation.

Les QDs ont donc un bel avenir dans le marquage biologique en général mais leur toxicité risque à terme de les condamner à n'être utilisées que dans des études in vitro. La présence de métaux lourds et la zone d'ombre existante sur leur élimination par les organismes vivants étant aujourd'hui les deux gros inconvénients des QDs. Pourtant, elles montrent, dans les études in vitro, des qualités de marquage évidentes et une évolution des techniques d'encapsulation pourraient leur permettre d'être un jour utilisées dans l'imagerie in vivo.

2. Applications techniques

Les QDs sont aujourd'hui utilisées dans bon nombre d'applications techniques. Leur fluorescence étroite et leur absorption large en faisant de bonnes sondes pour des analyses variées sur des puces de détection. Suivant les systèmes et grâce à la possibilité d'excitation de plusieurs types de QDs par un rayon unique, il est possible de tester plusieurs anticorps, virus ou autre ADN sur la même puce (voir *Figure 19*) ou grâce à des microbilles marquées avec différentes couleurs de QDs [127]. Les QDs peuvent également être insérées dans des puces pour atteindre des limites de détection très basses et ainsi pouvoir utiliser directement

du sang (humain par exemple), et tester directement si le patient est atteint à l'aide d'un test simple, rapide et fiable [128].

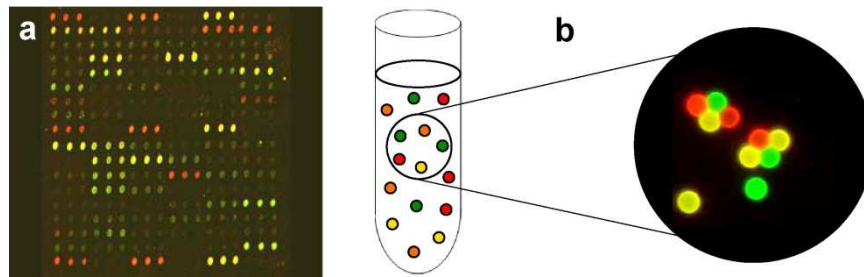


Figure 19 : Exemple de puce de détection avec plusieurs couleurs de QDs codant pour plusieurs anticorps différents (a). La partie (b) représente des microbilles en solution marquées avec des QDs de différentes couleurs. Leur attachement à la surface d'une cellule peut être suivi par cytométrie en flux. On peut donc tester plusieurs types de récepteurs à la surface de la même cellule [127].

Une autre façon d'utiliser les QDs pour le marquage et l'analyse en biologie est de générer la chimiluminescence des QDs. En effet, en 2002, l'électro-chimiluminescence de QDs a été montré [129]. Ce procédé utilise la réduction et l'oxydation locale des QDs. Un courant pulsé traverse une solution de QDs, ce qui les oxyde en partie et en réduit une autre simultanément. Les deux espèces créées réagissent alors entre elles donnant une QD dans son état de base et une QD excitée qui se désexcite en émettant un photon [130]. Ce procédé est très utile à l'analyse d'ADN, au dosage des anticorps ainsi qu'à la détection de nombreuses molécules biologiques. Cependant, ce système n'utilise pas les QDs comme source de lumière à proprement parler mais ne sert qu'en tant qu'indicateur ; les variations de leur luminescence permettent d'en déduire des concentrations en différentes molécules cibles dans la solution d'analyse. De plus, ce système présente l'avantage de ne pas nécessiter de source lumineuse pour générer la luminescence des QDs. Ceci réduit les risques d'excitation de fluorophores parasites et autres diffusions ou interactions d'ondes lumineuses. La sélectivité de cette technique pour l'analyse est en plus très importante car une simple variation du potentiel appliqué aux électrodes permet d'exciter ou non certaines espèces. Enfin cette technique est quasiment parfaitement réversible, la plupart des fluorophores utilisés pour l'émission sont régénérés à la fin du processus.

Les QDs sont aussi énormément utilisées dans le domaine de la détection lumineuse spécifique comme par exemple les capteurs à infrarouge [131]. Cependant, les QDs sont principalement utilisées pour les cellules photovoltaïques [132]. Le confinement des porteurs de charge dans un si petit espace étant un gros avantage pour les cellules photovoltaïques. Les

cellules utilisant des QDs sont même dites de troisième génération puisque les QDs permettraient d'atteindre des rendements bien plus élevés qu'avec des cellules à base de matériaux massifs.

Le principal problème des cellules photovoltaïques est souvent qu'elles ne captent qu'une gamme de longueur d'onde restreinte. Les photons en dessous du seuil de la cellule ne sont pas absorbés et ceux trop haut en énergie le sont en surface ; leur énergie est donc difficilement collectable par la cellule. Les QDs peuvent régler ce problème en absorbant les photons de hautes énergies et en les transformant en photons accessibles pour la cellule [133]. Ce système est appelé « down-shifting » en anglais et permet de collecter bien plus de photons qu'avec une cellule conventionnelle. Ceci peut également être utilisé pour des détecteur UV-IR [134], trouvant leur application dans la lutte contre les incendies notamment.

Les QDs peuvent également servir dans le cadre de source lumineuse à un seul photon. En effet, les sources lumineuses capable d'émettre un seul photon avec un taux de répétition élevé, une durée de vie importante et peu de pulses vides sont la clé de la cryptographie à petite échelle. Les QDs ayant montré leur capacité à s'intégrer à la technologie du silicium, on peut les envisager comme des sources potentielles de photon unique. De plus, le pompage électrique dans le but d'émission lumineuse dans les QDs a été démontré [135]. Dans ce cas, le plus compliqué est de maintenir la charge globale de la particule à la neutralité, puisqu'une recombinaison de type Auger inhibe la PL. Par injection d'un seul électron dans la QDs, on peut alors obtenir une source à un photon avec un haut rendement et une vitesse de travail importante [136].

IV. Principe de fonctionnement du matériau hybride

Cette thèse s'inscrit dans un projet de développement d'un nouveau matériau hybride couplant bR et QDs CdSe/ZnS. Ce matériau devrait avoir des propriétés optiques, optoélectroniques et photoélectriques innovantes. Il s'appuie sur l'effet FRET qui permet de transférer de l'énergie par voie non radiative d'un donneur à un accepteur.

A. Formulation générale du FRET

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif, apparaissant entre un donneur (D) et un accepteur (A) si la distance qui les sépare est faible et sous certaines conditions optiques. Ce transfert d'énergie est dû à une interaction dipôle-dipôle de longue portée. Le terme de transfert d'énergie par résonance est préféré pour rappeler qu'il n'y a pas d'émission de photons. La condition optique nécessaire à ce transfert est un recouvrement du spectre d'absorption de l'accepteur par celui de fluorescence du donneur. Dans notre étude le donneur est la QD et l'accepteur est la bR.

Pour étudier et comprendre le FRET, il faut tout d'abord définir les paramètres du système qu'on va étudier. Considérons donc un système simple dans lequel on trouvera un seul accepteur et un seul donneur, séparés par une distance r . Le taux de transfert d'énergie k_T dû au FRET est donc décrit comme suit [137] :

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (\text{Eq 7})$$

dans laquelle τ_D est le temps de vie de la fluorescence du donneur en absence d'accepteur, R_0 est le rayon de Förster pour lequel k_T est de 50% et r la distance séparant le donneur et l'accepteur.

Le FRET a donc une dépendance en $1/r^6$ ce qui explique pourquoi ce phénomène n'agit qu'à courte distance. Il s'exprime généralement si la distance r est comprise entre 1 et 10 nanomètres.

Le FRET est compréhensible par des considérations classiques, mais nécessite la mécanique quantique pour sa résolution. Nous ne présenterons ici que l'équation finale, mais plus de détails peuvent être trouvés dans [138] :

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{Eq 8})$$

Dans cette expression Q_D est le rendement quantique (QY) du donneur en absence de l'accepteur, κ^2 est le facteur d'orientation des dipôles l'un par rapport à l'autre, N le nombre d'Avogadro, n est l'indice de réfraction du milieu, $F_D(\lambda)$ est l'intensité de la fluorescence du donneur normalisée à 1, ε_A est le coefficient d'extinction molaire du donneur à la longueur d'onde λ .

La partie intégrale de cette équation est appelée intégrale de recouvrement et correspond au recouvrement entre la fluorescence du donneur et l'absorption de l'accepteur. Elle est généralement notée J et peut prendre différentes formes :

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (\text{Eq 9})$$

$F_D(\lambda)$ est sans dimension. Si ε_A est exprimé en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et λ en nanomètres, alors J est en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$. Si λ est en centimètres alors J est en M^{-1}cm^3 . De plus pour calculer J , on peut soit utiliser la fluorescence normalisée avec son aire égale à 1 (Eq 9 au milieu) ou alors simplement normalisée la valeur de J comme dans l'équation de droite.

Pour plus de simplicité, mieux vaut définir la valeur de R_0 et ainsi travailler avec des distances plutôt que de travailler avec des taux de transfert. R_0 devient alors :

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5 N n^4} J(\lambda) \quad (\text{Eq 10})$$

Le rayon de Förster peut donc être calculé simplement si on connaît les propriétés optiques du donneur et de l'accepteur. Si λ est en nm alors $F_D(\lambda)$ est en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$, on a R_0 en Å par :

$$R_0 = 0,211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \quad (\text{Eq 11})$$

On peut simplement calculer le rayon de Förster et déduire le taux de transfert d'énergie si on connaît r ou alors déduire r si on connaît le taux de transfert, grâce à l'Eq 16. On définit également l'efficacité du transfert E , elle correspond au nombre de photons absorbés par le donneur et transférés à l'accepteur. Elle est donnée par l'équation suivante :

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (\text{Eq 12})$$

C'est cette efficacité qui est mesurée lors des mesures de PL décrite dans la deuxième partie de ce travail. Elle peut être reliée à plusieurs paramètres, comme la distance D-A, la diminution de la PL du donneur ou la modification du temps de vie du donneur en présence de l'accepteur. Elle peut prendre les formes suivantes :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{Eq 13})$$

Dans ce cas, F_{DA} et τ_{DA} sont respectivement l'intensité et le temps de vie de la fluorescence du donneur en présence de l'accepteur. On peut directement remonter à la distance, via l'efficacité, si R_0 est connu ou à l'efficacité si l'intensité de PL du donneur est mesurée en présence et en absence de l'accepteur. Dans le cas de la mesure du temps de vie, cela s'avère quelque peu plus compliqué et controversé. Nous y reviendrons donc plus tard dans la troisième partie.

Le rapport entre R_0 et E met bien en valeur la dépendance de E en r^6 . On peut ainsi noter qu'à $r=R_0$ l'efficacité du transfert est de 50% (définition de R_0). Cependant, cette dépendance est très importante car à $r=0,5*R_0$ l'efficacité est de 98,5% alors qu'elle n'est que de 1,5% pour $r=2 R_0$. (Voir Figure 20).

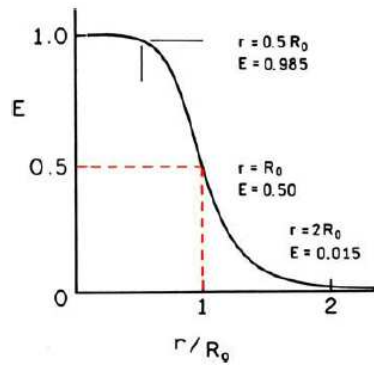


Figure 20 : Dépendance de l'efficacité du FRET en fonction du rapport r/R_0 [137].

Intéressons-nous aux différents paramètres présents dans ces équations. On trouve tout d'abord le rayon de Förster, lui-même dépendant de plusieurs paramètres optiques du système. On a en premier lieu le rendement quantique du donneur, assez simple de mesure (voir page 63). Il y a également l'indice du milieu, souvent proche de celui de l'eau ($n= 1,33$) et également mesurable de façon simple. On peut d'autre part le trouver dans la bibliographie pour les molécules biologiques courantes. On trouve ensuite κ^2 . Ce paramètre rend compte de l'orientation des dipôles les uns par rapport aux autres. Il est souvent donné à $2/3$ car cette valeur correspond à une orientation aléatoire des dipôles. On trouve dans [139] un récapitulatif des valeurs prises par cet indice dans tous les cas de figure. C'est-à-dire qu'il prend en compte des moments dipolaires statistiquement linéaires, planaires ou isotropiques. La plupart de ces paramètres n'influe que très peu sur la valeur de R_0 et donc sur la valeur du transfert d'énergie. Par exemple, si le QY est doublé, la valeur de R_0 n'est pas modifiée de plus de 12%, ce qui reste acceptable.

Le paramètre le plus important de R_0 se trouve être l'intégrale de recouvrement J abusivement notée $J(\lambda)$. Cette intégrale rend compte du recouvrement des spectres d'absorption du donneur et d'émission de l'accepteur. Plus ce recouvrement est grand, plus J est élevée et plus R_0 est important. A la vue de la dépendance de E par rapport à R_0/r , J s'avère être un paramètre extrêmement important. De même, plus le coefficient d'extinction molaire du donneur est grand, plus J est élevée. La valeur de J doit être calculée pour chaque couple de donneur et d'accepteur.

B. Schéma de fonctionnement du composant

Le commutateur optique que nous voulons développer en couplant bR et QDs est basé sur le schéma suivant (Figure 21). Dans ce schéma, on discerne parfaitement le réseau cristallin de la bR à l'intérieur des PMs avec un paramètre de maille de 6,2 nm. On distingue également une bR au premier plan entourée par une bicouche lipidique. Au milieu de cette bR, on trouve dans la partie A, un rétinal en rouge, situé à environ 2,5 nm de la surface de la PM. L'idée de ce commutateur est donc d'immobiliser une QD sur chaque trimère de bR.

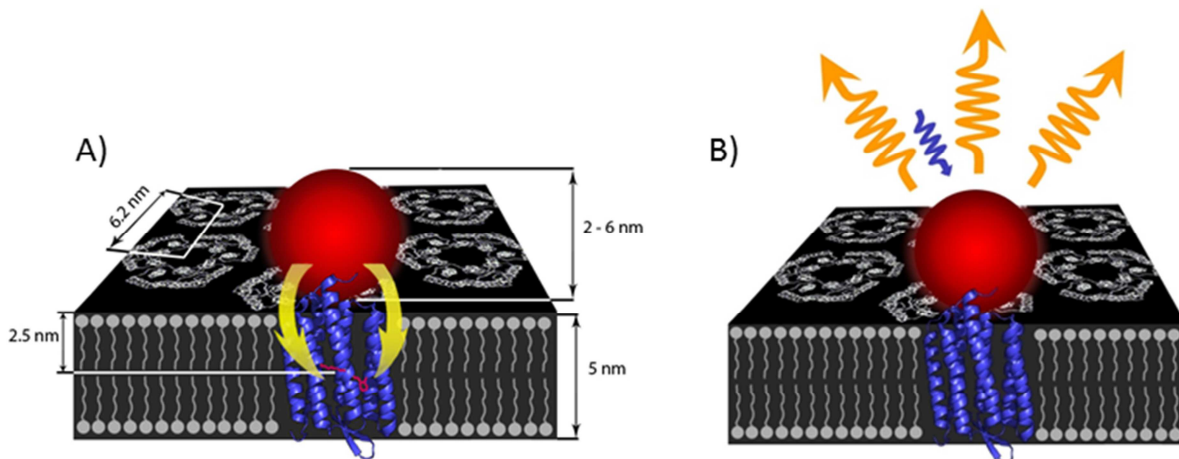


Figure 21 : Schéma du commutateur optique. Une QD est immobilisée à la surface d'une membrane pourpre. On distingue le réseau cristallin de la bR et en rouge le rétinal (au milieu de la bR en violet). Dans la partie A, l'énergie de la QD est transférée par effet FRET jusqu'à la bR, la QD ne fluoresce plus. Dans la partie B, le rétinal est absent ou dans un état ne permettant pas le transfert d'énergie. La QD fluoresce. On peut considérer ces deux états comme deux bits d'information différents, l'un étant un 1 l'autre un 0.

Le fonctionnement de ce commutateur repose sur la capacité de la QD à transférer son énergie à la bR. Le mécanisme de ce transfert est basé sur l'effet FRET. Cet effet physique repose sur quelques paramètres primordiaux comme nous venons de le voir. Le

principal d'entre eux est la distance entre donneur et accepteur. Si les QDs sont bien immobilisées à la surface des PMs alors la distance est suffisamment faible pour que l'énergie soit transférée. L'autre paramètre important est le recouvrement des spectres d'absorption de l'accepteur (bR) et d'émission du donneur (QD). Les QDs étant accordables en longueur d'onde on peut maximiser ce recouvrement (voir *Figure 22*).

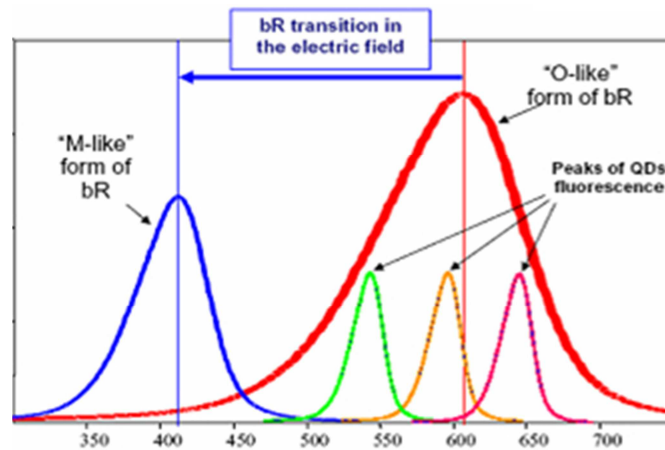


Figure 22 : Spectres d'absorption de la bR dans son état M (courbe bleue) et dans son état O (courbe rouge), ainsi que les spectres de PL de QDs émettant à différentes longueurs d'onde. Il y a recouvrement entre le spectre d'absorption de la bR sous la forme O et non sous la forme M. Grâce au FRET, il peut y avoir transfert d'énergie dans un cas, mais pas dans l'autre.

La *Figure 22* nous montre deux des formes du photocycle de la bR. L'état M absorbe à 410 nm, alors que le maximum d'absorption de la forme O est à 640 nm. On y voit également la PL de QDs émettant entre 540 nm et 650 nm. Leurs PL sont parfaitement dans la bande d'absorption de la forme O, mais parfaitement en dehors de celle de la forme M. On peut supposer que le FRET va intervenir dans un cas et pas dans l'autre. Dans ce cas, si on contrôle l'état d'absorption de la protéine, on peut contrôler la PL des QDs. Il est alors possible de générer des 1 ou des 0 correspondant à une émission de lumière ou non par la QD.

Certains mutants de la bR réagissent à des excitations extérieures, comme les champs électriques ou magnétiques. On peut alors modifier sa bande d'absorption de façon contrôlée et créer un commutateur (voir *Figure 23*). Ce commutateur optoélectronique fonctionnerait avec deux électrodes entourant notre matériau hybride à base de QDs et bR. Ces électrodes permettraient de créer un champ électrique et de contrôler le FRET via les changements d'absorption de la bR.

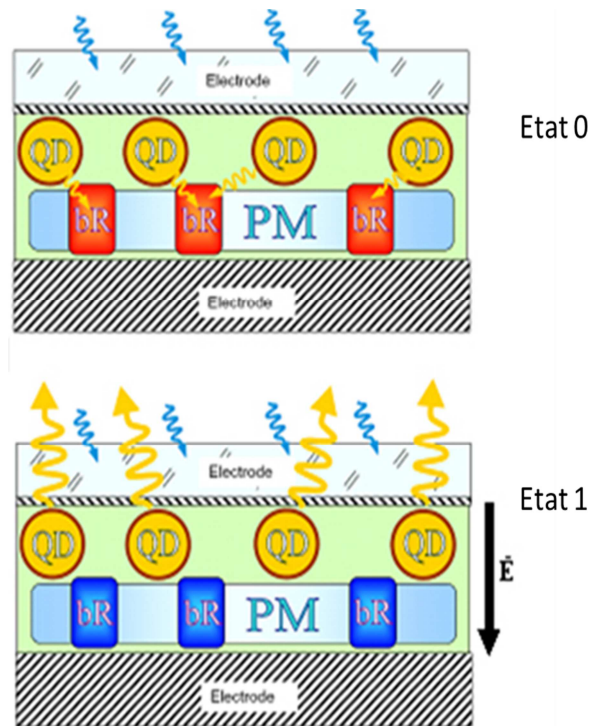


Figure 23 : Schéma d'un commutateur optoélectronique à base de QDs et bR.

Le composant utiliserait également les propriétés structurelles naturelles de la bR et notamment son organisation bidimensionnelle. Avec cette technologie, on pourrait stocker environ 50 To d'information sur une surface équivalente à celle d'un CD. Pour ce faire, il faut arriver à déposer de façon simple, une QD par trimère de bR, le système le plus simple envisagé étant de les laisser sédimenter à la surface des PMs et ainsi de fabriquer ce complexe à moindre coût.

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

I. Matériels

A. Les membranes

1. Les Membranes Pourpres

La bR utilisée lors de cette étude a été fournie par le Pr. Varo, du « biological research center » de Szeged en Hongrie. L'extraction des membranes a été réalisée dans son laboratoire [140] et des tubes nous ont été envoyés contenant des solutions de PMs à des concentrations très élevées, de l'ordre de 40 densités optiques, soit environ 600 μM . Ces membranes, diluées dans l'eau, sont d'une grande qualité. Les morceaux de membranes font parfois plusieurs microns de diamètre et sont toujours parfaitement lisses et réguliers. Bien qu'il existe un grand nombre de mutant de cette protéine, nous avons toujours utilisé de la bR sauvage, dite « Wild-type » en anglais. Ceci ne sera d'ailleurs jamais plus précisé dans cette étude, puisque toutes les expériences ont été menées avec de la bR provenant de la même source et du type sauvage.

2. Les Membranes Blanches

Les membranes blanches (WM) sont des PMs auxquelles on a extrait le rétinale, responsable de l'absorption à 570 nm. Ces membranes ne sont donc plus pourpres mais transparentes car elles n'absorbent plus du tout de lumière dans le visible. Cela en fait un élément de contrôle parfait, puisqu'elles ont la même composition chimique et la même structure que les PMs, mais plus du tout d'absorption dans le visible. Elles sont assez simples à préparer. La méthode qui suit est en grande partie tirée de la référence [141].

Dans un premier temps, il faut briser la liaison existante entre le rétinale et la bR. On utilise pour cela de l'hydroxylamine. Une solution de bR à une concentration de $2 \cdot 10^{-5}$ M, avec 0,3 M d'hydroxylamine est utilisée. Ensuite cette solution est illuminée pendant plusieurs heures, en agitant de temps à autre, jusqu'à disparition complète de la couleur pourpre de la solution. Ce changement de couleur indique que tous les rétinals ont été arrachés des protéines. On ajoute ensuite une solution de BSA (Bovin Serum Albumin) à 2%, permettant de fixer tout l'hydroxylamine en excès et tous les rétinals extraits des bRs. On centrifuge la solution, laissant ainsi l'hydroxylamine et les rétinals en solution, puisqu'ils sont liés à la BSA qui est parfaitement soluble dans l'eau. Le culot, après centrifugation, est récupéré et l'opération est répétée deux fois. Une partie de l'échantillon est perdue dans le

processus mais environ 80% des PMs sont conservées. Finalement, les WMs sont dispersées dans le tampon souhaité. Un enregistrement du spectre d'absorption de l'échantillon permet de montrer que l'absorption dans le visible a bien disparu.

B. Les Quantum dots

1. Synthèse

La synthèse des QDs n'a pas été réalisée au laboratoire. Elles ont été fournies par le Pr Mikhail Artemyev, de l' « Institute for Physico-Chemical Problems » de l'université de Minsk en Biélorussie. Les QDs sont synthétisées par voie organométallique. Le protocole utilisé n'a jamais été publié mais se rapproche des références suivantes [142,143,144,145,93]

Les QDs sont livrées sous forme de poudre. Dans cette poudre on trouve environ 80 à 90% en masse de TOPO et seulement 10 à 20% de QDs. Ce taux peut paraître faible, mais le TOPO en excès permet de les conserver assez longtemps sous cette forme sans qu'elles ne se détériorent. L'oxydation est très lente et les QDs peuvent être conservées plusieurs années.

Cependant, sous cette forme elles ne sont pas solubles dans l'eau et une fonctionnalisation de surface est nécessaire. Tout le protocole de fonctionnalisation des QDs a été développé et effectué au laboratoire ce qui constitue une partie importante de la thèse. Pour cela, on réalise un échange de ligands entre le TOPO et les ligands désirés à la surface des QDs. Dans les paragraphes suivants, les protocoles de solubilisation avec de la cystéine, Cystéamine ou du 2-(Diméthylamino)ethanethiol sont détaillés, ainsi que différents PEGs trifonctionnels. Il existe d'autres méthodes de solubilisation, comme la couverture par du PMA [125], mais ce type de ligands de surface est trop encombrant, il n'a pas été utilisé.

2. Fonctionnalisation à la cystéine, cystéamine

Pour solubiliser les QDs grâce à ces deux molécules le protocole est similaire. La seule différence entre ces deux molécules résulte dans la charge finale des particules et donc dans le pH auquel elles seront solubles. En effet, la cystéine va conférer une charge négative aux QDs par déprotonation de la terminaison du groupe carboxyle. Elles seront solubles à pH basique, alors que le cystéamine donne des particules positives, qui sont stables à des pH compris entre 4 et 6. Ceci vient du fait qu'il faut protoner le groupe amine de la terminaison du cystéamine. On ne peut descendre en dessous de pH 4 car le pont sulfure créé entre la coquille et le groupe thiol de la cystéamine se détériore à un tel pH. De même, au-dessus de 10, les QDs cystéine ne sont plus très solubles.

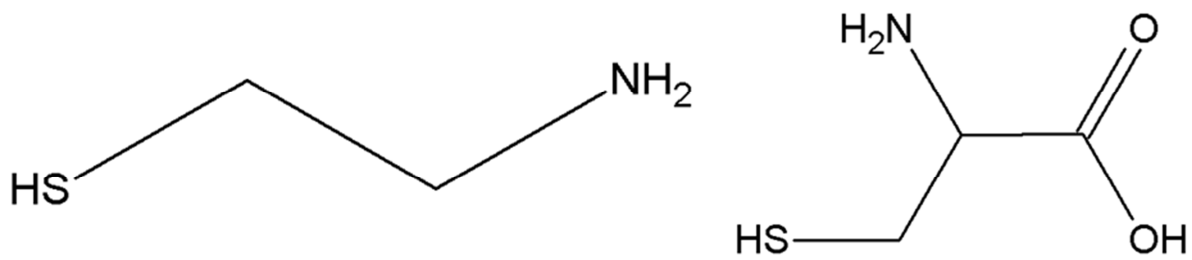


Figure 24 : Représentation du cystéamine (à gauche) et de la cystéine (à droite).

Dans les deux cas, le protocole est similaire et c'est le groupe thiol qui par échange de ligands avec le TOPO vient former un pont sulfure avec le ZnS de la coquille. Cette liaison n'est pas tout à fait covalente et peut être détruite à pH très bas (inférieur à 4). Pour pouvoir fonctionnaliser les QDs, il faut d'abord les extraire de l'énorme surplus de TOPO et il faut donc les dissoudre dans du chloroforme. En effet, après synthèse, elles sont solubles dans des solvants organiques tels que le chloroforme ou le toluène, mais sont parfaitement insolubles dans le méthanol par exemple.

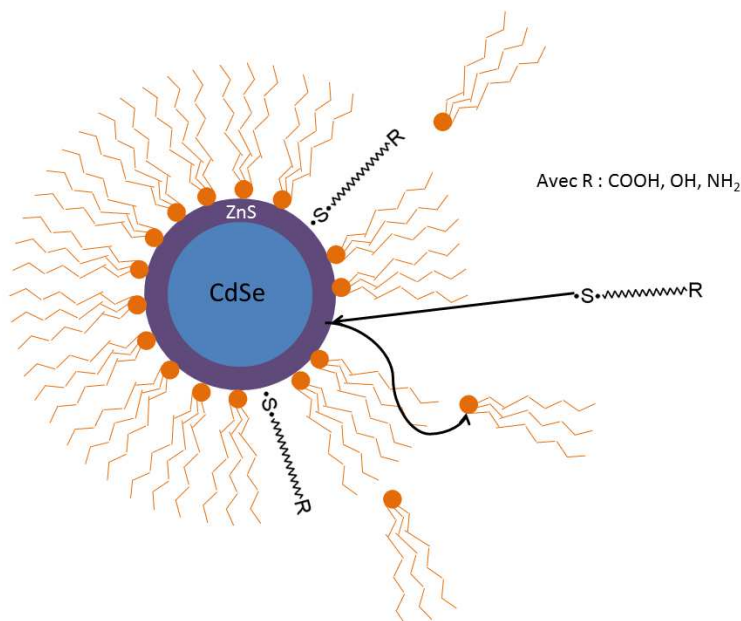


Figure 25 : Echange de ligands à la surface d'une QDs

Les propriétés de solubilité des QDs sont utilisées dans le but de les nettoyer du TOPO présent en excès, en dissolvant la poudre de QDs dans du chloroforme, puis en ajoutant le même volume de méthanol. Un précipité de QDs se forme à l'intérieur du tube, la solution perd sa couleur vive au profit d'une couleur plus terne. L'échantillon est alors centrifugé et le culot récupéré. Cette étape est répétée deux fois de plus. Une fois le lavage terminé, l'échange de ligand proprement dit peut commencer. Le culot récupéré est dissous

dans un grand volume de chloroforme et on ajoute goutte à goutte, une solution de méthanol contenant le nouveau ligand (cystéine ou cystéamine à 2 mg/ml). Le volume de méthanol ajouté ne doit pas dépasser les 10% du volume de chloroforme, car la précipitation des QDs doit être due à l'échange de ligand et non à la présence de méthanol. Une fois les ligands ajoutés, une agitation du tube de quelques secondes est nécessaire et il doit normalement se former un précipité. La formation de ce précipité ne doit pas être instantanée. Un précipité instantané est souvent signe d'une agrégation due au méthanol. L'échange de ligands dure pendant une vingtaine de minutes, sous agitation permanente. Les QDs deviennent de moins en moins solubles dans le chloroforme. A la fin de ce temps d'attente, l'échantillon est centrifugé, les QDs fonctionnalisées ne sont plus solubles du tout dans le chloroforme. L'échantillon est rincé trois fois dans du méthanol, pour retirer le TOPO restant dans la solution et les ligands non fixés. Les QDs ne sont pas solubles du tout dans ce solvant, mais les restes organiques le sont. Il faut donc bien disperser le culot dans le tube pour extraire un maximum de restes organiques. Après ces trois lavages, les QDs sont dispersées dans un tampon adéquat. Pour les cystéinées, le pH doit être basique entre 7,5 et 10 et pour les cystéaminées, il doit être entre 4 et 6. Elles sont toutefois souvent solubles dans l'eau milliQ, leur présence ajustant automatiquement le pH de la solution. Cependant, ceci ne fonctionne que pour des solutions assez concentrées de l'ordre de quelques μM . En dessous d'un certain seuil de concentration, c'est-à-dire pour des solutions assez diluées (10^{-7} à 10^{-8} M), les QDs forment des petits agrégats de quelques particules.

Une fois les QDs dispersées dans leur solvant aqueux, une dernière étape de purification est nécessaire. Tout d'abord elles sont centrifugées pour retirer les gros agrégats, puis il est possible, suivant les besoins de pureté, de les passer sur colonne Sephadex ou dans des tubes de séparation en fonction de la masse molaire.

Ce protocole permet une fonctionnalisation à base de cystéine ou de cystéamine, mais il est possible d'ajouter du thioglycérol. Il va permettre de stabiliser quelque peu les QDs grâce aux groupes hydroxyles qu'il apporte, surtout dans le cas des QDs chargées positivement. La non-dissociation de ce groupe permet une solubilité à tout type de pH. Il apporte en particulier une plus grande stabilité aux QDs solubilisées avec des amines qui sont moins stables que les QDs solubilisées avec des groupes carboxyles. Le rapport entre thioglycérol et cystéamine peut être modifié, ceci donnant différentes charges de QDs.

Les QDs solubilisées par cette méthode sont de petites tailles, les molécules utilisées étant assez courtes (environ 0,5 nm). Cependant, leur stabilité n'est pas très grande (quelques jours à quelques semaines) et leur rendement quantique est faible (< 10%). Du fait de ces

deux limitations, stabilité et rendement quantique, d'autres molécules ont été testées comme les PEGs présentés dans le paragraphe suivant.

3. Solubilisation à base de PEGs

Les PEGs utilisés ici sont achetés chez Prochimia (Pologne). Ils présentent quatre parties bien distinctes : un thiol, une chaîne carbonée, un polyéthylène glycol et une terminaison pour l'activité chimique (voir *Figure 26*). Cette terminaison peut être un groupe amine, un groupe hydroxyle ou un groupe carboxyle. Le thiol sert, comme dans le cas de la cystéine, à attacher la molécule à la surface de la coquille de ZnS grâce à un pont sulfure. La chaîne carbonée va créer une coquille parfaitement hydrophobe à la surface des QDs et donc les protéger de toute oxydation. Dans notre cas, elle est composée de 11 atomes de carbone. De plus, cela limite l'effet de l'eau sur les QDs puisqu'elle réduit énormément la PL des QDs. Enfin, la chaîne polyéthylène glycol aide à la solubilité des QDs puisqu'elle est hydrophile. Dans les PEGs utilisés, il y a 6 groupes éthylène glycol.

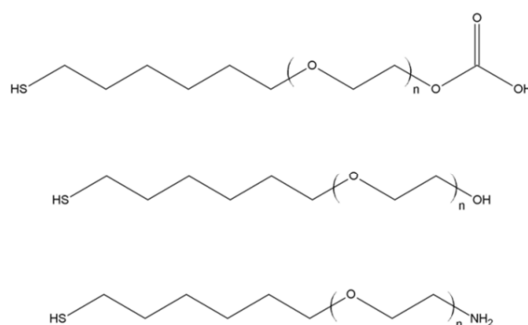


Figure 26 : Polyéthylène glycols modifiés utilisés pour la solubilisation des QDs en milieu aqueux. En haut PEG-COOH, au milieu PEG-OH et PEG-NH₂ en bas.

Ces PEGs modifiés donnent des particules avec un bon rendement quantique (de 20 à 40%) mais aussi des particules assez larges (ligands de 4 nm environ). De plus, les particules solubilisées de cette façon ont une bonne stabilité (de quelques mois à une année dans le meilleur des cas).

Tous les PEGs utilisés dans cette étude étant identiques en terme de longueur de chaîne PEG et de chaîne carbonée, une nomenclature a été développée. Le groupe de terminaison sert de nom au PEG utilisé. C'est-à-dire que des QDs solubilisées avec un PEG ayant un groupe Hydroxyle à l'extrémité, seront nommées QDs PEG-OH.

La solubilisation de QDs de ce type est assez simple ; dans un premier temps, il faut solubiliser les QDs avec de la cystéine (voir paragraphe précédent) et ajouter une solution de PEG avec un rapport de 5 mg de PEG pour 2 mg de QDs. Le poids des QDs est calculé en

fonction de la concentration molaire des QDs et de leur taille. On compte par exemple 60 kDa par QD de CdSe/ZnS émettant à 570 nm. Une incubation de 24 heures est nécessaire avant de passer les QDs sur une colonne Sephadex G 25 pour retirer la cystéine et les PEGs non attachés. Elles sont ensuite passées 3 fois dans des tubes à exclusion de masse avec une masse de coupure à 30 KDa.

Les QDs solubilisées avec du PEG-COOH sont stables à pH basique entre 7,5 et 10, les PEG-OH entre 4 et 10 et les PEH-NH₂ le sont entre 4 et 6.

4. Solubilisation avec du 2-(diméthylamino)éthanethiol

La solubilisation à base de cystéamine étant tout de même assez aléatoire et la stabilité des QDs qui en ressortent étant assez faible, une autre modification de surface a été testée. Cette « amélioration » se base sur le fait que le cystéamine n'a en terminaison qu'un groupe amine primaire (lié à un seul carbone) alors que plus le nombre d'atomes de carbone est grand plus la stabilité est importante. On a donc utilisé du 2-(diméthylamino)éthanethiol car son amine est secondaire (lié à 2 atomes de carbone). (Voir Figure 27)

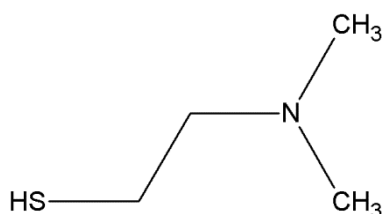


Figure 27 : 2-(diméthylamino)éthanethiol

Ce groupe amine secondaire donne une meilleure solubilité mais réduit la charge des QDs solubilisées par ce composé par rapport à celles solubilisées avec du cystéamine. Par contre, la modification de cette charge, grâce à l'ajout de thioglycérol, est toujours possible et est même souhaitée. Le protocole de solubilisation est quasiment identique à celui utilisé pour la cystéine. Cependant, la solubilité de ce composé est meilleure dans le toluène que dans le chloroforme ; le chloroforme est donc remplacé par du toluène. De même, dans l'étape de nettoyage, le méthanol est trop agressif pour les particules solubilisées avec ce composé ; c'est pourquoi le propanol est utilisé pour le lavage après l'échange des ligands, plutôt que le méthanol. Les QDs résultantes de cette solubilisation sont également stables à des pH compris entre 4 et 6. Les purifications sont identiques à celle de la cystéine, centrifugation normale et avec des tubes à exclusion de masse.

Une fois les QDs solubilisées, une caractérisation complète doit être effectuée ; pour cela plusieurs méthodes sont nécessaires et détaillées dans la partie suivante.

II. Caractérisation optique

La caractérisation optique ne traite pas uniquement des QDs mais également de la caractérisation des PMs qui sont aussi optiquement actives. Dans cette partie nous étudierons notamment comment mesurer les concentrations, les rendements quantiques et nous vérifierons la monodispersité et la stabilité des QDs par différentes méthodes.

A. La spectrométrie d'absorption UV-visible

La spectrométrie UV-visible permet de remonter au spectre d'absorption des espèces. Elle a été utilisée pour plusieurs raisons. Pour mesurer les concentrations des échantillons de bR grâce à la loi de Beer-Lambert, pour mesurer la taille des cœurs de QDs et pour connaître leur coefficient d'extinction molaire et donc leur concentration. Elle sert aussi lors d'une mesure de rendement quantique. Le spectromètre utilisé est un Jasco V-530, équipé de deux lampes, une au tungstène et une au deutérium. Il permet de mesurer des absorptions entre 190 et 1100 nm avec une précision de 0,5 nm.

1. Principe de la spectrométrie UV-Visible et loi de Beer-Lambert

Dans notre cas, l'échantillon est liquide mais il pourrait être solide, cela ne changerait rien. Le schéma simplifié d'un spectromètre est présenté sur la *Figure 28*.

Selon la loi de Beer-Lambert l'absorption de l'échantillon est égale à :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times c \times l \quad (\text{Eq 14})$$

Avec A l'absorption de l'échantillon fonction de la longueur d'onde, ε coefficient d'extinction molaire, c la concentration de l'élément qui absorbe et l la longueur du chemin optique à travers la solution.

Il est donc aisé, grâce à cette formule, de calculer la concentration en bR dans une solution. Le coefficient d'absorption de la bR est de $63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à son maximum d'absorption (568 nm) [146]. On peut donc calculer la concentration sans difficulté si on connaît la longueur du chemin optique et l'absorption.

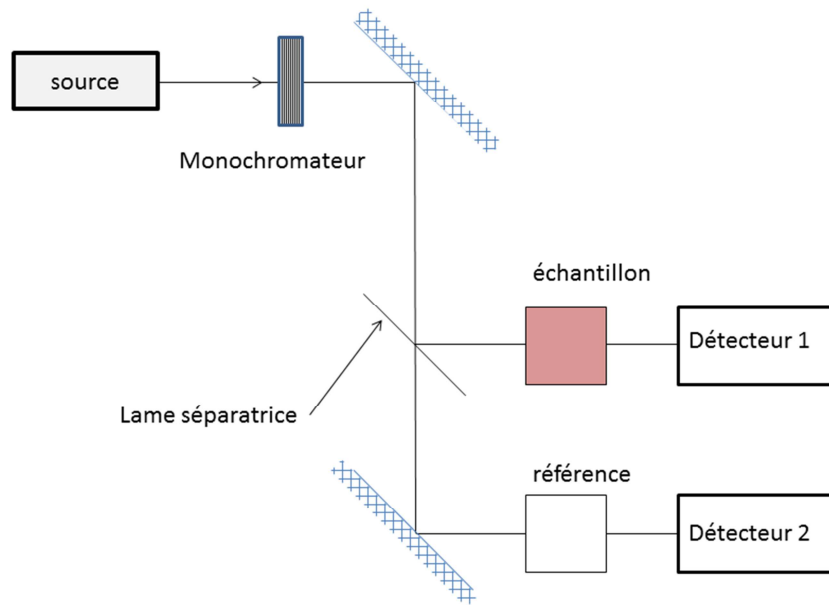


Figure 28 : Schéma simplifié d'un spectrophotomètre UV-visible. Après passage dans un monochromateur l'appareil enregistre en fonction de la longueur d'onde l'absorption de l'échantillon par rapport à l'absorption de la référence (solvant seul).

Par exemple, pour un échantillon dont l'absorption est de 0,5 à 568 nm et la longueur de la cuve de 1 cm, on obtient une concentration de $7,94 \times 10^{-6}$ M. Il est également possible de se servir de cette formule pour mesurer la concentration en bR dans le cas des WMs, même s'il n'y a plus d'absorption à 568 nm. Il suffit pour cela de mesurer l'absorption d'une solution de bR normale à 568 nm et à 280 nm (absorption des protéines due à la tryptophane et la tyrosine). Il est alors possible de calculer la concentration grâce à l'absorption à 568 nm et d'en déduire le coefficient d'extinction molaire correspondant à l'absorption à 280 nm. Une fois ce coefficient connu, il suffit d'appliquer la loi de Beer-Lambert à la solution de WMs grâce à son absorption à 280 nm. C'est la méthode qui a été utilisée pour mesurer la concentration en bR dans des solutions de WMs de ce travail.

Cette méthode de mesure de concentration de solution à l'aide de la loi de Beer-Lambert est assez fiable et assez rapide. Cependant, elle ne se prête pas aussi simplement à la mesure de concentration des QDs, même si elle fonctionne parfaitement pour les protéines. C'est ce que nous allons voir maintenant.

2. Mesure de la concentration en QDs

La loi de Beer-Lambert trouve ses limites dans le cas des QDs. En effet, elle ne peut pas être utilisée sur des échantillons de cette nature. Ceci est principalement dû au fait que les échantillons de QDs ne sont jamais parfaits. En effet, chaque QD a un diamètre bien fixé,

mais toutes les QDs d'un lot n'ont pas tout à fait le même diamètre. Même si l'échantillon est dit monodisperse (une seule longueur d'onde d'émission étroite), il y a de petites variations au niveau des tailles des particules et de leur forme. Ces petites variations vont apporter leur lot d'incertitude sur la concentration.

En effet, au début de cette thèse, la concentration des QDs était mesurée à partir de la loi de B-L. Comme nous l'avons vu l'un des paramètres important de la loi de B-L est le coefficient d'extinction molaire. Celui des QDs est, comme beaucoup de leurs propriétés, dépendant de leur taille. En 2003, Yu *et al.* [147] ont montré qu'en fonction du premier pic d'absorption excitonique, la mesure du diamètre du cœur d'un nanocristal est possible. On peut également en déduire son énergie de gap et son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde de ce même pic excitonique. Il faut donc chercher la longueur d'onde du premier maximum d'absorption pour en déduire l'énergie de son gap et donc son coefficient d'extinction molaire. Cependant, cette méthode n'est pas parfaite, notamment pour les QDs les plus gros (6 à 10 nm de diamètre) et donne des valeurs inexacts de ces coefficients. En septembre 2009, un nouvel article est paru, montrant que pour les QDs, il faut tenir compte de l'élargissement du premier pic excitonique [148]. Une amélioration du calcul du coefficient d'extinction a été apportée. Dans cet article deux solutions sont proposées. La première est une méthode approchée utilisant la loi de B-L mais donnant de nouvelles valeurs des coefficients d'extinction molaire en fonction du diamètre des QDs. La seconde est une méthode fine donnant une nouvelle forme de la loi de B-L, intégrant l'élargissement du premier pic excitonique :

$$c (M) = \frac{Abs}{l(cm) \times \varepsilon(M^{-1}cm^{-1})} \times \frac{\Delta E_{1s,HWHM}(eV)}{0,06} \quad (\text{Eq 15})$$

où c est la concentration en QDs, l la longueur de la cuve, ε le coefficient d'extinction molaire et ΔE la demi-largeur à mi-hauteur du pic excitonique des QDs en énergie. Il faut donc mesurer la longueur d'onde à laquelle l'absorption est de 50% du pic excitonique, puis la convertir en énergie grâce à la formule suivante :

$$E = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (\text{Eq 16})$$

où h est la constante de Planck et c la célérité de la lumière. On fait de même pour calculer l'énergie du pic excitonique et on soustrait la première à la seconde. On trouve alors le ΔE de l'équation 3. Cette formule permet d'obtenir des concentrations plus fiables et depuis 2009 toutes les concentrations en QDs mesurées pour ce travail l'ont été avec cette méthode.

B. Le spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre est un appareil simple, permettant de mesurer la PL d'une espèce, dans notre cas en solution, mais également sur des substrats ou dans des puits. Il est équipé d'une lampe d'excitation accordable en longueur d'onde et d'un système de fentes permettant de limiter la quantité de lumière arrivant sur l'échantillon ou celle qui en repart (*Figure 29*). Ce système permet notamment de savoir si l'échantillon de QDs est bien monodisperse grâce à son spectre de PL. En effet, si la largeur à mi-hauteur est de plus de 30 nm c'est que l'échantillon n'est pas réellement monodisperse. De plus cet appareil nous a permis de faire des mesures de FRET en statique entre les QDs et la bR. L'appareil utilisé est un Varian Cary Eclipse. Il est équipé d'une lampe flash au xénon permettant de réduire l'exposition des échantillons aux rayonnements puisqu'elle ne s'allume que pendant les mesures. On peut mesurer la PL d'échantillons entre 190 nm et 1100 nm.

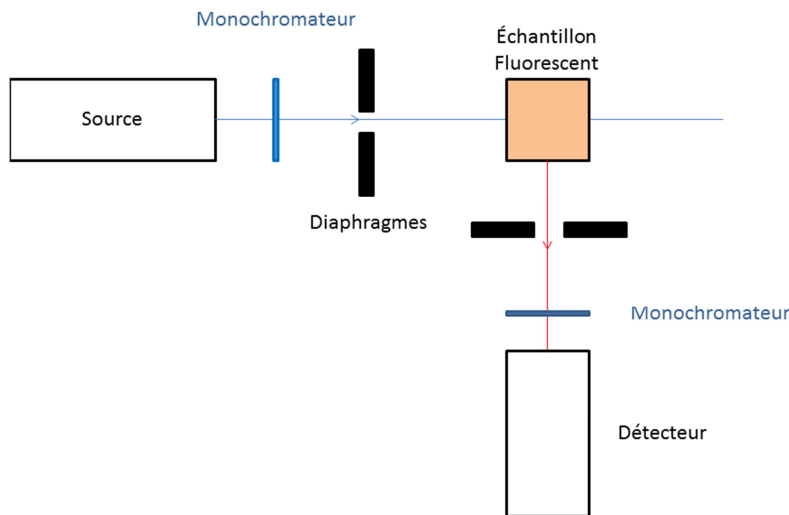


Figure 29 : Schéma d'un spectrofluorimètre.

1. Principe d'un spectrofluorimètre

Une lampe illumine l'échantillon à une longueur d'onde fixée par l'utilisateur et la PL de l'échantillon est collectée dans la direction perpendiculaire au rayon incident. La longueur d'onde d'excitation est fixée à l'aide d'un monochromateur à l'entrée du système permettant ainsi d'illuminer l'échantillon avec une seule longueur d'onde. A la sortie du système, un monochromateur permet de couvrir la gamme demandée par l'utilisateur pour la PL de l'échantillon, nanomètre par nanomètre. Des diaphragmes permettent à l'entrée et la sortie de contrôler la quantité de lumière entrante et sortante de l'échantillon pour avoir la meilleure résolution possible et une quantité de lumière optimale sur le détecteur. Si ces

diaphragmes sont trop ouverts, le détecteur peut saturer et les pics de PL peuvent être élargis. A l'inverse, s'ils sont trop fermés, la quantité de lumière est trop faible et le détecteur ne peut enregistrer de spectre avec une bonne résolution, le rapport signal-bruit étant trop petit.

2. Mesure de FRET en statique

Dans cette partie, nous avons tenté de mesurer le FRET entre QDs et bR. Pour cela, des solutions uniquement à base de QDs sont préparées et progressivement de la bR est ajoutée. Lors de chaque ajout, un spectre de PL des QDs est enregistré sans jamais modifier les paramètres optiques lors d'une série de mesures sur le même échantillon. La seule difficulté dans ce type de mesures vient du fait qu'il faut corriger chaque courbe en fonction de sa concentration. En effet, à chaque ajout de bR la concentration de QDs chute puisque le volume de la solution augmente. Ce phénomène participe aussi à la baisse du signal de PL. Pour corriger ce biais, il suffit de corriger la valeur de la PL en la multipliant par le facteur de dilution qui est égal à :

$$\text{coefficient de dilution} = \frac{\text{volume total}}{\text{volume de départ}} \quad (\text{Eq 17})$$

Dans ce cas, la PL correspond exactement à la PL qu'aurait eue une solution dont la concentration serait égale à celle qu'avait la première solution.

Après chaque ajout, les solutions doivent être mélangées énergiquement pour les homogénéiser, puis laissées au repos une minute pour que le système se stabilise. Ensuite la mesure est réalisée, puis un autre ajout de bR est fait, etc.

Lors de ces mesures, la concentration en QDs est de 2×10^{-8} M en QDs pour une concentration de bR de 2×10^{-7} M. Le volume initial de solution est de 2 ml et le volume final de bR ajouté est de 1 ml, pour arriver à un rapport de 5 bR/QD.

3. Mesure de rendement quantique

Le rendement quantique (QY) est défini comme le rapport entre le nombre de photons absorbés par une espèce et le nombre de photons réémis par cette espèce. En effet, les fluorophores absorbent de la lumière, mais toute cette lumière n'est pas réémise. Dans le cas des QDs, il y a des recombinaisons des paires électron-trou qui se font de façon non radiative et donc une différence entre le nombre de photons émis et celui des photons initialement absorbés. Pour mesurer cette différence et donc ce rapport, la méthode de [149] a été utilisée.

Cette méthode consiste à comparer le rendement quantique de fluorescence d'une espèce pour laquelle il est connu à celui de l'échantillon testé. Pour cela, il suffit de mesurer

l'absorption et la PL de plusieurs concentrations des deux échantillons, sans jamais changer les réglages optiques du spectrofluorimètre ou du spectrophotomètre. On peut ainsi tracer deux droites où la PL est fonction de l'absorption. Ces deux droites doivent impérativement passer par 0. On peut alors connaître le QY grâce à :

$$QY_{test} = \frac{Pente_{test}}{Pente_{ref}} \times QY_{ref} \times \left(\frac{n_{test}}{n_{ref}}\right)^2 \quad (\text{Eq 18})$$

où $Pente_{test}$ et $Pente_{ref}$ sont respectivement les pentes des droites de PL en fonction de l'absorption pour l'échantillon à tester et la référence, QY_{ref} le rendement quantique de la référence et n_{test} et n_{ref} les indices des milieux dans lesquels ont été faites les mesures s'ils sont différents pour les deux échantillons.

Ce genre de mesure est fiable à plus ou moins 5 à 10 % suivant la linéarité de la droite obtenue. De plus, il faut utiliser des solutions relativement diluées pour toutes les mesures optiques car, pour éviter l'effet de filtre dans la solution, l'absorption doit toujours être $< 0,1$ pour une cuve d'un centimètre, $< 0,2$ pour une cuve de deux centimètres, etc.

C. Mesure par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Pour vérifier l'intégrité des solutions utilisées ainsi que les caractéristiques physiques des QDs solubilisées, nous avons utilisé la DLS. Cette technique utilise la diffusion d'un rayon laser par des nanoparticules en solution et permet de mesurer leurs diamètres hydrodynamiques à l'aide de leur mouvement brownien (voir annexe 1). La mesure de la taille des QDs par cette méthode est assez rapide et permet de savoir si les QDs sont solubilisées sous forme unique ou si elles sont agrégées en par petits nombres. En appliquant un champ électrique, on peut également remonter à leur potentiel zêta. Ce potentiel rend compte de la charge de surface des QDs. Cette mesure permet de mettre en avant les propriétés différentes des QDs lorsque leurs ligands de surface sont modifiés.

L'appareil utilisé durant cette thèse est un Zêta Sizer Nano ZS de Malvern Instruments (Angleterre).

D. Microscopie à temps de vie de Fluorescence (FLIM)

Le FLIM est un microscope permettant d'enregistrer des images dont le contraste est donné par le temps de vie de fluorescence de l'échantillon. En effet, le temps de vie de fluorescence est indépendant de la concentration en fluorophores, mais est fortement dépendant de l'environnement proche de ce dernier. Imaginez un fluorophore dont le temps

de vie dépende du pH de son environnement, de la présence de calcium ou de tout autre élément à analyser. Il peut alors servir de sonde pour le FLIM et les résultats obtenus seront tous indépendants de la concentration de ce fluorophore. C'est pourquoi c'est devenu, ces dernières années, un outil d'analyse privilégié en biologie. La possibilité de réaliser des images indépendantes de la quantité locale de fluorophore est réellement intéressante puisqu'il est rare qu'ils se répartissent uniformément à l'intérieur de l'échantillon. Cela évite également les phénomènes de saturation lorsque les fluorophores non liés et donc inintéressants sont injectés en trop grand nombre.

Dans notre cas, le FLIM a été utilisé pour vérifier l'impact de la présence de bR sur le temps de vie de la PL des QDs. L'appareil utilisé est un système FLIM-TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) multispectral (16 canaux) de Becker & Hickl GmbH (Berlin, Germany). Ceci signifie que le FLIM est couplé à un microscope confocal et que les photons récupéré par le FLIM sont issus de l'excitation du laser du microscope. En effet, le microscope confocal est un LSM (laser scanning microscope), c'est-à-dire que chaque pixel est enregistré de façon séquentielle [150]. Ceci est réalisable en balayant l'échantillon avec le laser et en mesurant en chaque point l'intensité. On utilise souvent les microscopes confocaux puisque cela permet de ne pas être gêné par la fluorescence émise par d'autres points dans l'échantillon. Dans un microscope confocal, seule le plan focal dans lequel on travail est visualisable. Le laser utilisé ici est un laser Chameleon Ultra II pulsé à 80 Mhz avec fenêtre de pulse à 140 fs. Il est accordable de 690 à 1080 nm.

L'idée sur laquelle est basée ce microscope est qu'il suffit d'enregistrer les temps de vie en même temps que le microscope confocal enregistre son image. Pendant la mesure d'intensité le système TCSPC enregistre les temps de vie de fluorescence et l'appareil mesure alors en chaque point une courbe de décroissance de fluorescence. Ceci est possible grâce à la fréquence à laquelle fonctionne le laser du microscope confocal. Dans notre cas le laser est pulsé à 80 MHz ; si on passe 20 μ s par pixel on va enregistrer 1600 pulses de laser par pixel. Ceci donne suffisamment de photons pour créer des courbes de décroissance. Les données sont ensuite stockées dans une matrice à 3 dimensions où x et y indiquent la position du pixel. La troisième dimension représente le moment d'arrivé des photons par rapport au pulses du laser à la position donnée.

De plus notre système est multispectral, c'est-à-dire qu'il peut enregistrer 16 canaux différents en même temps, en fonction des longueurs d'onde des photons captés par le détecteur. Ceci permet de réduire le bruit sur les images, mais aussi d'utiliser plusieurs fluorophores en même temps et donc sur la même image de tester plusieurs paramètres. On

peut ainsi imaginer deux sondes avec deux longueurs d'onde d'émission différentes, testant le pH local et la concentration en sodium par exemple sur la même image.

Le réglage des systèmes FLIM par rapport au microscope confocal est souvent compliqué. Maintenant des systèmes commerciaux comme celui utilisé sont développés, ce qui facilite grandement la tâche. De plus, le traitement des données est réalisé grâce au logiciel fourni par le fabricant. Ces logiciels permettent notamment de modéliser les courbes de décroissance de la fluorescence et de représenter les images en temps de vie. De plus, dans le cas de décroissances multi-exponentielles, il est possible de regarder l'évolution séparément sur les temps courts ou sur les temps longs. Cependant, notre système présente un petit inconvénient pour la mesure de temps de vie sur les QDs car le laser est pulsé à 80 MHz. Cette pulsation correspond à une période de 12,5 ns, qui est environ le temps de vie moyen de la PL des QDs. Il nous manque donc sur chaque spectre la fin de la décroissance de la PL des QDs. Un enregistrement, pour être complet, doit couvrir environ 4 fois plus de temps que le temps de vie attendu, ce qui nous impose une durée d'enregistrement d'environ 50 ns. Or notre laser envoie un pulse tous les 12,5 ns, ce qui ne nous permet d'avoir que des décroissances partielles.

E. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est un appareil très utilisé en biologie pour connaître les structures secondaires des protéines et pour bien d'autres applications (voir annexe 2). Il nous a permis de mettre en évidence de façon rapide et fiable l'organisation des bRs à l'intérieur des PMs. En effet, le signal de CD de la bR est complètement différent si les protéines sont sous forme trimérique ou monomérique. Pour notre équipe, c'était la première fois qu'il était utilisé.

1. Spectre de la bR

Les protéines possèdent un spectre de CD dans les UV, dû à leur structure secondaire. C'est donc également le cas de la bR. Elle est composée d'hélices (72 – 82%), de feuillets β (2 – 11%) et de coudes β (11 – 17%) [151], déterminés par dichroïsme circulaire en 1987. Cependant, ce n'est pas la seule zone dans laquelle elle présente un signal de CD.

En effet, la bR est une protéine à rétinol et elle absorbe dans le visible à 570 nm. Cette absorption est associée à un signal de CD. Les deux spectres de la bR sont présentés sur la *Figure 30*. L'origine du spectre dans l'UV ne pose aucun problème, il est dû à la structure

secondaire de la protéine, mais comment expliquer le signal dans le visible ? Il est relié à l'absorption du rétinol, mais pourquoi y a-t-il un CD associé à cette absorption ?

D'abord il est bon de noter une différence d'amplitude entre les deux bandes du spectre associé au signal du rétinol. Il existe deux explications de l'origine de ce signal et de la non-symétrie de ces bandes [152]. La première serait la superposition d'une large bande positive centrée sur la bande d'absorption, due aux interactions entre le rétinol et la protéine et une bande excitonique avec un lobe positif pour les petites longueurs d'onde et une bande négative d'égale amplitude pour les grandes longueurs d'onde, qui serait due aux interactions rétinol à rétinol. La seconde solution serait que ces deux bandes sont indépendantes et dues à deux transitions différentes. Cependant, aucune preuve de cette seconde hypothèse n'a été trouvée.

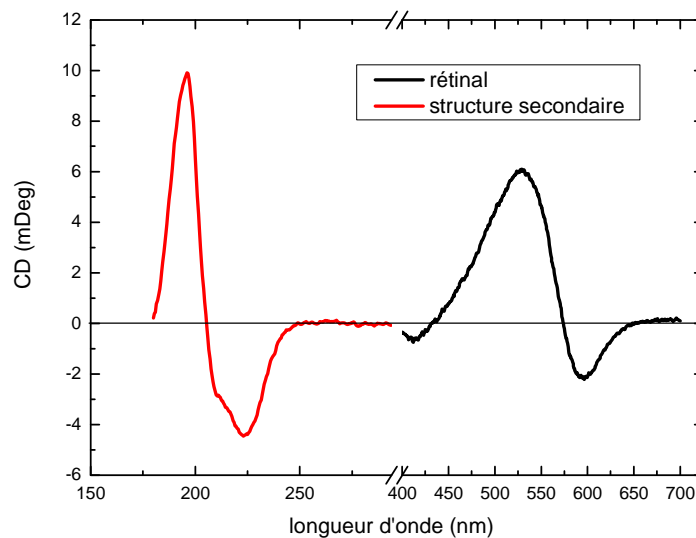


Figure 30 : Spectre de CD de la bR dans l'UV (structure secondaire) et dans le visible (rétinal).

Par contre, la première hypothèse a été largement confirmée. En effet, Heyn *et al.* [152], ont montré que la superposition d'une bande d'interaction avec la protéine et une bande excitonique était bien la raison pour laquelle, le spectre de CD du rétinol avait cette forme. Effectivement, le changement de signe d'une bande excitonique apparaît toujours à la longueur d'onde d'absorption maximale (568 nm dans le cas de la bR) et les deux extrema locaux sont forcément situés symétriquement de chaque côté de ce point, avec la même amplitude et le même écart en longueur d'onde. Dans ces conditions, la superposition

proposée dans le premier cas semble être la bonne pour expliquer l'asymétrie du signal et le fait que le changement de signe n'apparaissent qu'à 574 nm, plutôt qu'à 568 nm.

La présence de la bande excitonique est due à plusieurs facteurs. Dans un premier temps, il faut un arrangement rigide des protéines les unes par rapport aux autres. Ensuite il faut que la distance rétinale à rétinale soit comprise entre 12 Å et 45 Å. Puisque le signal de CD des bandes excitoniques est proportionnel au carré du coefficient d'extinction molaire, le fort coefficient de la bR à 568 nm ($63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) permet des interactions longues distances.

Pour mettre finalement en évidence cette dépendance à la distance et à l'organisation des protéines, il suffit de fluidifier la membrane à l'aide d'un détergent. L'insertion de ce détergent dans la membrane va alors augmenter la distance protéine-protéine, mais également les désorganiser et donc le signal de CD ne sera alors plus dû qu'aux interactions rétinal à protéines.

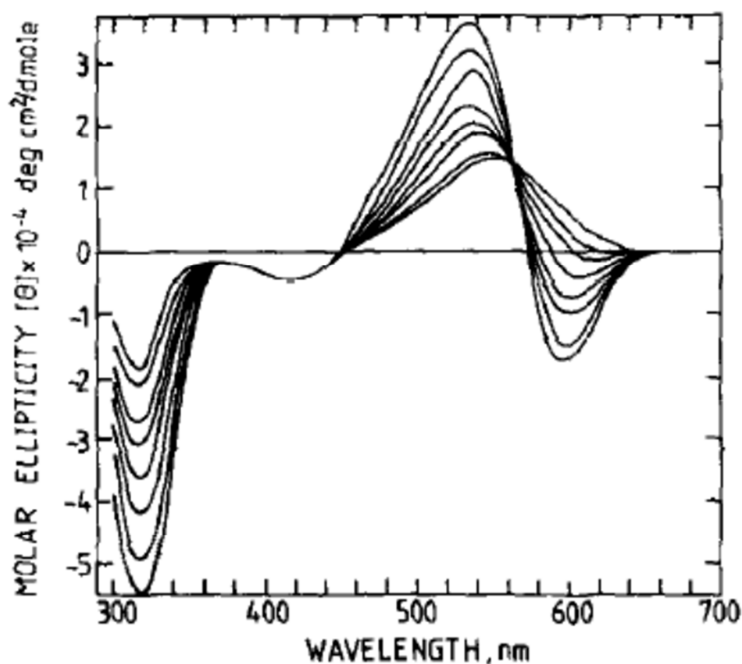


Figure 31 : Spectre de CD de bR en présence de 2% en volume de Triton X-100, en fonction du temps et à 20°C. Plus le temps après ajout du Triton est long plus les amplitudes de CD décroissent. Les spectres ont été enregistrés à 2, 13, 30, 46, 60, 80, 125 et 200 minutes [152].

Après solubilisation par le Triton X-100, il ne subsiste que la bande positive due à l'interaction entre le rétinale et la protéine. Il est donc clair que le signal de CD du rétinale est dû à deux parties bien distinctes : les interactions rétinale-rétinale et les interactions rétinale-protéine. Les interactions excitoniques sont dues à l'organisation des protéines qui est parfaitement fixe et à la faible distance qui les sépare.

2. Appareillage

L'appareil utilisé était un Jasco J-815. Il est équipé d'une lampe au Xénon de 450 Watts et peut détecter des signaux de 163 à 1100 nm. Toutes les expériences ont été menées à 5 °C pour éviter de vaporiser les échantillons du fait de la grande quantité de lumière qu'ils peuvent absorber. La bR utilisée dans ces expériences était de la bR sauvage et les QDs solubilisés à la cystéine émettaient à 570 nm.

III. Microscopie à force atomique

La Microscopie à Force Atomique (AFM) a été un des outils principaux utilisés pendant cette thèse (voir annexe 3). Le développement des conditions d'imagerie pour la bR seule et pour les complexes bR/QDs a demandé un travail important, l'imagerie en milieu fluide d'objets biologiques n'ayant jamais été réalisée au LMEN avant le début de cette thèse.

L'AFM a démontré ces dernières années tout son potentiel en biologie. En effet, ce type de microscopie permet de travailler dans le milieu naturel des cellules ou autres protéines. Il est possible de travailler en milieu liquide, de contrôler la température, la pression, l'humidité, par exemple. C'est donc tout naturellement que nous avons utilisé l'AFM pour imager la bR et le complexe qu'elle forme avec les QDs, en liquide comme à l'air.

A. Microscope et pointes

Le microscope à force atomique utilisé durant cette thèse est un Nanoscope IIIa de marque Bruker. Il est équipé de 2 scanners de taille de 120 μm x 120 μm (scanner J) et de 10 μm x 10 μm (scanner E). Le scanner E a majoritairement été utilisé durant cette thèse du fait de sa meilleure précision.

Sur la *Figure 32*, on distingue les différentes parties de l'AFM du laboratoire. Le microscope est monté sur une table antivibratoire, car les moindres vibrations mécaniques entraînent des perturbations sur les images. De plus, une caméra avec un objectif x10 est montée en série avec un moniteur pour que l'expérimentateur puisse positionner le microscope sur la zone de l'échantillon qui l'intéresse. Une lampe est associée à cette caméra permettant d'illuminer l'échantillon pour plus de visibilité. Le microscope ainsi que le porte-pointe sont prévus pour que rien n'obstrue la vue de la caméra et que l'échantillon soit parfaitement visible, même en milieu liquide. De plus, cette caméra permet de focaliser le rayon laser sur la pointe et dans le cas d'échantillon très lisse de régler la distance pointe-échantillon, grâce à la réflexion de la pointe. En effet, certains échantillons tels que les échantillons à base de silicium sont très réfléchissants. Il est alors difficile pour l'expérimentateur de visualiser à la caméra où se situe la surface. Dans ce cas, pour approcher la pointe de la surface de l'échantillon, on utilise la pointe et son image dans l'échantillon. Lorsque les deux sont très proches ceci signifie que la pointe est très proche de la surface.

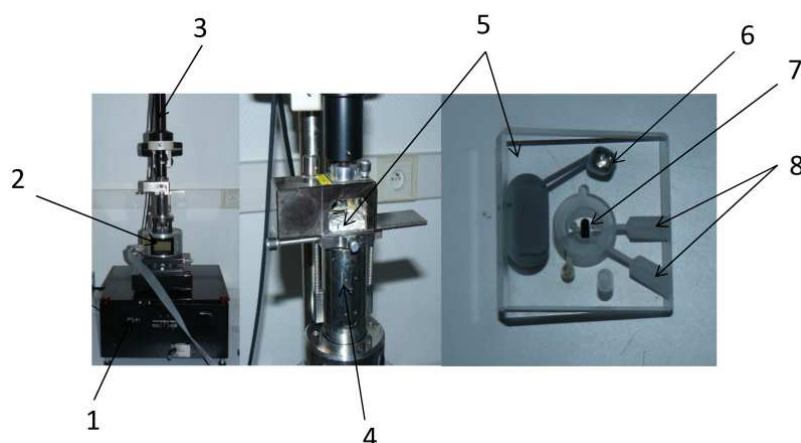


Figure 32 : AFM Nanoscope III a du LMEN. 1) table antivibratoire 2) tête AFM 3) camera 4) scanner 5) cellule pour l'imagerie en milieu liquide 6) système de vibration de la cellule fluide 7) pointe et attache 8) arrivée/sortie de fluide

Les pointes utilisées dépendaient du mode d'imagerie envisagé. En contact à l'air, les NP de marque Bruker ont été utilisées. En mode tapping à l'air, les pointes utilisées étaient des TAP 525 (MPP 13120 maintenant) de chez Bruker. Pour le contact comme le tapping en milieu liquide deux types de pointes ont été utilisées, mais leurs caractéristiques sont sensiblement les mêmes : les OTR-4 de Olympus et les PNP-TR de chez Nanoworld.

B. Imagerie de la bR

1. Choix du substrat

Plusieurs qualités dans le substrat doivent être impérativement requises. La première est plutôt simple à comprendre, il faut qu'il soit parfaitement plan. Ceci signifie qu'il faut que la rugosité de sa surface nue soit inférieure au nanomètre, pour pouvoir faire des images en haute résolution. S'il n'est pas parfaitement plan, les PMs relativement souples vont épouser sa surface et donc ne pas être planes. Ceci représente un très gros problème pour l'imagerie AFM. Il doit également être simple d'utilisation et prêt dès qu'on en a besoin. Enfin, s'il est peu cher, c'est encore mieux.

Seuls quelques substrats présentent toutes ces qualités. Notre choix s'est porté sur le mica. Régulièrement utilisé en AFM, ce substrat permet d'obtenir facilement des grandes surfaces parfaitement planes. En effet, plusieurs dizaines de microns peuvent être couverts sans irrégularité sur le mica. Le mica utilisé était de type muscovite. Il est composé de silicate

d'aluminium et de potassium. Il est bon de noter également que le mica présente une charge négative à sa surface [153].

2. A l'air

a) Préparation des échantillons

La préparation des échantillons pour l'AFM à l'air est assez simple. Il suffit de déposer une goutte de PMs dispersées dans de l'eau, à une concentration de 50 µg/ml et de la laisser sécher. Il ne faut surtout pas utiliser de tampon ou d'autres sels, car sinon de petits cristaux se forment sur l'échantillon lors du séchage. Ensuite l'échantillon est séché rapidement dans un dessiccateur ou dans une étuve.

b) Imagerie

L'imagerie de la bR à l'air n'apporte pas d'information de haute résolution. Les PMs sont bien lisses et déposées à plat sur le mica, mais le réseau de bR n'est pas visible quel que soit le mode d'imagerie utilisé. Ceci est probablement dû à la déshydratation de la bR. L'imagerie à l'air n'est utile que pour contrôler la taille et la forme des PMs.

3. En liquide

a) Préparation des échantillons

Le protocole qui va suivre est partiellement tiré de [154]. Pour pouvoir imager les PMs et donc la bR, certaines conditions sont requises. La méthode exposée ici est simple ; elle consiste en une méthode de dépôt par sédimentation. Elle comporte plusieurs étapes présentées dans les paragraphes qui suivent.

(1) Méthode de dépôt des PMs

Le dépôt des PMs sur le mica se fait en 4 étapes. La première consiste à cliver le mica pour avoir une surface parfaitement lisse et propre comme nous venons de le voir. La seconde est le « mouillage » du mica par une solution à base de MgCl₂ à 20 mM. Cette solution contient également un tampon. Elle est laissée pendant 5 minutes à la surface du mica. Le Mg²⁺ se dépose et confère au substrat une charge positive qui permet aux PMs de mieux adhérer au mica par simple interaction électrostatique puisque les PMs sont en moyenne négativement chargées. Ensuite, la solution qu'on vient de déposer est retirée et remplacée par la solution contenant les PMs. La sédimentation opère pendant 20 à 30 minutes

puis l'échantillon est rincé avec une solution identique mais ne contenant pas les PMs. Enfin, c'est dans cette même solution que l'image AFM est obtenue.

Chaque solution est composée d'un tampon qui doit être identique d'une étape à l'autre et différentes quantités de sels. Chaque composant des solutions a un rôle très spécifique qui va être détaillé maintenant. Nous avons déjà vu ce à quoi sert la solution contenant le $MgCl_2$, passons maintenant à l'étape de dépôt des PMs

(2) *Solution contenant les PMs*

La solution contenant les PMs contient un tampon et un ou deux sels. Le tampon est utilisé pour stabiliser le pH de la solution, il est utilisé à une concentration de 10 mM maximum et dépend du pH que l'on veut atteindre. Dans notre étude, on distingue trois gammes différentes de pH. La première se situe entre 4 et 5 et le tampon utilisé était de l'acétate de sodium, la seconde entre 5 et 6 contient du MES et la troisième entre 7,5 et 9 du TRIS. Les tampons doivent être les mêmes du début de la préparation de l'échantillon, jusqu'à l'imagerie. Il n'y a pas d'intérêt à changer de pH d'une étape de préparation à l'autre. De plus, ceci représenterait un risque d'agrégation ou de repliement des PMs.

La solution contenant les PMs contient du tampon, mais également du KCl à 150 mM. Ce chlorure de potassium est utilisé pour déposer les PMs bien à plat sur le substrat. Si on n'utilise pas de KCl, les PMs se replient sur elles-mêmes et ne forment pas de beaux patches sur lesquels l'imagerie de la bR est possible (Figure 38). Le KCl en solution, permet de modifier la sphère d'hydratation des membranes et de les rendre lisses. En effet, en modifiant leur hydratation, leur état d'énergie minimale passe d'une membrane repliée à une membrane dépliée. Une fois qu'elles sont sous cette forme, elles se déposent telles des feuilles mortes à la surface du mica. Leur surface est quasiment lisse et leur hauteur est environ de 5 nm, montrant bien qu'elles ne sont pas repliées. A 150 mM de KCl, les membranes sont bien déposées et sont stables plusieurs heures voire plusieurs jours dans l'AFM si l'échantillon ne sèche pas.

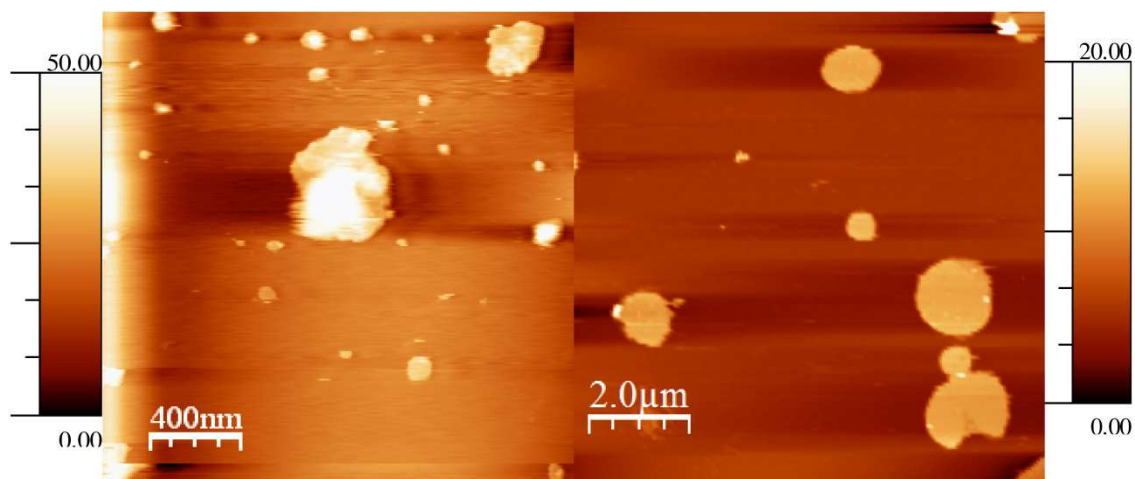


Figure 33 : Images topographiques AFM montrant un amas de PMs repliées et agrégées due à une qualité de tampon incertaine (à gauche) et des PMs parfaitement déposées (à droite). Les échelles verticales sont en nm.

La concentration en bR dans la solution de dépôt est de 50 µg/ml. Elle est suffisante pour avoir plusieurs patchs sur une image de 10 µm de côté. Si on l'augmente, le nombre de patchs va quelque peu s'accroître pour arriver à un maximum. Cependant, le taux de recouvrement du substrat par cette méthode est vraiment très faible et une augmentation trop importante de la concentration entraîne une agrégation des membranes. Il en est de même si on augmente le temps de dépôt. Trente minutes suffisent amplement pour avoir un échantillon bien recouvert.

(3) Rinçage et imagerie

Une fois les 20 à 30 minutes passées, l'échantillon est rincé soigneusement pour retirer les membranes non adsorbées avec une solution de tampon identique à la solution de dépôt, mais ne contenant pas les PMs. Ce rinçage se fait à l'aide de deux pipettes l'une servant à déposer le tampon et l'autre à le retirer. Environ 500 µl de tampon sont déposés à la surface de l'échantillon et les deux tiers sont retirés. L'opération est recommencée plusieurs fois. Lorsque le rinçage est terminé, l'échantillon est placé dans le microscope, toujours recouvert de cette solution.

b) Imagerie

(1) A grande échelle

L'imagerie à grande échelle est l'imagerie dont la taille d'image est comprise entre un et dix microns environ. Nous considérerons deux paramètres principaux : la qualité des images et la vitesse d'enregistrement. Les deux modes d'imagerie utilisés, contact et tapping,

permettent de faire des images à cette échelle, mais ils donnent des résultats sensiblement différents.

Le mode contact peut être très rapide, mais c'est parfois au détriment de la qualité des images. Faire des images rapidement est utile lorsque la qualité de l'image n'est pas primordiale. Des images de trente microns peuvent alors être enregistrées en quelques minutes avec une résolution correcte. La même image en tapping aurait pris plus d'une heure.

En revanche, le mode tapping, peut donner des images de grande qualité à ces échelles. Il est très lent, la fréquence de balayage étant de 0,25 Hz à 0,5 Hz, le temps d'acquisition d'une image est de quinze à quarante-cinq minutes. La résolution est meilleure et les petits détails sont visibles, alors qu'ils ne le sont pas en mode contact. En effet, en mode contact, la pointe déplace les petits fragments de membranes qui sont par conséquent invisibles sur les images réalisées avec ce mode, alors qu'ils le sont parfaitement sur les images réalisées en tapping.

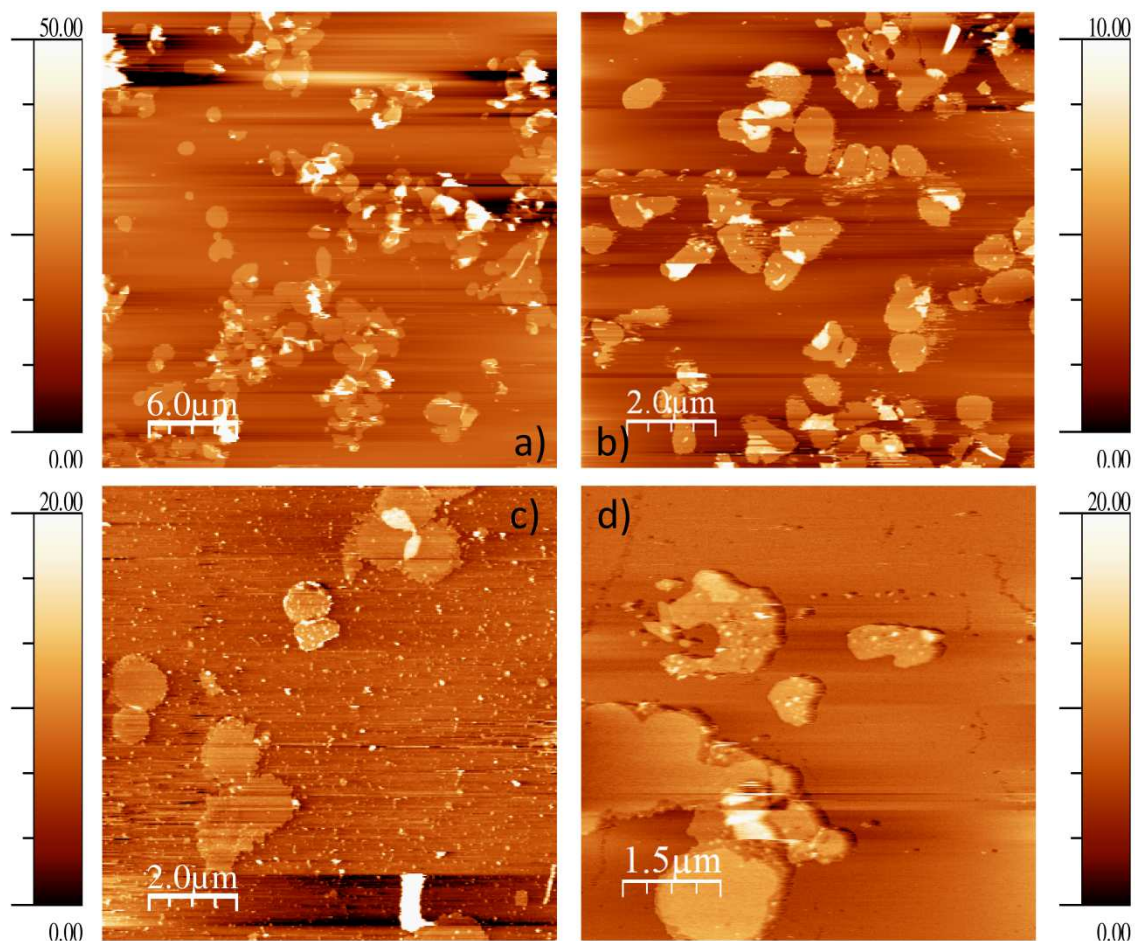


Figure 34 : Images AFM à grande échelle. Les images a) et b) sont des images en mode contact, les images c) et d) en tapping. Images réalisées à l'aide de pointe OTR-4 de 0,08 N/m. Les échelles verticales sont en nm.

La *Figure 34* met bien en avant toutes les différences entre les deux modes sur ce type d'image. Les images a) et b) sont des images enregistrées en mode contact alors que c) et d) sont des images en tapping. L'image a) est une image de trente microns qui aurait pris en tapping plus d'une heure, alors qu'elle n'a pris qu'une dizaine de minutes en contact. Cependant, des défauts sont visibles et la qualité de l'image n'est pas irréprochable quand la rugosité est élevée. L'avantage du mode contact est donc de pouvoir scanner de grandes surfaces rapidement pour rechercher les zones les plus intéressantes à étudier. L'image b) est une image de dix microns, sur laquelle de nombreuses PMs sont visibles. La résolution est correcte, mais une mauvaise régulation de l'interaction a détruit une partie des PMs de l'échantillon. En effet, des PMs sont déformées au milieu de l'image, ceci est dû au passage de la pointe sur l'échantillon avec une trop grande force d'interaction. En outre, la fréquence de balayage étant importante, l'échantillon est abîmé sur plusieurs lignes. Le mode contact est rapide mais il demande une précision importante sur le contrôle de l'interaction dans le cadre de l'imagerie d'échantillons mous.

Il n'y a pas que ce défaut de contrôle de l'interaction qui peut poser problème au mode contact sur ce type d'échantillon. Pour cela il suffit de comparer a) et b) avec c). En effet, sur l'image c) on aperçoit un grand nombre de petits fragments de PMs. Ces fragments sont invisibles sur les images en contact. La vitesse de balayage élevée et les fortes interactions les déplacent ou les décollent du mica. Une partie de l'information est donc perdue dans ce cas précis. Le mode tapping donne plus d'informations et évite l'endommagement de l'échantillon, mais son réglage est beaucoup plus difficile et sa vitesse de travail beaucoup plus faible. C'est le principal défaut du mode tapping. Cependant, une fois que l'équilibre thermique est atteint, ce mode est très stable et le microscope peut fonctionner sans surveillance.

(2) *A petite échelle*

Les images à petite échelle sont des images ayant une taille inférieure au micron, souvent moins de cinq cents nanomètres. La résolution et le temps d'acquisition vont rester les critères les plus importants à prendre en compte pour ce type d'images.

Sur des échelles de cette taille, le mode contact va montrer tout son potentiel pour imager la bR. En effet, la résolution peut être très élevée et avec une vitesse d'enregistrement importante. Si l'expérimentateur contrôle bien l'AFM, il n'y a que très peu de risque de détérioration de l'échantillon. A l'inverse, le mode tapping fluide montre toutes ces limites

avec cette taille d'image. Il est lent et sa résolution semble plus limitée qu'en mode contact. Des images enregistrées avec les deux modes sont présentées sur la figure suivante.

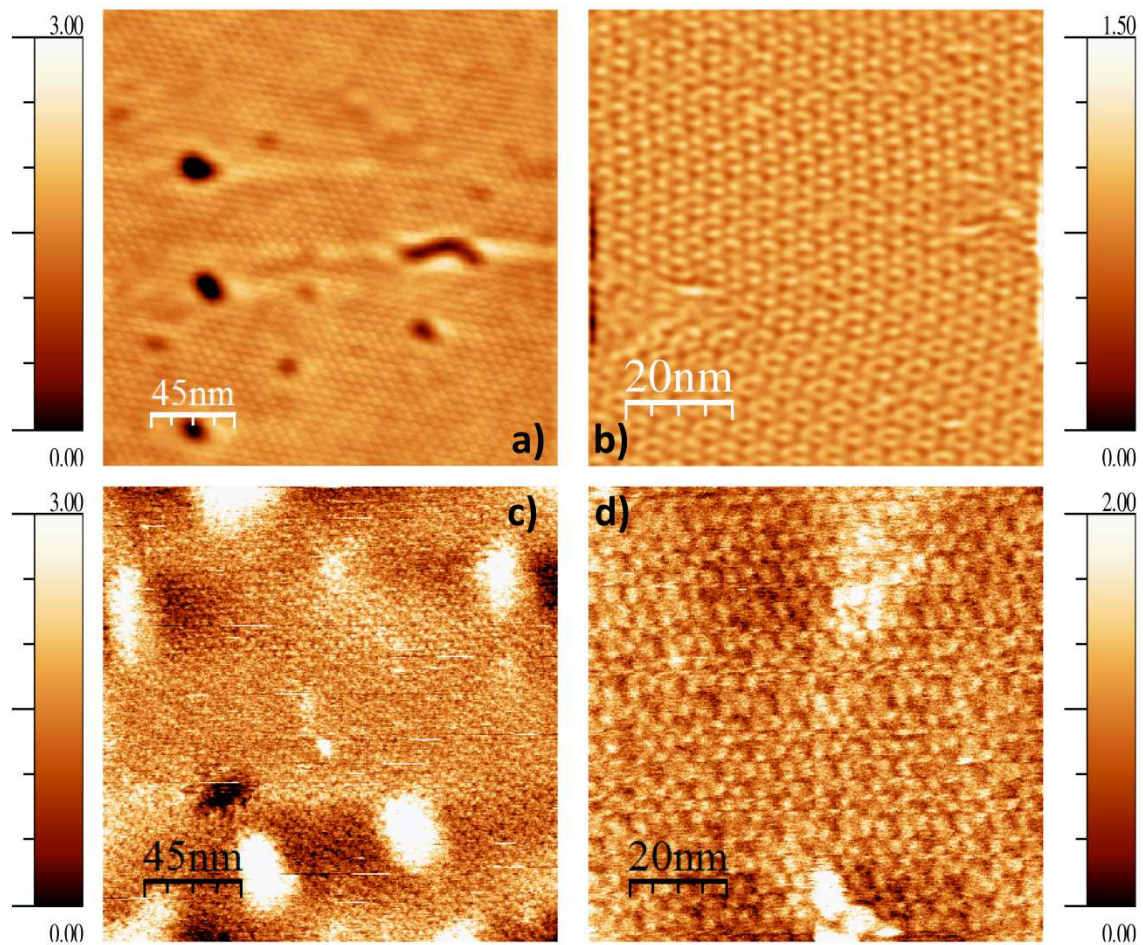


Figure 35 : Images topographiques AFM de PMs laissant apparaître le réseau de bR. Les images a) et b) sont des images enregistrées en mode contact, alors que c) et d) sont des images en mode tapping. La différence de résolution entre les deux modes est flagrante. Images réalisées à l'aide de pointe OTR-4 de 0,08 N/m. Les échelles verticales sont en nm.

La Figure 35 met en évidence la possibilité de faire apparaître le réseau de bR quel que soit le mode d'imagerie. Cependant, les résolutions des deux modes sont différentes. Dans le mode tapping, la résolution est assez limitée et les images du réseau ne sont pas de très grande qualité. Elles semblent étirées et déformées alors qu'en mode contact les trimères sont parfaitement visibles et chaque bR individuelle est identifiable. Le mode contact est donc plus approprié à l'imagerie de la bR seule, mais pas uniquement pour des raisons de résolution.

En effet, en plus des limitations de la résolution, le mode tapping sur ce type d'image souffre du même problème que pour les images à grande échelle, c'est la vitesse de balayage.

Il faut une fréquence de balayage comprise entre 6 et 12 Hz pour arriver à ce type d'image en contact alors qu'elle n'est pas de plus de 2 Hz grand maximum en mode tapping.

L'un des autres paramètres de l'imagerie du réseau de bR est le rayon de courbure des pointes. Au début de nos expériences, des pointes standards (NP, Bruker) ont été utilisées, sans résultat. Le rayon de courbure de ces pointes est d'environ 30 nm d'après le constructeur, mais n'a pas été précisément mesuré lors de nos expériences. Ce dernier influence grandement la résolution latérale de l'image et donc ne permet pas de visualiser le réseau de bR (voir Figure 36 a).

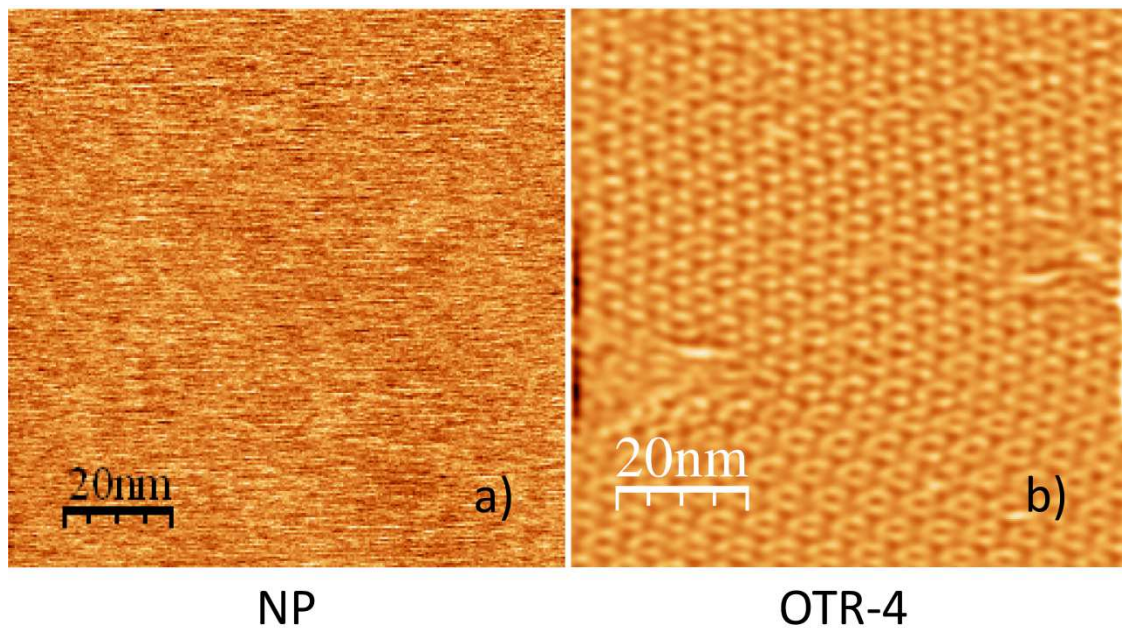


Figure 36 : Images AFM de la surface d'une PM avec deux pointes différentes réalisées en mode contact. L'image de gauche est enregistrée à l'aide d'une pointe NP de rayon de courbure de 30 nm environ, alors que celle de droite est enregistrée avec une pointe OTR-4 de rayon de courbure de 15 nm. Les échelles verticales sont en nm.

Nous n'avons réussi à visualiser le réseau de bR qu'en utilisant des pointes de meilleure qualité. Elles sont affinées sur plasma d'oxyde et présentent un rayon de courbure annoncé par le constructeur à 15 nm (Figure 36 b).

C. Protocole d'imagerie du complexe bR/QD

1. Préparation des échantillons

Les conditions d'imagerie de la bR seule ont partiellement été trouvées dans la bibliographie, mais ont demandées tout de même de légères adaptations. Dans le paragraphe qui suit, le protocole de fabrication des échantillons hybrides pour l'imagerie est décrit. Il est

partiellement tiré de celui de préparation des échantillons de PMs mais a demandé une adaptation due à la nature des échantillons à préparer. Les échantillons étant à base de deux types de matériels bien distincts, il nous a fallu adapter le protocole de fabrication de ces échantillons respectant leurs propriétés de solubilisation et de dépôt différentes.

a) Echantillon bR/QD pour l'AFM à l'air

Les échantillons de complexe bR/QD imagés à l'air ont été réalisés par simple séchage d'une solution contenant des PMs et des QDs sur une feuille de mica. Les images obtenues montrent des agrégats de QDs à la surface des PMs, comme présenté sur la *Figure 37*. L'AFM à l'air a été réalisé en mode contact et en mode tapping. Les meilleures images ont été obtenues en mode tapping ; seules ces dernières sont présentées ici.

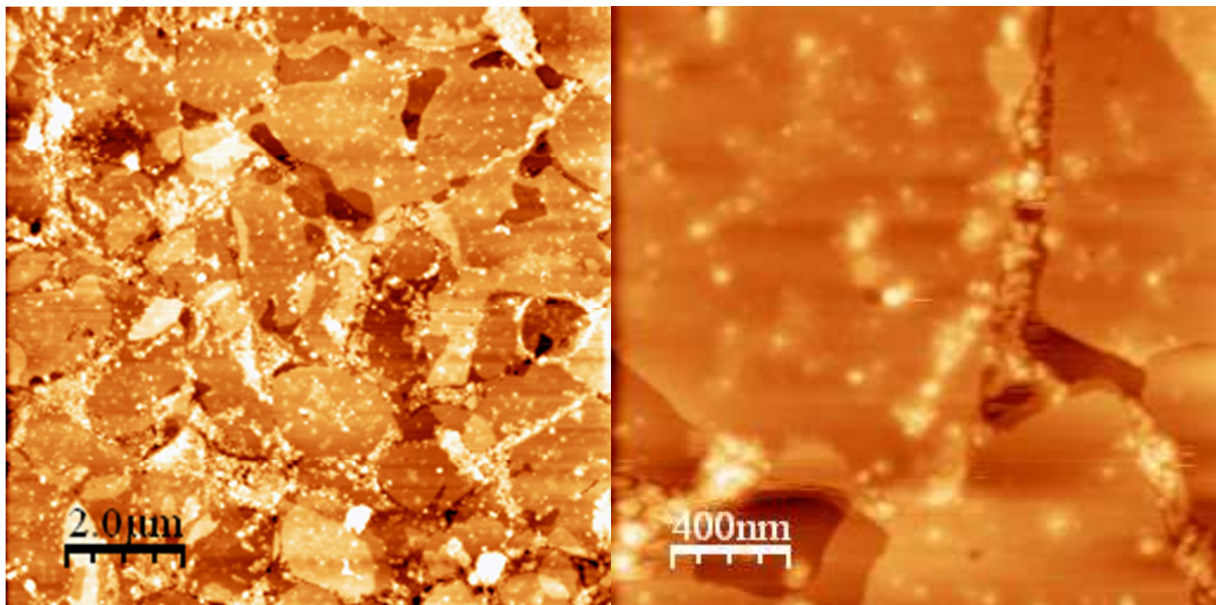


Figure 37 : Images topographiques réalisées à l'AFM à l'air en mode tapping. L'image de gauche montre un grand nombre de membranes déposées les unes sur les autres et des amas de QDs. L'image de droite est un zoom de l'image de gauche montrant très clairement que les QDs ne sont pas déposés sur les membranes et qu'elles sont agrégées dans les interstices entre les membranes.

La *Figure 37* nous présente des images AFM représentatives de la surface des échantillons imagés à l'air. Les QDs sont agrégées à la surface des membranes et principalement présentes dans les interstices créés entre les membranes. L'image de gauche montre un fort recouvrement de la surface de l'échantillon par des membranes et il semblerait que plusieurs monocouches se soient entassées. De nombreuses membranes sont visibles et à leur surface de gros agrégats de QDs le sont également. Ces images ne permettant pas de

savoir si les QDs s'épitaient sur la surface des PMs, l'AFM à l'air a été abandonné au profit de l'imagerie en milieu liquide.

b) Echantillon bR/QD pour l'AFM en liquide

Dans le cas des échantillons secs, bon nombre de problèmes sont évités grâce au séchage. Le principal problème évité est la solubilité des deux composants et l'utilisation des solutions nécessaires à leur dépôt. Comme nous l'avons vu, les PMs ont besoin de KCl et de $MgCl_2$ pour se déposer correctement sur le mica. Or les QDs ne sont pas stables en présence de grande quantité d'ions et principalement d'ions divalents (voir *Figure 38*). Le magnésium a donc été enlevé des solutions utilisées après le dépôt des PMs. Les échantillons étaient réalisés de la façon suivante : les PMs étaient déposées, mais rincées dans une solution ne contenant que du tampon (10 mM) et du KCl (150 mM). Ensuite, les QDs étaient ajoutées pour quelques minutes et le tout rincé avec une solution identique à la précédente.

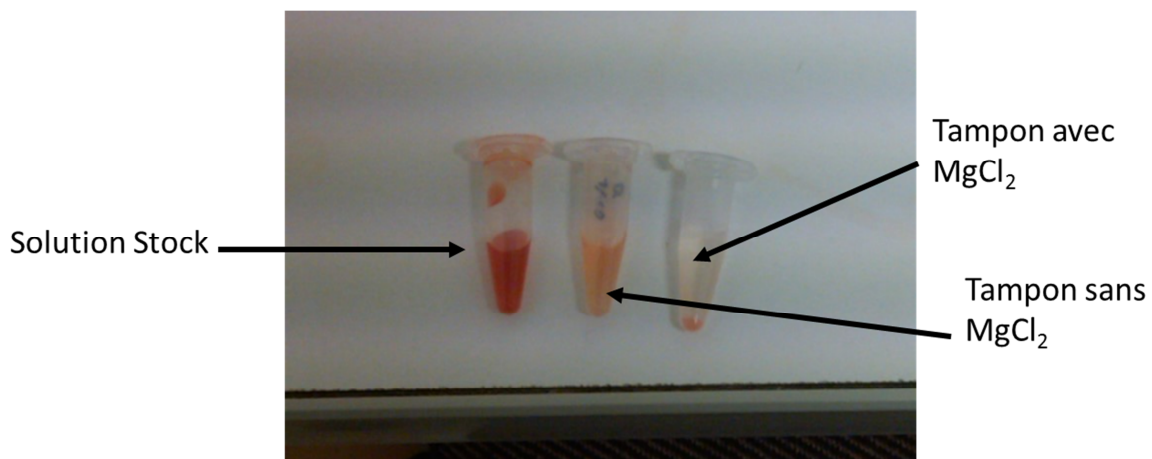


Figure 38 : QDs solubilisées à la cystéine en présence de deux solutions tampons différentes, l'une contenant du $MgCl_2$ et l'autre non. Le tube de gauche étant la solution stock, dans de l'eau.

Plus précisément, le pH des solutions utilisées est défini par la nature des QDs à déposer. Dans le cas des QDs cystéinées ou PEG-COOH du TRIS à un pH compris entre 7,5 et 9 est utilisé, alors qu'à l'inverse avec les QDs aminées (cystéamine, PEG-NH₂, 2-(diméthylamino)éthanethiol) le pH est acide. Il est compris entre 4 et 6, soit avec de l'acétate de sodium soit avec du MES. Enfin les QDs PEG-OH sont solubles à tout type de pH entre 4 et 10.

Les PMs sont déposées normalement sur du mica fraîchement clivé et mouillé avec une solution de $MgCl_2$. L'échantillon est rincé et les QDs sont ajoutées à la surface de l'échantillon. La concentration en QDs est de l'ordre de quelques dizaines de μM (entre 10 et

50 μM environ). Finalement, la solution de QDs est rincée abondamment avec une solution à base de tampon et de KCl. Une fois l'échantillon bien rincé l'imagerie est possible.

Le temps du dépôt des QDs sur ces échantillons varie en fonction de la concentration de la solution de QDs et du type de QDs. Pour une forte concentration de QDs, 30 secondes peuvent être suffisantes pour avoir un échantillon parfaitement recouvert de QDs alors qu'avec une solution plus diluée, 5 minutes peuvent être nécessaires. D'une façon générale, mieux vaut une solution fortement concentrée pendant un temps très court plutôt qu'une solution diluée pendant un temps long, car le risque d'agrégation est beaucoup plus important.

Le rinçage de l'échantillon est aussi un paramètre très important. S'il n'est pas bien rincé, des QDs risquent de se désorber de l'échantillon pendant l'imagerie, perturbant énormément la mesure. Il arrive régulièrement de devoir ressortir l'échantillon du microscope pour le rincer de nouveau plusieurs fois avant de pouvoir faire des images correctes en présence de QDs.

2. Choix des conditions d'imagerie

Comme nous l'avons vu, l'imagerie à l'air ne permet pas d'imager nos échantillons de complexe bR/QD. Ils ont donc quasiment tous été imagés en milieu liquide. Nous avons vu avec la bR seule que le mode contact donne une meilleure qualité d'image, mais certains petits fragments de membranes déplacés par la pointe lors du balayage n'étaient pas visibles dans ce mode. S'il est capable de déplacer de petits fragments de membrane, il est également capable de déplacer des QDs à la surface de l'échantillon, rendant ainsi impossible l'imagerie de QDs liées électrostatiquement à la bR. Le mode tapping a donc été préféré malgré sa moins bonne résolution et sa moins grande rapidité puisqu'il est le seul permettant l'imagerie de tels échantillons. Grâce à ce mode d'imagerie les risques de déplacement de QDs à la surface des PMs sont limités rendant l'imagerie du complexe bR/QD possible.

Les images du complexe étant dépendantes du type de QDs utilisées, seules deux images montrant des QDs épitaxiées à la surface d'une PM sont présentées à la *Figure 39*. Les autres images seront présentées dans la partie suivante.

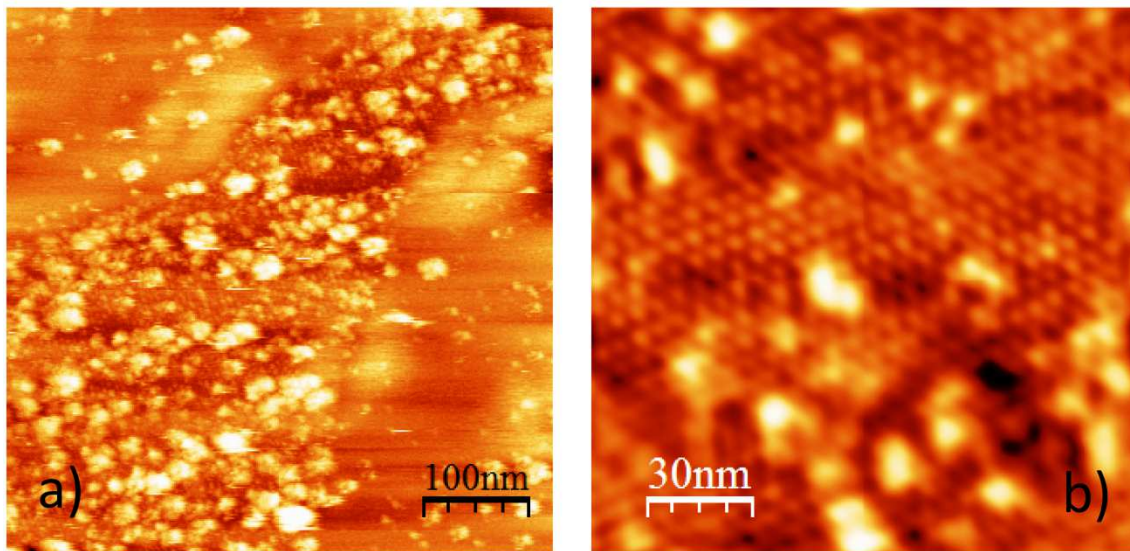


Figure 39 : Images AFM réalisées en mode tapping d'un échantillon de bR/QD. Elles ont été réalisées avec des pointes OTR-4 de constante de raideur de 0,08 N/m.

Troisième partie :
Mise en évidence et optimisation du
transfert d'énergie par effet FRET entre
QDs et bR

I. Mise en évidence du transfert d'énergie entre QDs et bR – effet FRET

Comme expliqué dans l'introduction, le but de ce travail est d'essayer de coupler les propriétés d'émission de quantum dots de CdSe/ZnS et d'absorption de la bactériorhodopsine afin d'aller vers le développement d'un commutateur optique hybride. Le couplage entre QDs et bR devrait se faire par transfert d'énergie résonant (effet FRET) et provoquer dans les conditions adéquates une extinction de l'émission des QDs. La première partie de l'étude a donc consisté à essayer d'obtenir cette extinction et une fois obtenue, d'essayer de comprendre comment s'effectuait le transfert d'énergie entre QDs et bR.

A. Transfert d'énergie entre bR et QD

L'expérience la plus simple à effectuer pour avoir une indication d'une extinction de l'émission de QDs est de mettre en présence en solution des QDs CdSe/ZnS émettant à 570 nm avec de la bR. Cette longueur d'onde d'émission des QDs a été choisie car elle correspond au maximum de la bande d'absorption de la bR. Les QDs utilisées dans cette première expérience sont des QDs cystéinées relativement simples à préparer, de diamètre hydrodynamique de 7 ± 1 nm et de potentiel zêta de -35 ± 5 mV. Leur QY est assez faible, il est de l'ordre de 10% et leur FWHM est de 31 nm, indiquant un échantillon parfaitement monodisperse. Sur la Figure 45 a), on peut voir que le spectre d'émission des QDs est entièrement « contenu » dans le spectre d'absorption de la bR ce qui devrait permettre s'il existe de mettre en évidence un effet de transfert d'énergie entre les QDs (les donneurs) et la bR (l'accepteur).

Pour visualiser une éventuelle extinction des QDs, nous avons donc préparé une solution de QDs seules et mesuré sa PL. Nous avons ajouté ensuite des petites quantités de bR jusqu'à atteindre un rapport molaire de 4 bR/QD. Après chaque ajout de PMs, nous avons mesuré la PL de l'échantillon. Sur la Figure 45 b) (courbe verte), nous pouvons clairement visualiser une baisse de l'intensité d'émission des QDs lors de l'ajout progressif de la bR. Le biais de concentration est systématiquement corrigé comme indiqué dans la seconde partie de ce travail. La décroissance de PL des QDs en présence de PMs est assez importante de l'ordre de 61 %, a priori indicatif d'un transfert d'énergie entre bR et QD.

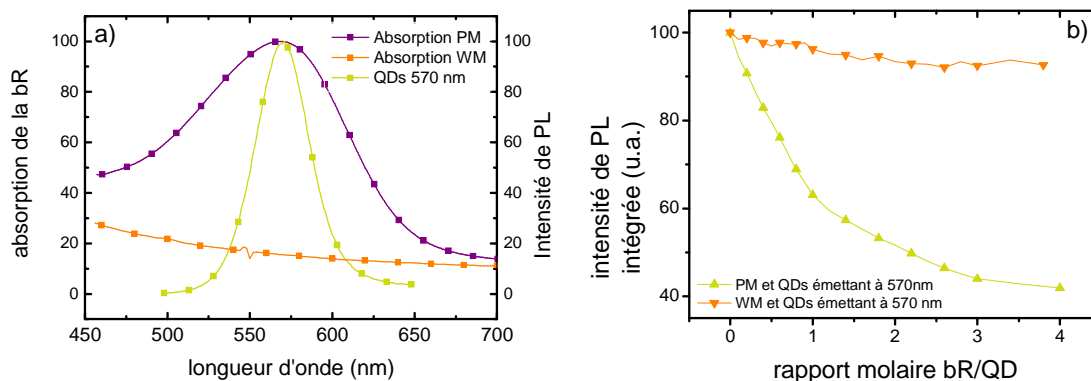


Figure 40 : A gauche : spectres d'absorption de la bR dans les PMs (violet) et dans les WMs (orange) ainsi que le spectre de PL des QDs utilisées. A droite : courbe représentant l'intensité de PL des QDs en fonction du rapport molaire bR/QD.

Toutefois, cette expérience étant menée pour vérifier si un transfert d'énergie se produit entre bR et QDs, il nous faut écarter toutes les possibilités de diminution de la PL des QDs qui ne seraient pas dues à un transfert. Dans ce but, la même expérience a été menée avec des membranes « blanches » (WMs). Ces WMs sont des PMs dans lesquelles tous les rétinals ont été extraits des bRs, le rétinale étant l'élément responsable de la bande d'absorption de la bR à 570 nm. Sans son rétinale la protéine n'absorbe plus la lumière dans le visible, comme le montre la Figure 40 a) (courbe orange), le très faible signal observé dans le visible pouvant être attribué à la diffusion de la lumière lors de la mesure d'absorption. En interaction avec les WMs, les QDs ne montrent qu'une décroissance de PL très faible de l'ordre de 8 % en présence de WMs en comparaison avec les 61% obtenu pour les PMs (Figure 40 b) (courbe bleue). Cette expérience de contrôle semble donc très concluante pour montrer que l'extinction de l'émission des QDs est bien liée à l'absorption du rétinale des PMs.

Nous avons néanmoins voulu écarter les autres effets autres que du transfert énergétique qui pourraient être à l'origine de l'extinction des QDs.

- ➔ Premièrement, il peut y avoir agrégation des QDs à la surface des membranes. En effet, il a déjà été observé que l'agrégation des QDs produit une diminution de l'intensité de PL [155,156]. Cette diminution s'accompagne néanmoins systématiquement d'un décalage du spectre d'émission des QDs vers les hautes longueurs d'onde. Ce décalage s'explique par un moins bon confinement quantique. Puisque les QDs s'agrègent, les excitons ne sont plus réellement confinés dans une seule particule mais dans plusieurs ce qui diminue le confinement quantique et donc la largeur de la bande interdite. La PL des QDs se déplace alors vers les grandes

longueurs d'onde. Lors des mesures de PL des QDs en présence de PMs aucun décalage vers le rouge n'a été observé ce qui tend à écarter une possible agrégation. Une telle agrégation pourrait expliquer la faible extinction des QDs observée avec les WMs (8%) – on y observe d'ailleurs un léger décalage de l'émission vers le rouge – mais en aucun cas expliquer la décroissance de l'intensité de PL importante des QDs en présence de PMs (61 %) (Figure 40 b).

→ Cette diminution de PL peut également être due à deux effets non voulus que sont l'effet de filtre interne de l'échantillon et la réabsorption de la PL du donneur par l'accepteur. L'effet de filtre interne provient de l'absorption de la lumière incidente d'excitation par l'accepteur. Dans notre cas, les échantillons sont excités à 400 nm et l'absorption de la bR dans ce domaine est très faible ce qui rend négligeable cet effet de filtre interne. La réabsorption est, elle, due à l'absorption par l'accepteur des photons créés par le donneur, simplement par absorption directe. Pour ne pas tenir compte de ces effets dans nos mesures d'efficacité, un facteur de correction est associé à la PL des QDs pour chaque point [157]:

$$PL_{\text{corrigée, normalisée}} = k \cdot \frac{PL_{QD+bR}}{PL_{QD}} \quad (\text{Eq 19})$$

dans laquelle k est défini par :

$$k = \frac{(1 - 10^{-A_{QD}^{exc}})(1 - 10^{-A_{QD}^{emiss}})}{A_{QD}^{exc} \cdot A_{QD}^{emiss}} \cdot \frac{A_{QD+bR}^{exc} \cdot A_{QD+bR}^{emiss}}{(1 - 10^{-A_{QD+bR}^{exc}})(1 - 10^{-A_{QD+bR}^{emiss}})} \quad (\text{Eq 20})$$

où les absorbances des composés aux longueurs d'onde d'excitation/émission sont définies par :

$$A_{QD}^{exc} = \varepsilon_{QD}(\lambda_{excitation}) \cdot c_{QD} \cdot L ; A_{QD}^{emiss} = \varepsilon_{QD}(\lambda_{emiss}) \cdot c_{QD} \cdot l \quad (\text{Eq 21})$$

$$A_{QD+bR}^{exc} = [\varepsilon_{QD}(\lambda_{excitation}) \cdot c_{QD} + \varepsilon_{bR}(\lambda_{excitation}) \cdot c_{bR}] \cdot L \quad (\text{Eq 22})$$

$$A_{QD+bR}^{emiss} = [\varepsilon_{QD}(\lambda_{emiss}) \cdot c_{QD} + \varepsilon_{bR}(\lambda_{emiss}) \cdot c_{bR}] \cdot l \quad (\text{Eq 23})$$

L et l sont les dimensions des cuves de mesure. Dans notre cas, les cuves sont carrées, $L = l = 1$ cm. Avec des QDs émettant à 570 nm et la concentration en bR à 10^{-8} M, le calcul de ce facteur donne une valeur $k=1,0001$. Dans toutes nos expériences, ce facteur k est toujours très proche de l'unité et donc cet effet ne peut expliquer la diminution de la PL observée.

Ces résultats semblent donc confirmer qu'il y a bien transfert d'énergie entre QD et bR et que ce transfert nécessite l'absorption de la bR, puisqu'il est quasiment nul quand les bR

n'ont plus de rétinale. Les résultats présentés sur la Figure 40 semblent cohérents avec plusieurs études réalisées sur un système similaire. En effet, un transfert d'énergie entre bR et QDs a déjà été montré par plusieurs études utilisant les propriétés électriques du complexe [158,159]. En effet, ces études montrent qu'il est possible de créer un photo-courant stationnaire avec le complexe bR/QD alors que c'est impossible avec de la bR seule. Effectivement, un photo-courant de transition apparaît avec la bR seule mais jamais un photo-courant stationnaire n'avait été mesuré dans un système utilisant la bR. C'est donc bien qu'un transfert d'énergie est possible entre bR et QD. De plus, ces études font clairement apparaître que l'intensité du courant observé est dépendante de la distance bR/QD puisque les meilleurs résultats sont apparus lorsque la distance bR/QD était de moins de dix nanomètres [159,158]. Pourtant, aucune de ces études n'identifie clairement les mécanismes de transfert d'énergie entre les deux composés.

Dans notre cas, la présence conjointe des QDs et de la bR étant indispensable pour expliquer les effets observés, nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans ce transfert d'énergie pour être sûr que cette perte d'énergie n'est pas due à un transfert non maîtrisé, QD à QD ou QD à bR mais à un mécanisme de type FRET. La mise en évidence du FRET passe souvent par la mesure de la PL de l'accepteur en présence du donneur [160,161]. Cette méthodologie d'expérience est une méthode directe de mise en évidence du FRET entre deux objets luminescents. Dans ce type de mesure il est nécessaire de montrer que la PL de l'accepteur augmente en présence du donneur, alors que notre cas nous avons suivi la PL du donneur (QD) qui décroît en présence de l'accepteur (bR). Dans ces articles, les QDs sont utilisées comme donneurs pour des fluorophores organiques qui sont greffés à leur surface. Les fluorophores n'ayant pas d'absorption à la longueur d'onde à laquelle les QDs sont excitées, leur augmentation de PL peut mettre en évidence un FRET. Cette augmentation de PL des fluorophores est couplée à une baisse de PL des QDs et à une diminution du temps de vie de PL des QDs qui contribuent également à démontrer le FRET.

L'efficacité du FRET peut être facilement calculée grâce à l'augmentation de la PL de l'accepteur [137] :

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_{ex})F_{A-D}}{\varepsilon_D(\lambda_{ex})F_A} \quad (\text{Eq 24})$$

où ε_A et ε_D sont respectivement les coefficients d'extinction molaire de l'accepteur et du donneur à la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} . F_{A-D} et F_A représentent la fluorescence du donneur en présence et en l'absence de l'accepteur. Cette méthode est la plus rapide pour

mettre en avant le FRET entre deux éléments fluorescents. Puisque la bR présente un pic de fluorescence vers 720 nm, dépendant du pH et de la longueur d'onde d'excitation [162], nous avons essayé de mettre en évidence le FRET par cette méthode. Cependant, le rendement quantique de la PL de la bR est très faible (environ 0,2 % [162]) et la détection de cette PL n'a pas été possible avec notre matériel pour des raisons de sensibilité ce qui fait que les incertitudes de mesure sont du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées. La mesure de la PL de la bR pour mettre en évidence le FRET ne s'avère donc pas pertinente dans le cas de notre système.

Heureusement, d'autres méthodes indirectes permettent de mettre en évidence le FRET. Dans notre cas, nous avons montré qu'un transfert d'énergie semblait se produire entre bR et QDs. Ce transfert dépend bien de la présence d'une bande d'absorption de la bR dans la bande de PL des QDs. Pour tenter de vérifier que nous sommes bien en présence de FRET, il faut retourner à la théorie expliquant ce mécanisme (première partie). Il existe plusieurs possibilités pour mettre en évidence ce transfert.

Tout d'abord, son efficacité est reliée à plusieurs paramètres que sont le rayon de Förster, la distance donneur-accepteur ou le temps de vie de PL du donneur comme le montre l'équation 13 (voir première partie de ce document) :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{Eq 13})$$

Il est donc possible de mettre en évidence le FRET grâce à la perte de PL du donneur en présence d'accepteur ou grâce à un changement de distance bR/QD ou grâce à la variation du temps de vie de PL du donneur en présence d'accepteurs.

D'autre part, le rayon de Förster est également composé de plusieurs paramètres sur lesquels on peut influencer :

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5Nn^4}J(\lambda) \quad (\text{Eq 10})$$

où κ^2 est le terme représentant l'orientation des dipôles, très difficile à faire varier. On peut modifier Q_D le rendement quantique du donneur par changement de la fonctionnalisation de surface des QDs mais finalement, le terme le plus simple à faire varier est $J(\lambda)$, puisqu'il représente l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'absorption de la bR (accepteur) et celui de PL des QDs (donneur). Son expression est :

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (\text{Eq 9})$$

Dans un premier temps, nous avons cherché à regarder ce qu'il se passait pour le temps de vie de PL des QDs en présence et en l'absence de bR.

B. Influence des PMs sur le temps de vie de PL des QDs

Grâce à l'équation 13, il est possible de mettre en évidence le FRET à l'aide de la mesure de temps de vie du donneur en présence et en l'absence de l'accepteur. En effet, le FRET ajoute une nouvelle possibilité pour dissiper l'excitation des QDs, ce qui se traduit par l'addition d'une nouvelle constante de temps dans la décroissance de leur PL. Cette nouvelle constante de temps induit alors un temps de vie plus court pour les QDs [163]. Dans ce but, nous avons préparé des échantillons pour les imager à l'aide d'un FLIM. Ce type de microscope enregistre des images en PL et, à l'aide d'un algorithme classique de mesure de temps de vie, calcule en chaque point le temps de vie de la PL de l'échantillon. Il est donc possible d'avoir des images d'intensité de PL couplées à des données de temps de vie de PL. Ces images sont présentées pour nos échantillons sur la Figure 41.

Les échantillons pour ces expériences sont les QDs cystéinées déjà utilisées précédemment, seules ou en présence de PMs, le tout positionné entre lame et lamelles de microscopie. La Figure 41 montre deux images FLIM. L'image de gauche correspondant aux QDs seules est quasi-monochromatique alors que celle de droite correspondant aux QDs « associées » au PMs présente deux couleurs distinctes. Les couleurs de ces images étant associées aux temps de vie de PL de chaque pixel, elles montrent bien une différence lorsque les QDs sont seules ou en présence de PMs. De même, les histogrammes associés à ces images montrent bien que dans le cas des QDs seules, un seul temps de vie de l'ordre de 10 ns se distingue alors que dans le cas des QDs avec des PMs deux populations de temps de vie (autour de 5 et 9 ns) sont observées. Les temps de vie de QDs CdSe/ZnS dépendent fortement du milieu dans lequel ils sont mesurés [164] mais l'ordre de grandeur autour de 10 ns semble cohérent. Sur l'image de droite, les zones vertes doivent correspondre aux QDs en contact avec le substrat (temps de vie de l'ordre de grandeur des QDs seules) et les zones rouges aux QDs en contact avec les PMs (temps de vie plus rapides). Ceci est également cohérent avec ce qui a été observé pour d'autres systèmes où le temps de vie du donneur est diminué en présence de l'accepteur [165].

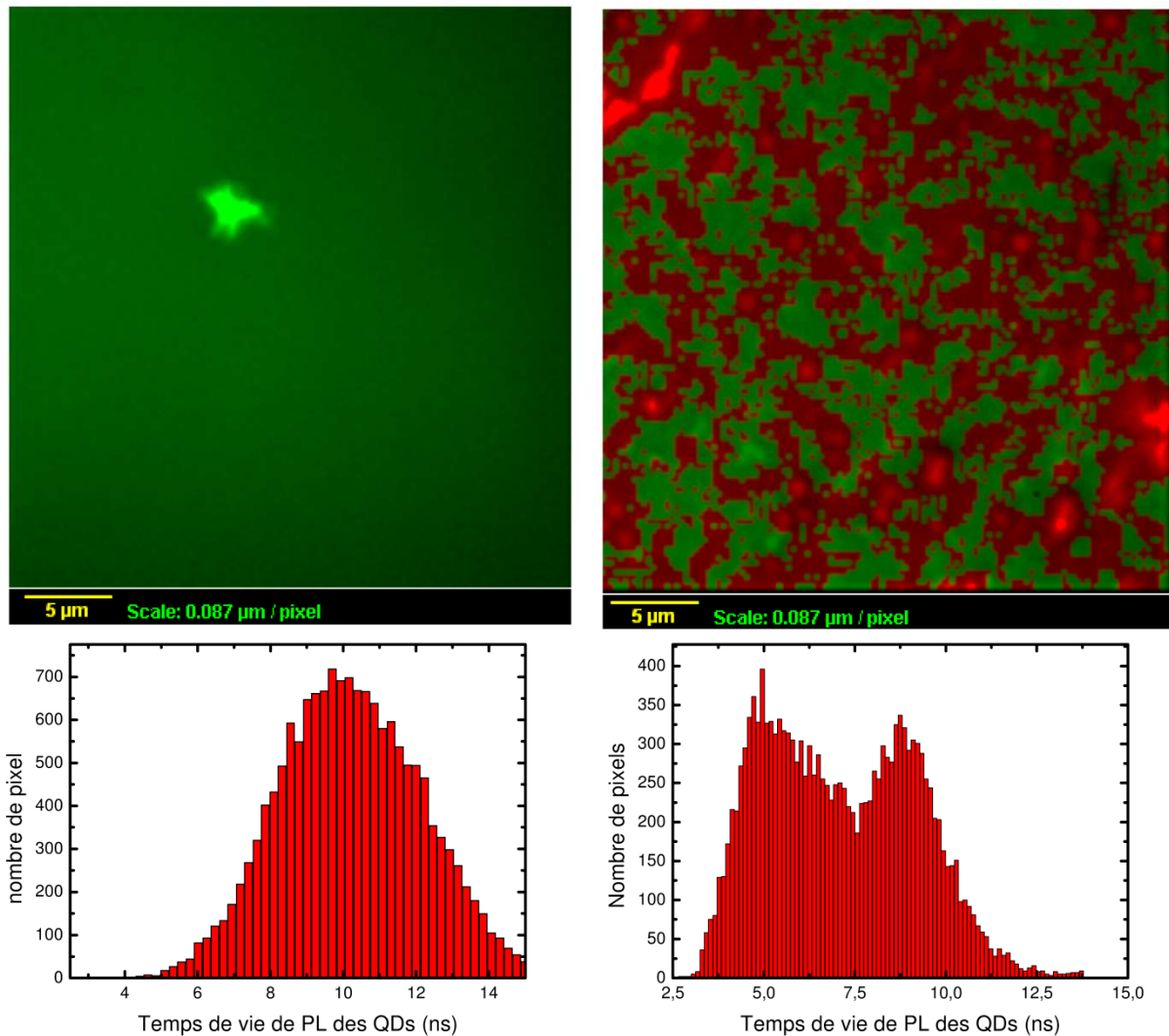


Figure 41 : Images FLIM de QDs en présence de PMs à droite et seules à gauche. Sur l'image de gauche, on ne distingue qu'une seule population de QDs alors que deux populations apparaissent distinctement sur l'image de droite : la population en contact avec les PMs (rouge) et la population en contact avec le substrat (vert). Les QDs attachées aux PMs ont un temps de vie plus court que celles déposées sur le substrat. On peut alors repérer les PMs grâce au temps de vie des QDs. Les histogrammes représentent le nombre de pixel en fonction du temps de vie moyen de leur PL.

Si ces mesures semblent qualitativement aller dans le sens du FRET, elles restent cependant sujettes à caution pour plusieurs raisons :

- ➔ Le matériel utilisé pour la mesure n'est pas adapté à notre système hybride. Sur ces images, la taille de pixel est de 87 nm ce qui correspond à de nombreux trimères de bR et également à un grand nombre de QDs (qui peuvent en outre être agrégées) alors il est possible que nous observions la moyenne de plusieurs temps de vie différents sur le même pixel, à cause de configurations différentes pour l'organisation bR/QDs.

Par exemple, si les distances entre donneurs et accepteurs sont différentes « dans » un même pixel, nous obtiendrons plusieurs temps de vie qui seront moyennés. D'autre part, notre système ne permet pas d'avoir une décroissance complète de la PL des QDs, car le laser est pulsé à 80 MHz, ce qui donne une période temporelle de 12,5 ns entre chaque pulse. Le temps de vie moyen de décroissance des QDs de CdSe/ZnS étant du même ordre de grandeur, la fin de la décroissance ne peut donc être enregistrée. Dans notre cas, le FLIM sera alors un simple indicateur de décroissance du temps de vie et aucune mesure fiable d'efficacité de FRET ne pourra en être tirée.

→ Cette analyse en temps de vie est également assez controversée pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que la décroissance du temps de vie de PL est une exponentielle simple. Or les QDs ont des temps de vie multi-exponentiels. Il faut donc vérifier la décroissance sur la moyenne de ces temps de vie. En effet, dans une décroissance multi-exponentielle, chaque temps de vie τ_i est caractérisé par son intensité A_i . On moyenne donc ces $A_i\tau_i$ pour avoir le temps de vie moyen. C'est la décroissance de cette moyenne qui est comparée à la moyenne sans la présence de l'accepteur.

Ces expériences de FLIM nous ont juste permis de montrer que le transfert d'énergie semble bien influencer sur le temps de vie de PL des QDs. Lorsqu'il y a FRET, le temps de vie de PL des QDs diminue ce qui est compatible et cohérent avec la littérature. Au final, au vu des nombreuses incertitudes liées à cette expériences, nous avons décidé de regarder les autres paramètres pouvant montrer qu'un mécanisme de type FRET pouvait être à l'origine de la décroissance d'intensité de PL des QDs en présence de bR.

C. Influence de J sur le transfert d'énergie

Comme nous l'avons rappelé précédemment (voir page 89), il est possible d'identifier le FRET grâce à sa dépendance à l'intégrale de recouvrement J . Pour modifier J , il suffit de réaliser des mesures de PL identiques à celles présentées précédemment mais avec des QDs émettant à différentes longueurs d'onde. Si les spectres d'émission des QDs se retrouvent en dehors de la bande d'absorption de la bR alors J devrait être modifiée. Les QDs nécessaires à cette étude ont toutes été solubilisées à l'aide de la cystéine de façon à faire varier le moins de paramètres possibles pour permettre une comparaison aisée. Trois lots de

QDs ont été utilisés. Leurs caractéristiques optiques sont présentées sur la Figure 42. Elles émettent à 570 nm, 610 nm et 650 nm. Leur QY est de 10% et leur FWHM sont de 30 nm. Les trois échantillons sont bien monodisperses. Les diamètres des particules varient légèrement. Les cœurs de CdSe sont de diamètre de 3,5 nm pour les QDs émettant à 570 nm, 4,7 nm pour celles de 610 nm et 6,4 pour les dernières. Ces diamètres de cœur ont été mesurés grâce à leurs spectres d'absorption respectifs (voir page 60) [148].

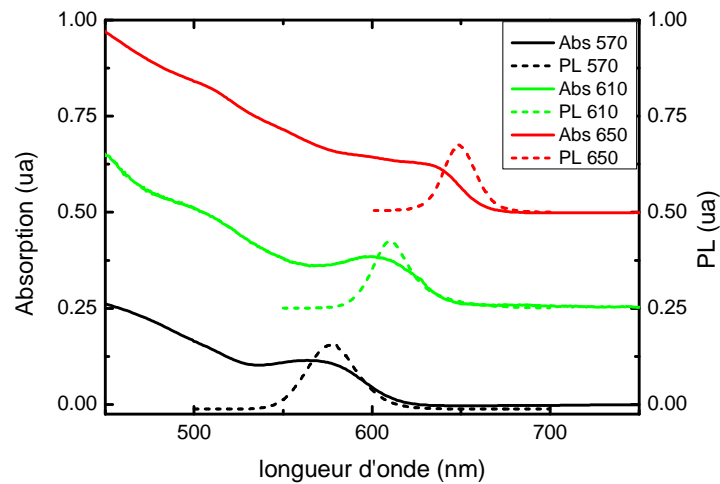


Figure 42 : Spectres d'absorption et de PL de QDs émettant à 570 nm, 610 nm et 650 nm utilisés pour la modification de l'intégral de recouvrement.

Le taux de recouvrement du spectre d'absorption de la bR par celui d'émission des QDs est différent pour chaque lot de QDs comme on peut l'observer sur la Figure 43. Les QDs 570 nm ont un recouvrement maximal du spectre d'absorption alors que celui des QDs 650 nm est le plus faible. Le cas des 610 nm est un cas intermédiaire.

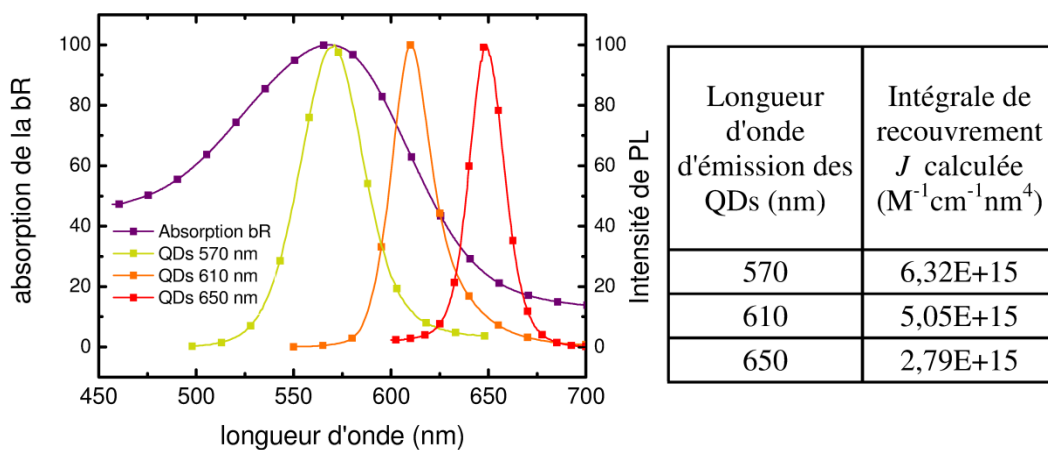


Figure 43 : Spectre d'absorption de la bR et spectres d'émission des trois lots de QDs utilisés. Il montre la différence de recouvrement entre les spectres d'émission des QDs et l'absorption de la bR. Le tableau à droite donne les valeurs des intégrales de recouvrement J .

Pour obtenir une valeur chiffrée de ce recouvrement, on utilise dans la théorie du FRET l'intégrale de recouvrement J . La définition de cette intégrale peut être trouvée dans la première partie de ce manuscrit ou à la page 89. Les valeurs calculées à l'aide des spectres de la Figure 43 sont données dans le tableau de cette même figure. On note que l'intégrale est modifiée par le changement de longueur d'onde de PL des QDs. Plus le recouvrement est faible plus J est logiquement faible.

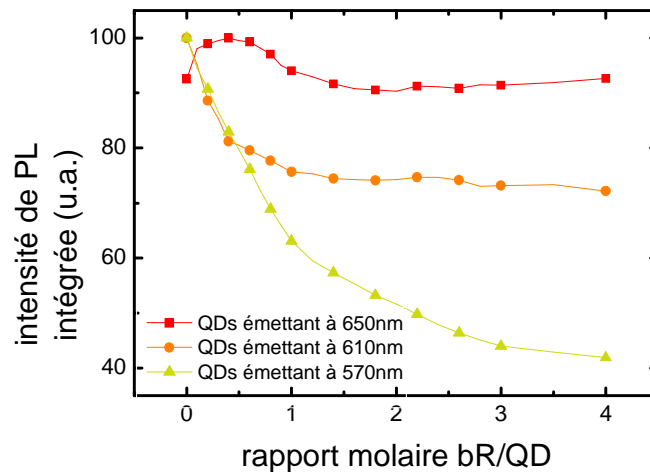


Figure 44 : Courbes représentant la variation de la PL des trois lots de QDs en fonction du rapport molaire bR/QD.

Les mesures de PL en fonction du ratio bR/QDs sont représentées sur la figure 49. La courbe verte représente les QDs émettant à 570 nm qui ont été vues dans les paragraphes précédents. Elles présentent un taux de décroissance de 61 %. La courbe rouge, représentant les QDs émettant à 610 nm, ne montre une décroissance que de 23 %. La courbe noire est celle des QDs émettant à 650 nm et dont la décroissance n'est pas de plus de 9 %. La décroissance de la PL des QDs est donc bien dépendante de la longueur d'onde de PL de ces dernières et donc de la valeur de J .

Longueur d'onde d'émission des QDs (nm)	Diamètre du Cœur (nm)	Rendement Quantique (QY)	Intégrale de recouvrement J ($M^{-1}cm^{-1}nm^4$)	Rayon de Förster R_0 (nm)	Efficiéce du transfert d'énergie observée
570	3,48	0,1	6,32E+15	4,68	61 %
610	4,67	0,08	5,05E+15	4,34	23 %
650	6,38	0,05	2,79E+15	3,64	9 %

Figure 45 : Tableau donnant les valeurs de l'intégrale de recouvrement et du rayon de Förster pour les trois types de QDs utilisées. Il donne également les valeurs des rendement quantiques nécessaires aux calculs de R_0 .

Pour pouvoir analyser les résultats obtenus, un récapitulatif des principaux paramètres nécessaires à notre étude est présenté avec la Figure 45. Le tableau ci-dessus nous montre la dépendance de J vis-à-vis de la longueur d'onde de PL des QDs. Entre les QDs émettant à 570 nm et les QDs émettant à 650 nm, J est divisé par un facteur deux, ce qui réduit R_0 d'environ un nanomètre. Pour rappel, le rayon de Förster (R_0) est la distance pour laquelle l'efficiéce de transfert est de 50 %. C'est un des paramètres primordiaux du FRET puisqu'il peut faire varier radicalement l'efficiéce. Pour s'en convaincre, il suffit de regarder l'équation 13, définissant l'efficiéce en fonction de R_0 . Cette variation de R_0 semble faible mais est pourtant significative au niveau du transfert d'énergie. En effet, l'efficiéce mesurée pour des QDs émettant à 570 nm (soit avec un J maximal) est de 61 % alors qu'elle n'est que de 23% pour des QDs ayant un J légèrement plus faible ($6,32 \times 10^{15}$ contre $5,05 \times 10^{15}$ pour les QDs émettant à 610 nm). De même, pour les QDs émettant à 650 nm, l'efficiéce n'est que de 9 %, explicable en partie par un J deux fois plus faible que pour les QDs émettant à 570 nm.

Pourtant, à elle seule l'intégrale, de recouvrement ne peut expliquer de telles variations au niveau des efficiéces. Le rendement quantique diminue lorsque la taille des particules augmente, ce qui influence le rayon de Förster. Plus le rendement quantique est faible et plus le rayon de Förster l'est également puisque d'après l'équation 11, le rayon de Förster est dépendant du QY à la puissance $1/6^e$. De même, puisque le FRET présente une dépendance en $1/r^6$, le diamètre de la particule modifie l'efficiéce du transfert de façon importante. En effet, plus le diamètre de la particule est grand et plus les excitons peuvent se retrouver loin de la surface de la PM et donc loin du rétinale. C'est pour toutes ces raisons (J ,

QY et diamètre de cœur) que les efficacités de FRET sont si différentes entre les trois types de QDs.

Il semble donc que la décroissance de PL des QDs observée en présence de bR puisse être expliquée par un effet FRET. En effet, elle présente les mêmes réponses aux variations sur J que le FRET. Quand J diminue la décroissance diminue aussi. De plus, les grandes variations peuvent être expliquées par les variations du diamètre et du QY des particules. On peut alors considérer que cette décroissance est bien due à un effet FRET entre bR et QD. Le FRET est dépendant de J à la puissance $1/6^e$, ce qui explique que le FRET n'ait pas complètement disparu malgré un faible recouvrement entre les différentes intégrales.

L'un des autres paramètres important du FRET est la distance donneur-accepteur (D-A). Nous avons donc cherché à la modifier pour mettre en avant la dépendance de notre système à sa variation.

D. Influence de la distance bR/QD

Un autre paramètre important dans la théorie FRET est la distance entre le donneur et l'accepteur (D-A). Plus cette distance est importante et plus l'efficacité du FRET sera faible. Dans les publications impliquant un effet FRET, pour des distances D-A supérieures à 10/15 nm, le transfert d'énergie devient alors négligeable. Pour connaître l'impact d'une augmentation de la distance D-A sur la perte de PL des QDs couplées à la bR, nous avons solubilisé des QDs avec du PEG-COOH. En effet, elles ont des diamètres hydrodynamiques différents puisque la cystéine est un ligand très court (environ 0,5 nm) alors que le PEG est assez long (environ 4 nm). Par ailleurs, elles ont le même potentiel zêta (fortement négatif, environ -35 mV), la même émission à 570 nm et donc la même intégrale de recouvrement J , permettant ainsi de maintenir le maximum de paramètres identiques entre les deux systèmes étudiés. Une différence est qu'elles présentent des QY différents (20 % pour les QDs PEG-COOH contre seulement 10 % pour les cystéinées) qui vont influencer différemment le rayon de Förster et donc l'efficacité du FRET mais connaissant ce QY nous pourrions le prendre en compte lors de l'analyse des résultats.

1. Influence de la taille des ligands de surface sur le FRET

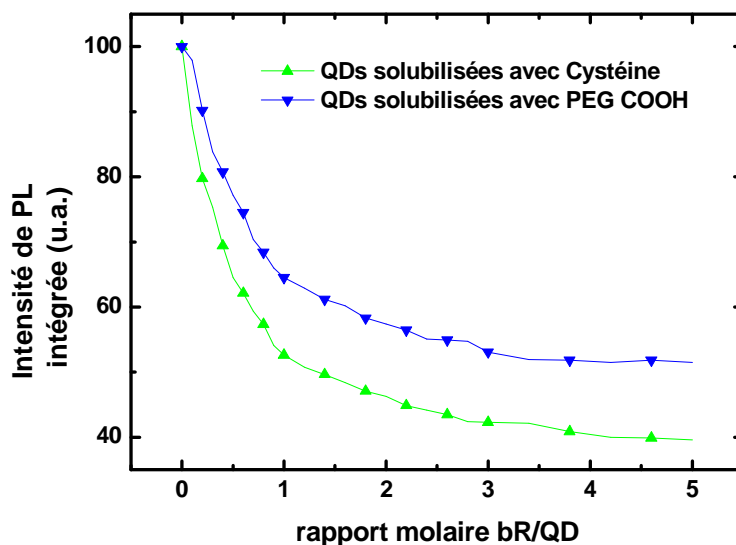


Figure 46 : Courbes représentant la décroissance de PL de QDs solubilisés avec de la cystéine ou du PEG-COOH en fonction du rapport molaire bR/QD.

La Figure 46 montre que les deux types de QDs ne présentent pas la même décroissance de PL. Les QDs cystéinés précédemment observés montrent une perte de 61 % alors que les QDs PEGnylés ne montrent une décroissance que de 48 %. Cette différence entre les deux efficacités de transfert semble en accord avec ce que nous attendions qualitativement à savoir une extinction de PL moins forte avec l'augmentation de la distance D-A. Afin de voir si ces résultats sont cohérents également au niveau quantitatif, nous avons effectué les expériences de DLS permettant d'avoir accès aux diamètres hydrodynamiques et modéliser le système pour avoir accès aux différents paramètres du FRET. La théorie du FRET à un seul accepteur est assez simple et présentée dans la première partie. Elle permet notamment au travers de l'équation 13 (page 48) de remonter simplement à la distance donneur-accepteur en fonction de l'efficacité et de R_0 . On peut donc simplement mesurer la distance D-A à l'aide de cette formule en connaissant l'efficacité que l'on mesure et R_0 que l'on calcul sur des bases purement théoriques. Cette formule est donc très simple à utiliser. Les résultats sont reportés dans la Figure 47.

ligands de surface	diamètre hydro-dynamique (nm)	Rendement quantique (QY)	Rayon de Förster (nm)	Efficienc e de transfert d'énergie mesurée	distance calculée grâce à l'efficienc e (nm)
Cystéine	7 ± 2	0,1	4,68	61%	4,34
PEG-COOH	9 ± 2	0,2	5,52	48%	5,59

Figure 47 : Tableau récapitulant les caractéristiques des QDs utilisées, les rayons de Förster associés, les efficienc es mesurées par PL ainsi que les distances calculées grâce à ces efficienc es dans le cas d'un modèle FRET à un accepteur.

La première remarque concerne les rayons hydrodynamiques des QDs : alors que la cystéine est une molécule très courte environ 0,5 nm et que les PEGs font plusieurs nanomètres de longs (environ 4 nm), les diamètres hydrodynamiques des QDs PEGynilées sont plus faibles en pratique qu'en théorie. En théorie, les PEGs font environ 4 nm, la coquille de ZnS représente 1,2 nm en diamètre, et le cœur de la QD est de 3,5 nm soit un total de plus de 12,5 nm de diamètre théorique d'une QD solubilisée avec ce ligand. En pratique, ce type de QDs n'est mesuré qu'à 9 nm de moyenne. Ceci peut s'expliquer par le fait que les PEGs se rétractent et qu'ils ne sont pas complètement étendus. Néanmoins, ces mesures confirment bien une différence de distance D-A qui explique en partie les résultats d'extinction observés.

Une autre indication de ce tableau est que le rayon de Förster est différent pour les deux types de QDs. Ceci s'explique par les QY différents pour les deux types de solubilisation. Malgré le fait que le rayon de Förster soit plus grand pour les QDs PEGynilées, l'efficienc e du FRET observée est plus faible, ce qui induit forcément une plus grande distance D-A. Il semble donc que les QDs PEGynilées soient plus loin du rétinale que les QDs cystéinées, malgré des interactions électrostatiques identiques.

Au niveau des distances D-A calculées en modélisant le système par le modèle de FRET simple, nous trouvons que la différence de distances calculées grâce aux efficienc es de transfert est assez faible (moins de 1,25 nm). Cela peut s'expliquer en faisant l'hypothèse que les PEGs se contractent sous l'influence des interactions bR/QDs et donc que la distance D-A est réduite par cette diminution de taille de la coquille organique. Les interactions entre bR et QDs sont suffisantes pour écraser le PEG à la surface des PMs. Néanmoins, les distances calculées (4,34 nm pour les QDs cystéinées) semblent faibles par rapport à ce que l'on attendait au vu des rayons hydrodynamiques des QDs. Pour essayer de comprendre si les distances calculées sont réalistes, regardons ce que cela signifie au niveau géométrique.

2. Distance bR/QD et Calcul de r_{min}

Le FRET fait apparaître des distances D-A calculées de l'ordre de quelques nanomètres. Cependant de telles distances sont-elles envisageables ? En effet, il nous faut nous attarder sur la mesure de la plus petite distance possible bR/QD. Nous appellerons r_{min} la distance minimale entre bR et QD. Dans le meilleur des cas, la distance minimale sera celle correspondant au positionnement d'une QD (élément donneur) directement au-dessus d'un rétinale (élément absorbant). On cherche ici la distance la plus faible entre le centre de la QDs et le rétinale. Si on considère les excitons avec une fonction d'onde symétrique par rapport au centre de la QD, alors le centre de la QD représente l'endroit à partir duquel il faut mesurer r , même si ce formalisme n'est pas réellement approprié au FRET [166,167]. De plus, la théorie du FRET traite les accepteurs et les donneurs comme des points, même si les QDs ont une taille finie et sont relativement grandes par rapport aux fluorophores organiques usuellement utilisés pour le FRET [168]. Toutefois, même si cette approche n'est pas parfaite, c'est la meilleure à notre disposition pour le moment.

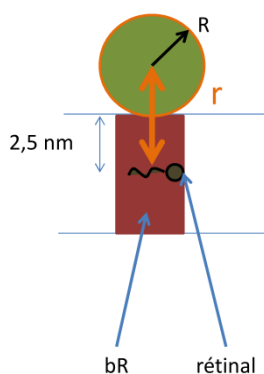


Figure 48 : Schéma représentant la distance la plus courte entre le rétinale et le centre de la QD, si cette dernière est placée juste au-dessus de la protéine.

Pour calculer cette distance, il faut définir le rayon R de la QD qui comprend toutes les parties d'une QD, à savoir, le cœur, la coquille de ZnS et la coquille organique (Figure 48). La taille du cœur est simple à déterminer avec l'absorption comme nous l'avons vu. En prenant une coquille de ZnS ne dépassant pas 2 monocouches, soit 0,62 nm (une monocouche étant définie par une épaisseur de 3,1 Å, qui est la distance entre deux plans atomiques dans l'axe [002] de la wurtzite massive dans laquelle cristallise le ZnS [93]), une QD ayant un cœur de 3 nm, une coquille de 0,6 nm et solubilisée à la cystéine (0,5 nm) possède un r_{min} de 5,1 nm. Cette valeur est supérieure à la valeur de la distance D-A que nous venons de trouver à partir des résultats expérimentaux de l'efficacité FRET et du diamètre hydrodynamique (5,1 nm > 4,34 nm). Avec la modélisation FRET que nous avons effectuée, la seule possibilité

pour interpréter ces résultats est que les QDs pénètrent partiellement ou totalement dans les PMs au niveau du rétinale ce qui semble quand même peu probable car les interactions QDs/bR devraient être uniquement électrostatiques (aucun traitement ni protocole particulier n'est appliqué au système). Un modèle simple ne semble donc pas décrire convenablement les résultats observés.

3. FRET à accepteurs multiples

Une des possibilités qui peut expliquer les différences observées est que les QDs ne viennent pas se mettre en regard direct d'un rétinale mais que chaque QD vienne se déposer au milieu d'un trimère comme nous l'avons envisagé au départ sur la Figure 21. Faisons l'hypothèse qu'une QD se trouve au milieu du trimère à égale distance des trois protéines. La géométrie est présentée sur la Figure 49.

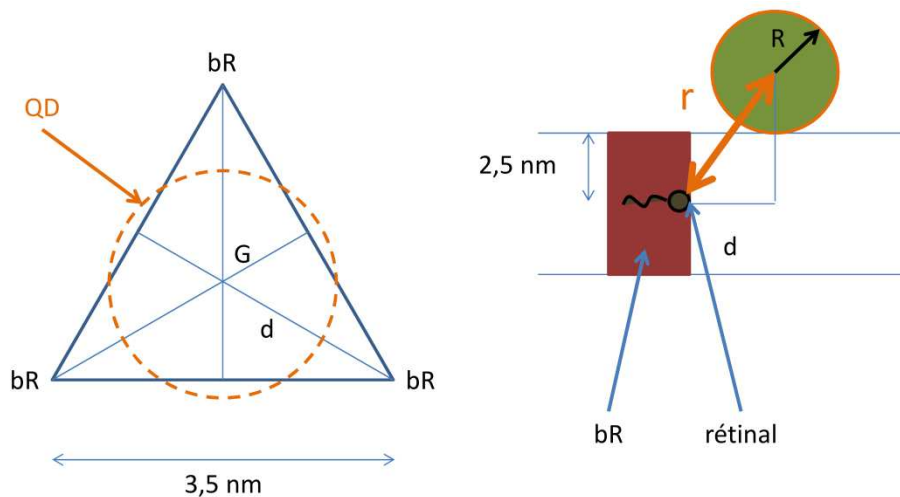


Figure 49 : Schéma représentant à gauche le triangle équilatéral formé par les bR à l'intérieur du trimère et une QD déposée au centre de ce trimère. Le point G étant le centre de gravité du triangle et d la distance entre G et une bR. La distance bR à bR a été mesurée à 3,5 nm. Sur la figure de droite, r est la plus petite distance séparant le centre de la QD au rétinale et R le rayon de la QDs. Ce rayon comprend toutes les couches de la QD (cœur, coquille de ZnS et ligands).

A la vue de la Figure 49, la distance d peut être calculée simplement. Si la distance bR-bR est de 3,5 nm, alors $d = 2$ nm. Dans ces conditions, pour R rayon de la QD, la plus petite distance D-A est donnée par :

$$r_{min} = \sqrt{d^2 + (2,5 + R)^2} = \sqrt{4 + (2,5 + R)^2} \quad (\text{Eq 1})$$

dans laquelle R comprend toutes les parties d'une QD, à savoir, le cœur, la coquille de ZnS et la coquille organique. En prenant les mêmes valeurs que précédemment, le r_{min} vaut

alors 5,48 nm ce qui est logiquement supérieur à la valeur obtenue pour une QD au-dessus du rétinale. Cette valeur est toujours supérieure à la valeur de la distance D-A que nous venons de trouver à partir des résultats expérimentaux de l'efficacité FRET et du diamètre hydrodynamique (5,48 nm > 4,34 nm). Pour essayer de comprendre les différences observées, nous avons alors utilisé un modèle FRET plus avancé prenant en compte le fait que d'après nos prévisions, pour cette organisation QDs/bR, chaque QD devrait se déposer au centre des trimères et donc interagir avec 3 accepteurs (et pas un seul comme dans le modèle utilisé jusqu'alors).

La modélisation FRET est différente devient bien plus compliqué lorsque le donneur est en présence de plusieurs accepteurs, ce qui devrait être notre cas ici.

Plusieurs études ont tenté de résoudre ce problème [160,161,169]. Ces études utilisent des QDs marquées avec des fluorophores organiques répartis aléatoirement à leur surface. Elles montrent que l'efficacité peut alors s'écrire sous la forme suivante :

$$E = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + r^6} \quad (\text{Eq 2})$$

où n est le nombre d'accepteurs par donneur. Cette formule permet de modéliser au mieux des systèmes dans lesquels les QDs sont liées à plusieurs fluorophores et donc de mesurer précisément les distances D-A. Puisque dans ces études le nombre d'accepteurs à la surface des QDs est statistique, il est possible également d'injecter une loi de Poisson sur n pour ainsi rendre compte des QDs ayant un nombre d'accepteurs différent de la moyenne [170].

Cependant, dans ces études la distance D-A est fixe puisque les fluorophores sont greffés chimiquement sur la surface des QDs et qu'il n'y a qu'un seul point de greffage possible par fluorophore. Il n'existe donc qu'une seule distance D-A, ce qui n'est pas prouvé dans notre cas. En effet, dans notre cas la position des QDs par rapport aux protéines n'est pas connue puisque les QDs peuvent se placer au centre du trimère ou juste au-dessus d'une protéine. De plus, le rétinale n'est pas tout à fait au milieu de la membrane, et comme les QDs se lient aléatoirement d'un côté ou de l'autre alors la distance D-A ne peut être la même pour tous les couples bR/QD.

De même, dans ces études il n'y a pas d'interactions entre les accepteurs, ce qui n'est pas le cas dans notre étude puisque de forts couplages excitoniques existent entre les rétinals dans les PMs. En effet, le spectre CD de la bande d'absorption du rétinale présente bien la marque de forts couplages excitoniques (voir Figure 30 page 67). Il est possible que ces interactions fortes entre les rétinals influencent le FRET entre bR et QDs.

Cependant, cette théorie est la seule développée à ce jour et, malgré ces imperfections, nous l'avons utilisée pour modéliser les résultats obtenus. Dans notre cas n sera égal à 3, puisque nous espérons déposer une seule QD par trimère de bR.

Le tableau ci-dessous récapitule les paramètres des QDs utilisées ainsi que les différentes caractéristiques observées en utilisant le modèle à accepteurs multiples.

ligands de surface	diamètre hydro-dynamique (nm)	Rendement quantique (QY)	Rayon de Förster (nm)	Efficiences de transfert d'énergie mesurée	distance calculée grâce à l'efficiences (nm)
Cystéine	7 ± 2	0,1	4,68	61%	5,22
PEG-COOH	9 ± 2	0,2	5,52	48%	6,72

Figure 50 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des QDs utilisées, les rayons de Förster associés, les efficacités mesurées par PL ainsi que les distances calculées grâce à ces efficacités dans le cas d'un modèle FRET à accepteurs multiples.

En utilisant ce modèle, les distances D-A calculées augmentent bien par rapport au modèle « simple » du FRET impliquant un seul donneur par accepteur. Les distances calculées sont maintenant cohérentes, aux incertitudes de mesures près, avec les distances minimales attendues pour notre système aussi bien avec les QDs cystéinées qu'avec les QDs PEGynilées ce qui peut être une indication forte dont les QDs s'organisent à la surface des PMs.

E. Conclusion

En résumé, nous avons montré que le transfert d'énergie est directement relié à la présence de la bande d'absorption de la bR et même plus précisément de l'intégrale de recouvrement J entre la bande d'émission des QDs et la bande d'absorption de la bR. D'autre part, une diminution du temps de vie de PL des QDs a été observée en présence de bR même si les résultats n'ont été utilisés que qualitativement. Par ailleurs, la modélisation des résultats expérimentaux obtenus en utilisant la théorie du FRET à accepteurs multiples montre bien qu'il y a une influence importante de la distance D-A dans nos systèmes. Le transfert d'énergie observé présente donc toutes les caractéristiques d'un effet FRET entre les QDs et la bR. Le transfert d'énergie s'effectuant bien, la seconde partie du travail à consister à essayer d'optimiser les interactions QDs/bR afin d'avoir une efficacité la plus grande possible.

II. Optimisation des interactions QDs/bR – recherche de l'efficacité maximale

Le FRET ne se produisant qu'à des distances inférieures à dix nanomètres, il semble évident au vu des résultats précédents qu'il existe des interactions entre bR et QDs. En effet, les solutions utilisées sont si diluées (10^{-8} M) que sans interaction et avec une répartition homogène des QDs et de la bR la distance moyenne bR-QD serait de plusieurs microns. Cette valeur correspond à l'approximation où tous les patches de PMs ont un diamètre de 500 nm. Il est donc clair que sans interactions entre bR et QD il n'y aurait pas de FRET. Quelles sont les interactions mises en jeu et comment les optimiser ? Sur la base de considérations simples, nous avons émis l'hypothèse que les QDs et la bR interagissaient de façon électrostatique : nous avons donc voulu optimiser ces interactions électrostatiques.

A. Mise en évidence par mesure de PL

Pour essayer de faire varier les interactions électrostatiques, nous sommes partis du fait que les PMs sont négativement chargées puisqu'elles sont majoritairement formées de lipides possédant une très forte charge négative. Le rapport molaire à l'intérieur de la PM est de 1/19 bR/lipide [171]. La charge de surface des PMs est donc très négative. La charge de surface des QDs va donc jouer un rôle important dans les interactions si elles sont électrostatiques.

Nous avons donc regardé quelle était l'influence de la charge de surface des QDs sur la décroissance d'intensité de PL en utilisant des QDs solubilisés avec différents ligands. En effet, grâce aux nombreux ligands utilisables avec les QDs, on peut couvrir une gamme de potentiel zêta allant de -45 mV à + 45 mV. Cette gamme va donc nous permettre de faire varier et de renforcer les interactions bR/QD si elles sont de type électrostatique. De plus, si elles le sont, alors le taux de transfert d'énergie devrait être différent pour chaque type de QDs puisque la valeur de l'interaction est différente. En effet, les QDs qui interagissent de façon très forte devraient avoir une distance plus faible avec la bR, alors que celles qui n'ont pas la bonne charge devraient être repoussées et donc avoir une distance les séparant de la bR plus grande. Dans ce cas, le FRET étant fortement dépendant de r , alors le taux de transfert devrait être plus faible.

Pour cette expérience, un lot de QDs émettant à 570 nm a été solubilisé à l'aide de la cystéine, du PEG-COOH, du PEG-OH et de la cystéamine. Ces ligands ont été choisis pour pouvoir comparer les résultats uniquement sur la base des interactions électrostatiques. Les caractéristiques des différents ligands sont résumées dans la Figure 51.

ligands de surface	diamètre hydro-dynamique (nm)	Potentiel de surface (mV)	QY (%)
Cystéamine	7 ± 2	$+30 \pm 10$	10
Cystéine	7 ± 2	-35 ± 5	10
PEG-COOH	9 ± 2	-35 ± 5	20
PEG-OH	9 ± 2	-7 ± 5	20

Figure 51: Tableau montrant la dépendance des diamètres hydrodynamiques et potentiels zêta des QDs en fonction des ligands à leur surface.

La cystéine et le PEG-COOH donnent des particules fortement négatives avec un potentiel zêta de -35 ± 5 mV. Le PEG-OH donne des particules faiblement négatives voire quasi-neutres. Leur potentiel zêta est de -7 ± 5 mV. Les QDs cystéaminés sont, elles, fortement positives et leur potentiel zêta est de 30 ± 10 mV. Cette grande incertitude sur les cystéaminés est due à deux facteurs principaux. Premièrement, lors de leur solubilisation, la cystéamine est mélangée avec du thioglycérol. Le rapport molaire entre ces deux composés donne la valeur de leur potentiel zêta. Cependant, il est difficile de contrôler si un des deux ligands se lie plus facilement que l'autre aux QDs. Deuxièmement, la mesure de ce potentiel zêta est assez périlleuse et les résultats ne sont pas toujours fiables, car les QDs solubilisés par cette méthode sont assez instables. Elles réagissent très mal à la polarisation de l'échantillon et leur agrégation est souvent très rapide. Au vu des différentes distances, les comparaisons pertinentes seront donc entre les QDs fonctionnalisées cystéamine et cystéine (même diamètre) et les PEG-COOH et les PEG-OH (même diamètre) tout en sachant que les cystéinées et les PEG-COOH ont le même potentiel de surface ce qui permettra de croiser les résultats. Toutes les QDs sont monodisperses après purification avec des FWHM de l'ordre de 30 nm. Les QY varient quelques peu d'une méthode à l'autre, les QDs PEGynilées ayant des QY de 20%, alors que celles solubilisées avec des petites molécules (cystéine et cystéamine) ont des QY de l'ordre de 10%. Les absorptions des QDs solubilisées par ces différentes méthodes sont identiques.

En résumé, les QDs cystéinées et solubilisées avec du PEG-COOH sont fortement négatives, celles solubilisées avec du PEG-OH sont quasi neutre et les solubilisées avec de la cystéamine sont positives.

La Figure 52 nous montre les résultats obtenus en PL lors de la mise en présence de ces différents types de QDs avec de la bR à des ratios différents de bR/QD.

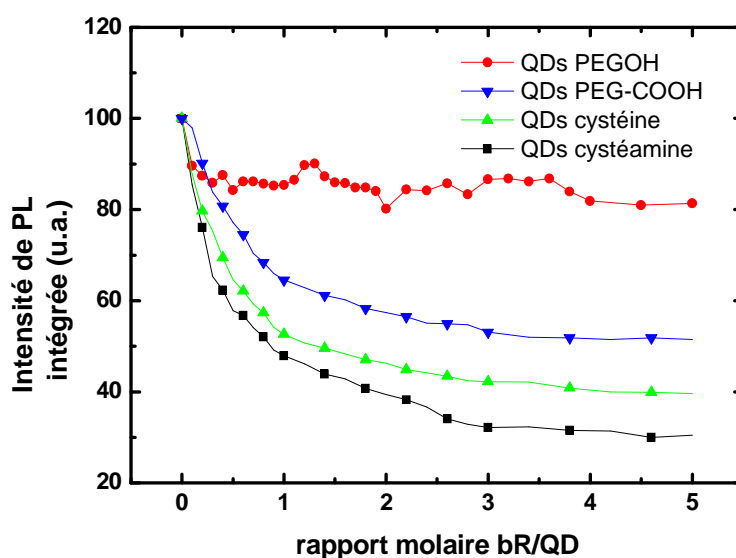


Figure 52 : Courbes représentant la décroissance de PL de QDs solubilisées à l'aide de PEG-OH (rouge), PEG-COOH (bleue), Cystéine (verte) et cystéamine (noire) en fonction du rapport molaire bR/QD.

Tous les types de QDs montrent une diminution de l'intensité de PL mais l'efficacité de ce transfert est dépendante du type de ligands de surface des QDs. Les QDs aminées montrent la plus grande efficacité de transfert avec des valeurs importantes de l'ordre de 70%. Viennent ensuite les QDs cystéinées ayant une efficacité de transfert de 61 %, puis les QDs PEG-COOH avec 48 % d'efficacité et les QDs PEG-OH avec seulement 19 % d'efficacité de transfert.

Il est donc clairement établi que l'efficacité de transfert est dépendante de la charge de surface des particules. Puisque la charge de surface des PMs est très négative et si les interactions sont de type électrostatique alors les QDs aminées (chargées positivement) doivent avoir une forte attraction pour les PMs et donc le meilleur FRET. En effet, si les interactions sont plus fortes, alors la distance bR-QD doit être réduite. Puisque le FRET est dépendant de la distance en $1/r^6$, alors il est naturel que les QDs aminées aient la meilleure

efficience de transfert. Dans nos mesures de PL, c'est bel et bien ce type de QDs qui donnent la meilleure efficience de transfert (70 % Figure 52).

Toutefois, puisque les PMs sont négativement chargées, il devrait y avoir des interactions beaucoup plus faibles avec les QDs cystéinées et PEGylinées (fortement chargées négativement) alors que les efficacités de transfert de ces deux types de QDs sont quand même de 61 % et 48 % respectivement. L'explication de ces résultats pourrait être la suivante : les PMs sont en globalité négativement chargées, cependant, comme le montre la Figure 4, la bR possède plusieurs lysines accessibles possédant des groupes amines primaires. Ces amines primaires peuvent alors interagir avec les QDs négativement chargées. De plus, la bR est une pompe à proton et chaque cycle commence par un relargage du proton et se termine par le rechargement d'un nouveau proton. Ceci signifie donc qu'un proton se trouve toujours à l'intérieur de la bR lorsque celle-ci est au repos et ce proton participe à l'attraction des QDs négativement chargées. Cette théorie implique que les interactions entre bR et QDs négatives sont plus faibles que les interactions bR et QDs positives, puisqu'elles doivent passer l'écrantage des charges négatives des lipides pour interagir avec la bR. Les QDs négatives vont donc interagir avec la protéine de la PMs, puisque c'est la seule partie de la membrane qui présente des charges positives.

Les interactions électrostatiques peuvent également expliquer pourquoi les QDs PEG-OH quasiment neutres ne donnent une efficience que de 19 %. Cette efficience si faible serait due à une charge de surface très légèrement négative, ce qui n'entraîne pas de fortes interactions avec les PMs et donc ne provoquent pas réellement de FRET. Deux théories peuvent alors expliquer les faibles efficacités mesurées pour ce type de QDs. La première consiste à penser que bien que les interactions soient faibles les QDs se lient tout de même avec les PMs, mais la distance entre bR et QDs reste grande (plus de 8 nm). La seconde hypothèse est que, puisque les interactions sont très faibles, il peut se produire un phénomène d'adsorption-désorption des QDs à la surface des PMs et que la distance moyenne, mesurée statistiquement grâce aux efficacités de transfert est d'environ 8 nm.

Les particules fortement chargées (positivement ou négativement) réagissent avec la bR de façon plus intense que les particules quasiment neutre (PEG-OH). Cette propriété du transfert d'énergie semble donc nous indiquer que les interactions bR/QD sont de type électrostatique comme nous l'attendions. Cependant, les explications avancées ne sont que des hypothèses et méritent qu'on les vérifie par d'autres méthodes. L'AFM semble être un des moyens permettant de montrer que les interactions sont de type électrostatique au travers de

l'imagerie du complexe formé par la bR et les QDs qui permettra de confirmer ou pas les hypothèses faites via l'organisation des QDs sur la surface.

B. Mise en évidence des interactions par AFM

Comme nous l'avons vu, l'AFM est un outil de caractérisation très utilisé en biologie et sur des échantillons mous en milieu liquide. C'est tout à fait naturellement que nous l'avons utilisé pour imager le complexe bR/QD qui devait se former.

L'imagerie en liquide nous a permis de conserver la bR dans son état hydraté et permet également d'avoir un système comparable à celui observé lors des mesures de PL. La principale différence entre ces deux types de mesures réside dans le fait que les bRs sont déposées sur un substrat, alors que lors des mesures de PL elles sont libres en solution.

Les PMs sont déposées sur du mica, puis les QDs sont ajoutées progressivement. Une fois l'échantillon convenablement rincé, l'imagerie en mode tapping est effectuée. La bR seule a été imagée dans les deux modes, alors que les images de bR avec des QDs n'ont été réalisées qu'en mode tapping, puisque les risques de dégradation de l'échantillon et de déplacement par la pointe étaient trop élevés.

La Figure 53 présente des images obtenues avec des QDs solubilisées à la cystéine. Les images obtenues sont identiques pour les QDs PEG-COOH qui possèdent le même potentiel de surface.

Les images obtenues avec des QDs cystéinées ou couvertes par des PEG-COOH sont identiques. Les QDs se déposent préférentiellement sur le mica, plutôt que sur les PMs. Les interactions sont trop faibles entre QDs et bR, ce qui implique que les QDs viennent s'agréger à la surface du mica qui est moins négative que les PMs. Les images a) et b) de la Figure 53 nous montrent une vue d'ensemble de l'échantillon. Ces images sont respectivement de 10 et 5 μm de large, ce qui est suffisant pour voir que les QDs sont majoritairement déposées sur le mica. Les images c) et d) de cette même figure nous montrent de façon plus précise la même chose car l'image c) est une image topographique d'une zone plus petite, permettant de mieux discerner les PMs et leur surface bien lisse. L'image c) est une image de topographie avec l'image de contraste de phase associée d). Cette image permet de montrer, grâce au signal de phase, que l'échantillon possède bien deux zones aux propriétés mécaniques distinctes et donc que les QDs ne sont déposées que sur le mica. Sur cette image les parties claires sont les PMs et les parties sombres les QDs déposées sur le mica. On aperçoit également en haut de l'image le signal du mica, aux endroits où il n'est pas complètement couvert.

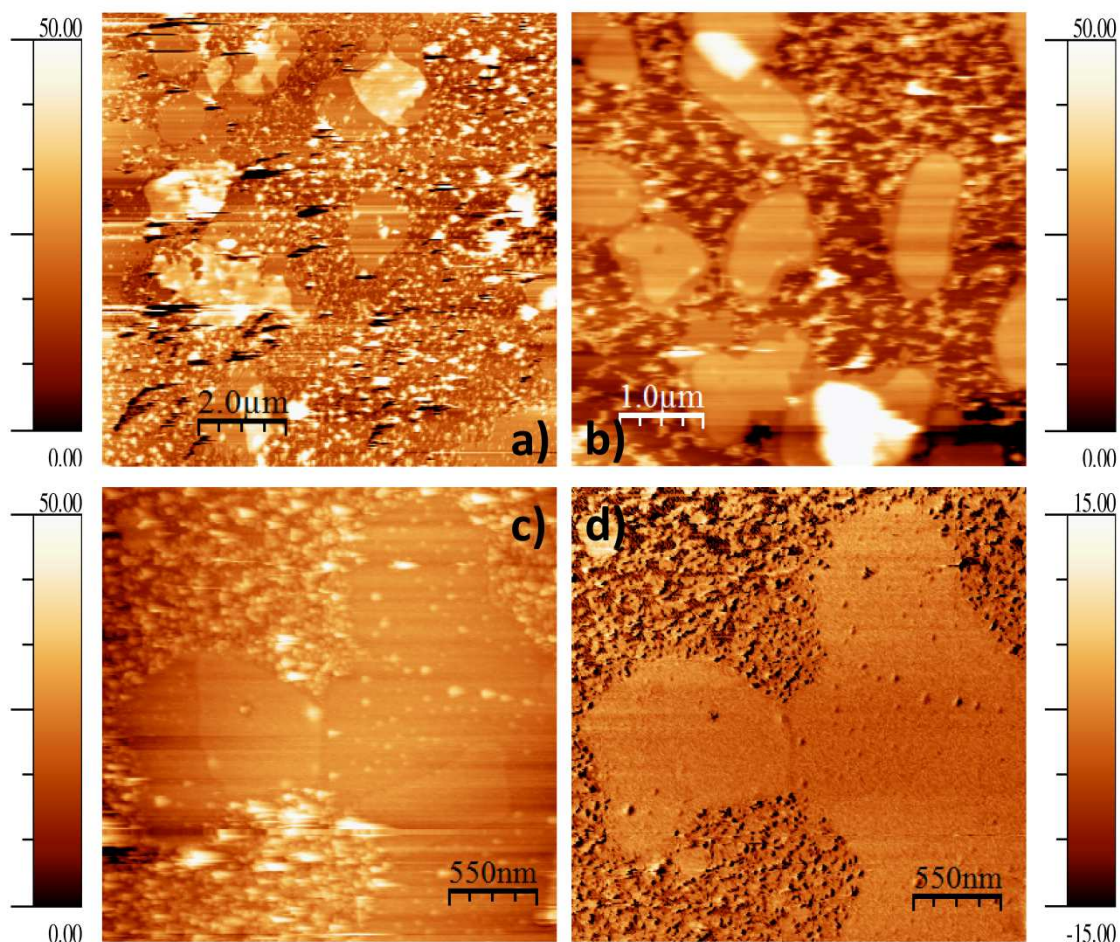


Figure 53 : Images topographiques (a, b, c) et de phase (d) de PMs et de QDs cystéinées. Les images a) et b) montrent que la quasi-totalité des QDs sont déposées à la surface du mica et non à la surface des PMs. Les interactions PMs QDs sont plus faibles que les interactions QDs mica. Les images c) et d) sont respectivement une image topographique et une image de contraste de phase de la même zone. Elles montrent bien que très peu de QDs sont à la surface des PMs. Les échelles de hauteur sont en nanomètres (a, b, c) et en degrés (d).

Ces images montrent bien que les interactions BR/QDs sont faibles, simplement parce que les QDs viennent préférentiellement s'agréger sur le mica plutôt que s'épitaxier à la surface des PMs. Le mica est également négativement chargé (comme les PMs et les QDs) mais sa charge de surface est moins électronégative que celle des PMs, ce qui induit un dépôt préférentiel des QDs sur le substrat. Pour les QDs dont la charge est très faible, comme c'est le cas pour les QDs PEG-OH qui sont faiblement électronégatives ou quasiment neutres, les images sont présentées en Figure 53.

Quand on dépose ces QDs sur un échantillon de PMs, elles viennent se déposer préférentiellement à l'interface PMs-mica, c'est ce que montre l'image a). En effet, sur cette image on ne voit des QDs qu'à l'interface entre PMs et mica. En zoomant, on obtient les

images b) et d) confirmant cette tendance. L'image de contraste de phase (Figure 54 c) montre bien une différence de signal sur les interfaces PM-mica. Cette différence de phase assez importante ne peut être due qu'à la présence de QDs à l'interface. De plus, ce signal est corrélé à une forte variation de hauteur sur l'image b).

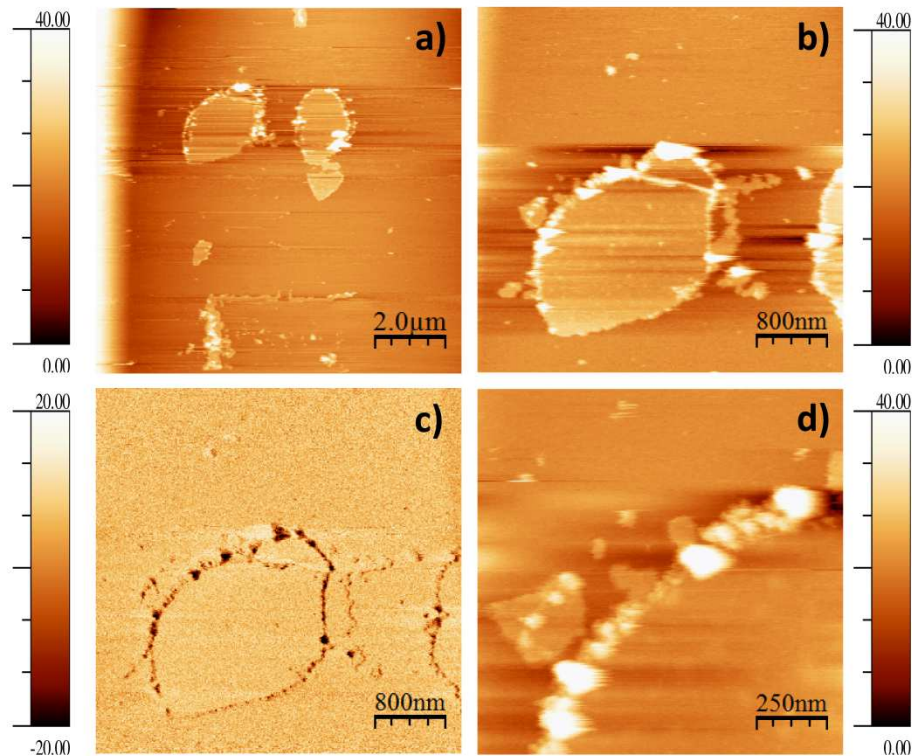


Figure 54 : Images AFM de type topographique (a, b, d) et de contraste de phase (c). Ces images montrent clairement que les QDs sont agrégées sur le bord de la membrane, à l'interface avec le mica.

Ceci nous amène donc à penser qu'il ne semble pas y avoir d'interactions préférentielles avec le mica, puisqu'aucune des QDs ne s'y trouve. De même, il ne semble pas y avoir non plus d'interactions avec les PMs puisque rien n'est visible à la surface des membranes. Les QDs s'agrègent à l'interface des deux. La charge de surface faible des QDs PEG-OH ne leur permet pas de se lier électrostatiquement avec l'un ou l'autre. Ces images permettent également de démontrer que l'hypothèse d'interaction électrostatique est la bonne, puisque leur faible charge de surface ne leur permet pas de se lier de façon forte avec les PMs ou avec le substrat. Cependant, ces images ne permettent pas de trancher entre les deux hypothèses émises précédemment concernant la faible valeur de l'efficacité de transfert. En effet, comme les images ne montrent que des agrégats de QDs entre les PMs et le mica et non des QDs à la surface des PMs, on ne peut savoir si les QDs sont prises dans un phénomène d'adsorption-désorption, ou si elles sont déplacées lors du rinçage de l'échantillon.

Si les QDs négatives se déposent sur le mica et que les QDs neutres se déposent à l'interface PM-mica, qu'en est-il des QDs positives ? Les résultats obtenus pour le même type d'expérience avec des QDs aminées (cystéamine) sont présentés sur la Figure 55.

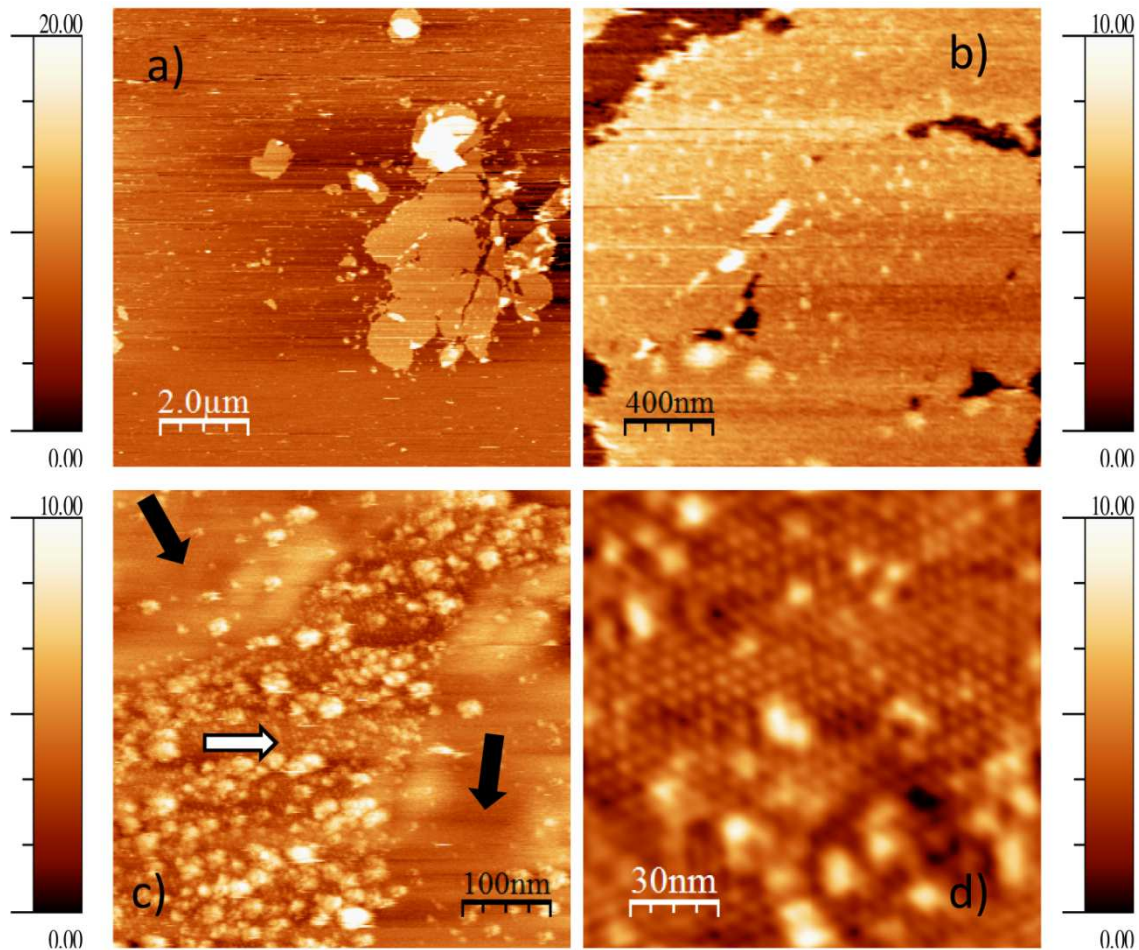


Figure 55 : Images topographiques AFM de PMs en présence de QDs aminées. L'image a) de 10 μm de large montre une vue d'ensemble de l'échantillon. Les QDs ne semblent pas être déposées sur le mica. En zoomant sur les membranes, on distingue des agrégats à leur surface (cas des images b) et c)). L'image b) fait 2 μm de large et présente un échantillon sur lequel la concentration en QDs est faible. Très peu de QDs sont déposées sur les membranes. Sur l'image c) (de 500 nm de large) on distingue trois zones. Les zones définies par les flèches noires sont la surface du mica. La zone définie par la flèche blanche est une zone complètement recouverte par les QDs. De nombreux agrégats sont visibles, la concentration en QDs étant très élevée. En zoomant dans cette zone, on obtient l'image d) (traitée par transformée de Fourier).

Sur cette figure, l'image a) nous montre une large zone (10 μm) dans laquelle on distingue des PMs. Il ne semble pas y avoir de QDs déposées sur le mica. En zoomant sur cette PM, on distingue clairement de petits agrégats. C'est l'image b). Ces agrégats sont le

signe que les QDs se déposent préférentiellement sur les PMs et non sur le mica. Cependant, le nombre de QDs à la surface des PMs reste faible.

En augmentant la concentration, on peut alors obtenir l'image c). Sur cette image, on voit la surface d'une PM. Les deux zones représentées par les flèches noires montrent la surface du mica avec quasiment aucune QDs présente. La flèche blanche indique une zone où les QDs sont déposées sur la bR. Sur l'ensemble de la surface de l'échantillon, les autres membranes sont totalement recouvertes par les QDs. En zoomant encore sur les PMS dans la zone où les QDs sont déposées, on s'aperçoit que les QDs semblent alignées. Même si des agrégats subsistent sur l'image, les QDs individualisées se sont déposées de façon organisée. Elles sont quasi-épitaxiées à la surface de la PM. Elles semblent respecter un réseau hexagonal, qui n'est pas sans rappeler celui de la bR. Pour s'en assurer nous avons comparé ces deux réseaux.

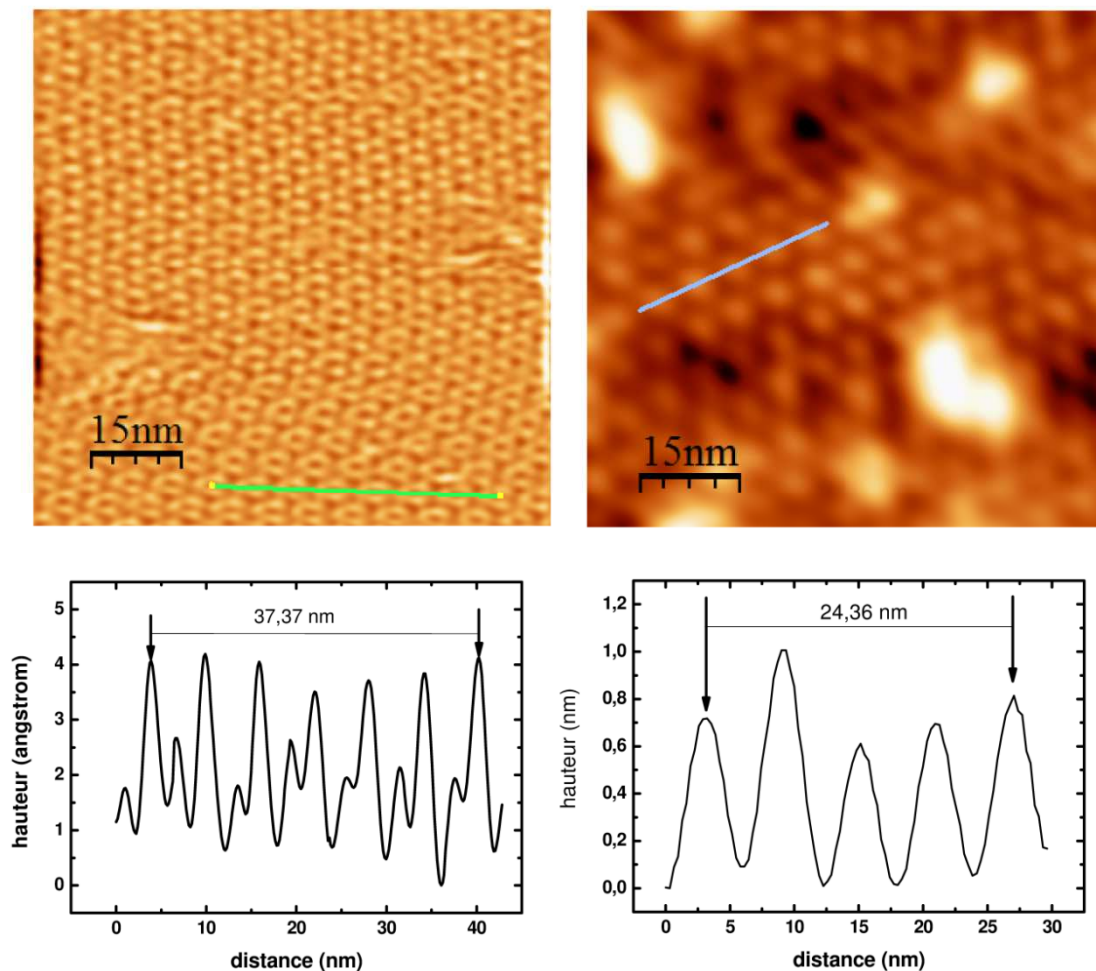


Figure 56 : Images AFM et profils associés, comparant les réseaux de bR et de QDs. L'image de gauche est l'image de bR alors que celle de droite est l'image des QDs quasi-épitaxiées sur une PM. Le réseau de bR a pour paramètre de maille 6,2 nm alors que celui des QDs est de 6,09 nm. Ils sont quasiment identiques.

La Figure 56 nous montre l'image AFM de la bR et celle des QDs quasiment épitaxiés à la surface d'une PM. On y trouve également les profils associés à ces images permettant de mesurer les paramètres de maille des deux réseaux. Pour la bR, on a sur le profil une distance de 37,37 nm pour 6 trimères. Ceci nous amène à un paramètre de maille de 6,23 nm, ce qui est conforme à la bibliographie. Pour les QDs, une distance de 24,36 nm est mesurée pour 4 périodes, soit un paramètre de maille de 6,09 nm. Les deux réseaux étant de la même forme (hexagonal) et ayant des paramètres de maille identiques (aux incertitudes de mesures près), on peut dire que les QDs respectent le réseau de bR.

Les QDs aminées sont les QDs qui montrent la plus grande efficacité de transfert d'énergie. Elles sont également les seules à montrer une organisation similaire à celle de la bR dans les PMs. Ce résultat est cohérent avec ce que nous avons observé dans les différents résultats de diminution de l'intensité de PL et le fait que les forces électrostatiques entre bR et QDs aminées sont les plus importantes.

En résumé, la variation d'efficacité du FRET en fonction de la charge de surface des QDs corrélée aux images AFM du complexe montre bien que les interactions bR/QD sont de type électrostatique. Les PMs étant négativement chargées, les QDs qui ont la plus grande efficacité sont des QDs positivement chargés. Les QDs PEG-OH quasiment neutre électriquement ne présentent pas de réelles interactions avec les PMs et ont donc une très faible efficacité de FRET. Finalement, les QDs fortement négativement chargés que sont les QDs cystéinées et les QDs PEG-COOH interagissent faiblement avec la surface puisqu'elles doivent d'abord lutter contre les fortes charges négatives de la surface des PMs avant de pouvoir interagir avec les charges positives des protéines. Ceci apparaît très clairement sur les images AFM où les QDs se déposent sur le substrat qui est moins électronégatif que les PMs. Les interactions électrostatiques expliquent donc bien les résultats obtenus par PL et par AFM.

Une fois ces observations qualitatives faites, nous avons ensuite essayé de voir si les valeurs obtenues pour la différence d'efficacité (9%) entre les QDs cystéinées et les QDs aminées était cohérente avec le modèle du FRET.

C. Influence du pH sur le FRET

Dans un premier temps, nous avons attribué aux interactions électrostatiques les différences d'efficacité entre QDs aminées et QDs cystéinées. La différence d'efficacité de FRET est d'environ 10 % ce qui correspond dans notre modèle à une variation de distance D-

A de 0,34 nm (voir Figure 57) qui pourrait s'expliquer par une force électrostatique plus importante dans le cas des QDs aminées. Néanmoins, en comparant les deux systèmes QDs aminées et cystéinées, un autre paramètre peut également avoir une influence sur les résultats observés, le pH des solutions, dont nous n'avons pas tenu compte jusqu'alors car il était identique mais qui diffère fortement pour les couples QDs aminées et cystéinées. Nous avons donc essayé de voir si celui-ci pourrait avoir une influence sur les résultats d'efficacité.

ligands de surface	diamètre hydro-dynamique (nm)	Rendement Quantique (QY)	Rayon de Förster (nm)	Efficiéce de transfert d'énergie mesurée	distance calculée grâce à l'efficiéce
Cystéamine	7 ± 2	0,1	4,68	70%	4,88
Cystéine	7 ± 2	0,1	4,68	61%	5,22

Figure 57 : Tableau donnant les efficiéces de FRET des QDs cystéaminées et cystéinées ainsi que les distances associées à ces transferts.

Pour les QDs aminées le pH est acide alors qu'il est basique pour les QDs solubilisées à l'aide de la cystéine. Le problème pour pouvoir regarder l'influence du pH à paramètre constant par ailleurs (où s'affranchir du pH) est qu'il n'est pas possible de préparer les QDs aminées et cystéinées dans une solution ayant le même pH sans qu'elles ne s'agrègent, les gammes de pH dans lesquelles les deux types de QDs sont solubles ne se chevauchant pas. Afin de regarder uniquement l'influence du pH, nous avons utilisé des QDs PEG-OH qui elles sont stables à tout pH et permettent ainsi de vérifier l'impact de ce dernier sur le FRET entre QDs et bR.

Les résultats sont présentés sur la Figure 58. A pH acide, le FRET semble être maximal, alors qu'à pH neutre il est minimal et qu'à pH basique il est entre les deux. Cette différence pourrait expliquer pourquoi les QDs cystéinées et les QDs aminées ne présentent pas la même efficacité de FRET malgré des tailles de QDs similaires. Cependant, même si l'expérimentation montre que le pH joue un rôle prépondérant dans les efficiéces de FRET, encore faut-il trouver une explication physique à ce phénomène.

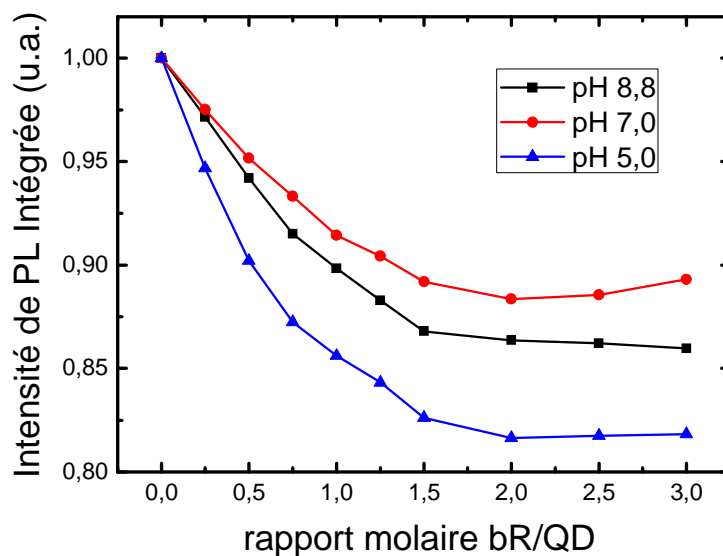


Figure 58 : Courbe représentant la PL de QDs PEG-OH en fonction du rapport molaire bR/QD . Le pH de la solution est de 5,0 pour la courbe bleue, 7,0 pour la courbe rouge et 8,8 pour la courbe noire.

La première explication que nous avons envisagée est l'influence de la pompe à proton sur le FRET. En effet, à pH basique les protons sont plus rares et la pompe est peut-être ralentie par ce phénomène, d'où une moins grande absorption d'énergie par le rétinol. Dans le même temps, à pH acide, les protons étant très nombreux, la pompe devrait mieux fonctionner et donc l'efficacité du FRET devrait être meilleure. Or, notre expérience montre que le FRET est meilleur à pH basique qu'à pH neutre où les protons sont moins rares. Cette explication ne peut être la véritable raison de ces différences d'efficacité.

La seconde explication provient de la référence [172]. En effet, il a été montré notamment par AFM que le pH de la solution influençait l'épaisseur des bicouches lipidiques et donc l'épaisseur des PMs. Le rétinol étant situé au milieu des PMs, alors la distance bR/QD augmente si la bicouche est plus large. La Figure 59 montre qu'à pH acide les PMs sont les moins épaisses (5,25 nm), alors qu'à pH neutre elles atteignent leur maximum (5,75 nm). A pH 8,8 comme lors de notre expérience leur hauteur est de 5,5 nm. Il y a donc une parfaite corrélation entre les hauteurs des PMs mesurées par AFM et le FRET observé avec les QDs PEG-OH. En effet, à pH 5 les PMs ont une hauteur de 5,25 nm environ pour un FRET de 19 %, alors qu'à pH 8,8 leur hauteur est de 5,5 nm pour un FRET de seulement 14 %. On peut donc penser que la meilleure efficacité de FRET des QDs aminées par rapport aux QDs cystéinées s'explique en plus également par le fait que les PMs sont moins épaisses en milieu

acide qu'en milieu basique, effet qui vient s'ajouter à celui de la charge surfacique et permet d'expliquer la différence observée pour l'efficacité du FRET. Néanmoins, le nombre de paramètre important jouant sur le FRET pour les interactions électrostatiques rend la modélisation compliquée.

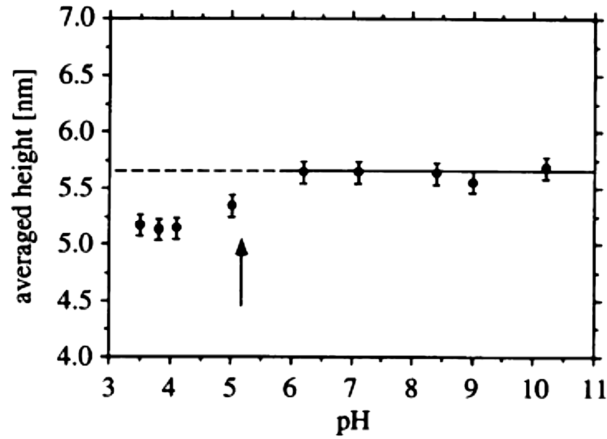


Figure 59 : Courbe représentant la hauteur des PMs mesurée par AFM en fonction du pH.

[172]

D. Synthèse des résultats expérimentaux

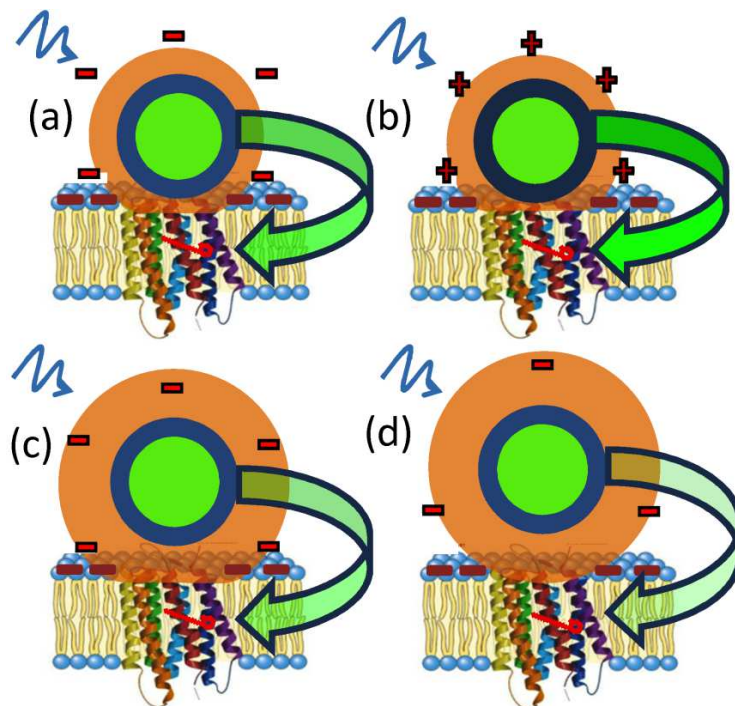


Figure 60 : Schéma montrant les interactions électrostatiques et le FRET associés à chaque type de QDs utilisées. Le a) représente les QDs cystéinées, le b) les QDs aminées, le c) les QDs PEG-COOH, et le d) les QDs PEG-OH. Les flèches indiquent le FRET, et leur couleur l'intensité de ce dernier. Les + et - indiquent les charges de surface.

La Figure 60 résume bien l'ensemble des informations présentées dans les paragraphes précédents. En effet, sur cette figure la couleur des flèches épaisses représente l'efficacité du FRET mesuré. Les charges sont représentées par des signes + ou -. Les ligands organiques sont en orange et le cœur et la coquille en vert et bleu. La partie a) de cette figure représente le cas des QDs cystéinées, la partie b) les QDs aminées, la partie c) les QDs PEG-COOH et la partie d) les PEG-OH.

Cette figure montre qu'avec les QDs aminées (b) le FRET est maximal. Ces particules profitent également du fait qu'elles ne sont solubles qu'à pH acide et que c'est à ces pH que la bicouche lipidique est la moins épaisse. Cela explique en partie pourquoi elles présentent le meilleur FRET. Il est bon de noter qu'elles ont un petit ligand de surface et que les interactions électrostatiques entre PMs et QDs sont maximales avec ce type de QDs. Nous avons également montré par AFM que ces QDs étaient capables de s'épitaxier à la surface des PMs respectant le réseau de bR.

La partie a) traite des QDs cystéinées. Elles montrent un FRET quasi-similaire à celui des QDs aminées. Cette faible différence s'explique grâce à une taille de ligands similaire à la taille de la cystéamine. Cependant, elles ne sont solubles qu'à pH basique, domaine dans lequel les bicouches lipidiques sont assez épaisses, ce qui augmente la distance bR/QD. Les interactions électrostatiques sont faibles mais suffisantes en liquide pour former un complexe bR/QD qui n'est pas visible à l'AFM puisque le substrat est moins électronégatif que les PMs. Leur charge de surface est de même signe que celle des PMs mais les lysines de la bR, présentant des amines primaires, permettent tout de même des interactions avec la bR. L'avantage de ces QDs est qu'elles s'attachent forcément aux protéines puisqu'elles sont les seules molécules positivement chargées dans les PMs.

La partie c) représente les QDs PEG-COOH. Elles ont un potentiel de surface similaire à celui des QDs cystéinées, ce qui explique que les efficacités du FRET des deux types de QDs soient si proches. La principale raison de cette différence est la taille du PEG qui est nettement supérieure à celle de la cystéine. Cependant, pour des raisons d'encombrement stérique le PEG peut se déformer au contact de la membrane et donc, partiellement compenser la plus grande distance bR/QD. De plus, du fait de cette plus grande taille le QY est plus élevé pour ce type de particules puisqu'elles sont mieux protégées des interactions avec le milieu.

La partie d) représente les QDs PEG-OH qui sont de grande taille et qui ne permettent pas d'avoir un bon FRET avec la bR dû à des interactions trop faibles. En effet, leur charge de surface est très légèrement négative ce qui ne suffit pas à s'approcher

suffisamment de la bR et donc à écranter la charge négative moyenne des PMs. De plus, vu que les interactions sont faibles le PEG n'est pas déformé à la surface de la PM, ce qui implique que la distance bR/QD reste importante.

E. Discussion des résultats / Comparaison entre r_{min} et distance associée au FRET

L'un des paramètres important dans la modélisation du FRET est le terme représentant l'orientation des dipôles : κ^2 . Ce terme peut prendre des valeurs entre 0 et 4. Dans notre cas, les protéines sont incorporées à une membrane et leurs dipôles sont donc également bloqués dans la membrane. Les dipôles des bR sont fixes et seule l'orientation des dipôles des QDs est aléatoire. Dans ces conditions, κ^2 prend pour valeur 5/6. Pour information, dans le cas d'une orientation aléatoire des deux dipôles, il prend pour valeur 2/3 [139].

Nous accepterons également que les QY pour les QDs solubilisées à la cystéine ou la cystéamine sont de 10% et de 20% pour les QDs PEGynilées. Ces valeurs sont les valeurs moyennes pour chaque type de solubilisation. De même, la théorie du FRET nécessite la connaissance des coefficients d'extinction molaire de la bR à toutes les longueurs d'onde. Celui à 568 nm est parfaitement connu et vaut $63000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A l'aide d'un spectre d'absorption de la protéine, les valeurs avoisinantes ont pu être calculées, en restant dans le domaine proche de cette valeur. De même, l'indice de réfraction du milieu sera pris à 1,33, indice de réfraction de l'eau. Le tableau suivant récapitule les principales propriétés des QDs utilisées dans cette étude, ainsi que tous les paramètres nécessaires au calcul de la distance D-A dans notre système bR-QD. On y trouve également les valeurs de r_{min} ainsi que l'efficacité du transfert mesurée expérimentalement pour chaque type de particules.

ligands de surface	diamètre hydro-dynamique (nm)	QY	Rayon de Förster (nm)	pH	Epaisseur des PMs (nm)	Efficacité de transfert d'énergie mesurée	distance minimum QD-bR théorique r_{min} (nm)	distance calculée grâce à l'efficacité (nm)
Cystéamine	7 ± 2	0,1	4,68	5,0	5,25	70%	5,82	4,88
Cystéine	7 ± 2	0,1	4,68	8,8	5,5	61%	5,94	5,22
PEG-COOH	9 ± 2	0,2	5,52	8,8	5,5	48%	7,61	6,72
PEG-OH	9 ± 2	0,2	5,52	5,0	5,25	19%	7,49	8,44

Figure 61 : Tableau récapitulant les propriétés des QDs utilisées, les efficacités de transfert mesurées ainsi que les r_{min} et les distance calculée grâce à l'efficacité de transfert.

Ce tableau nous donne tous les paramètres nécessaires pour calculer les r_{min} ainsi que les distances bR-QD lorsque les QDs sont mises en contact avec la bR. On remarque que les distances bR-QD minimales calculées à partir de simple considérations géométriques sont légèrement plus grandes que les distances associées aux efficacités de transfert mesurées hormis pour les QDs PEG-OH. Elles restent toutefois dans le même ordre de grandeur. Ainsi pour les QDs aminées r_{min} est de 5,82 nm, alors que la distance bR-QD associée à une efficacité de transfert de 70 % est de seulement 4,88 nm. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Dans un premier temps, les hauteurs de PMs données le sont à partir de mesures AFM donnant des valeurs moyennes de la hauteur de la membrane. Or cette valeur étant moyenne elle ne tient pas compte de la rugosité des PMs et du fait que les hélices de la bR dépassent de la bicouche lipidique. La zone de contact entre les QDs et les bRs peut alors se situer quelques angströms plus à l'intérieur de la membrane que ce que nous montrent ces valeurs AFM. Ces valeurs AFM donnent alors une légère incertitude à la distance bR-QD. De même le rétinol ne se trouve pas réellement au milieu de la membrane et donc la distance bR-QD est encore légèrement faussée.

En outre, notre calcul de r_{min} ne tient pas compte de la possibilité des QDs de pénétrer partiellement la membrane et donc de réduire la distance apparente bR-QD. Si la QD pénètre de quelques angströms la bicouche lipidique alors la distance D-A est diminuée. De même, r_{min} est basé sur le fait que la QD se situe au cœur du trimère et donc que la distance est la même entre la QD et tous les accepteurs. Cette hypothèse ne peut être vérifiée. En effet, même si la Figure 56 nous montre clairement que les QDs respectent le réseau hexagonal de la bR, il semble impossible de savoir où se situe réellement la QD par rapport aux bRs. En effet, on peut émettre, comme nous l'avons fait, l'hypothèse que la QD se situe au centre du trimère de bR, mais on peut également envisager qu'elle soit directement fixée sur une seule bR. Ceci aurait pour effet de réduire fortement la distance D-A pour une des protéines, mais de l'augmenter assez fortement pour les autres. Il y aurait alors un FRET très fort dû à la présence d'un accepteur très proche du donneur, mais également une participation beaucoup plus faible des protéines considérées comme des seconds voisins. Cette indétermination sur la position exacte des QDs sur le réseau de bR induit donc une incertitude sur la valeur du r_{min} que nous avons calculée. Cependant, il semble important de noter que le respect du réseau de bR par les QDs nous donne tout de même accès au nombre exact d'accepteurs par donneur qui est de trois.

Nous avons vu également que la théorie du FRET considère les donneurs comme les accepteurs comme des points alors que les QDs ont un certain volume. Cette considération donne également une incertitude sur la distance D-A de notre système. En effet, les excitons créés proches de la surface de la bR auront une probabilité de transfert plus élevée que ceux générés loin du rétinale. La distance D-A étant élevée à la puissance six dans l'expression du FRET, cette incertitude peut apporter une indétermination de l'ordre du nanomètre sur la distance bR-QD. Elle peut en partie expliquer cette différence entre r_{min} géométriquement calculé et la distance apparente calculée grâce aux efficacités de transfert.

Il existe encore d'autres paramètres pouvant expliquer cette différence de l'ordre du nanomètre entre r_{min} et les distances apparentes. L'orientation des dipôles est supposée aléatoire pour les QDs puisqu'elles sont assimilées à des petites sphères. Cependant, il y a une petite anisotropie de forme sur ces particules [93] et elle pourrait être responsable d'une orientation prioritaire au moment de l'adsorption des QDs à la surface des PMs. Cette anisotropie peut en effet engendrer des disparités de charge à la surface des QDs, due à une meilleure couverture de la QDs par les ligands suivant certains axes de la QD. Dans ce cas, la répartition des dipôles ne seraient plus réellement aléatoire mais contrôlée par les interactions électrostatiques entre QDs et bR.

De même, la théorie du FRET utilisée ici pour représenter les multiples accepteurs fonctionne très bien sur des QDs auxquelles on a greffé des accepteurs libres en solution [160,161,169]. Ainsi, la répartition de ces accepteurs autour de la QD est aléatoire et les interactions entre accepteurs sont faibles, voire nulle. Dans notre cas, les accepteurs ne sont pas libres les uns par rapport aux autres, puisque les bRs sont confinées dans un réseau hexagonal deux dimensions très serré à l'intérieur d'une membrane. La répartition des accepteurs n'est donc pas aléatoire et les interactions excitoniques entre les différents rétinals sont très fortes. Ceci est notamment visible sur le spectre de dichroïsme circulaire de la bR dans le domaine d'absorption du rétinale [152]. On peut donc émettre l'hypothèse que ces interactions excitoniques fortes entraînent un effet sur le FRET entre la QD et les bRs fortement liées les unes aux autres à l'intérieur d'un trimère, puisque le FRET est basé sur une interaction dipôle-dipôle.

Un dernier paramètre, le QY, pourrait également être une source d'erreur dans notre modélisation, mais il est difficilement contrôlable. Malgré la grande qualité des QDs utilisés dans cette étude (les QY pouvant parfois atteindre 85% dans le chloroforme), il a été montré qu'après plusieurs heures d'excitation sous UV la PL des QDs augmente [173]. Cette augmentation de PL se traduit donc par une augmentation du rendement quantique des

particules. Or nos expériences de mesure de PL durent parfois plusieurs heures et donc l'augmentation de la PL des QDs ne peut réellement être maîtrisée. Le rendement quantique étant l'un des paramètres nécessaires au calcul du rayon de Förster, une indétermination sur ce dernier provoque une indétermination sur la valeur de R_o . Puisqu'il est un des facteurs importants du calcul de la distance D-A, une incertitude sur le rayon de Förster a de grosses répercussions sur l'étude de notre système.

F. Problème de l'homo-FRET

D'après le principe de fonctionnement du composant, les QDs seraient organisées selon le réseau hexagonal de la bR. La Figure 55 montre que cette organisation est possible et que le principe de base du composant est atteignable. En effet, s'il n'est pas possible de déposer une QD par trimère de bR de façon simple alors le composant ne peut fonctionner et surtout ne peut être utilisé à grande échelle. Les QDs sont organisées en réseau hexagonal mais ce réseau est-il identique à celui de la bR.

Les profils tirés des images confirment que les QDs respectent le réseau hexagonal de la bR. En effet, dans le réseau de bR, le paramètre de maille est de 6,22 nm. Il a été mesuré expérimentalement à l'aide des profils de l'image AFM de la Figure 56. De même, nous avons mesuré le paramètre de maille du réseau hexagonal des QDs. Il est de 6,09 nm. Aux incertitudes de mesures de l'AFM près, ce paramètre de maille est identique à celui de la bR. Les QDs sont donc épitaxiées directement sur les PMs de façon simple.

Cependant, notre composant fonctionnant sur l'idée de FRET et d'émission ou non de photons par les QDs, un des paramètres de notre système n'a pas encore été étudié. Ce paramètre est l'homo-FRET. Dans tous les paragraphes précédents, nous étudions un FRET entre un accepteur et un donneur différent, ici nous nous intéressons au FRET pouvant exister entre deux QDs identiques. En effet, des erreurs peuvent se produire si le FRET se produit entre une QD et sa voisine. L'émission de photons de la première QD pourrait alors se produire depuis la seconde et donc une erreur se serait produite puisque par FRET la première QD n'aurait pas émis de photons alors qu'elle aurait dû, et la seconde QD émettrait alors qu'elle n'aurait pas dû.

Il est donc primordial de connaître le taux d'erreur possible si les QDs sont espacées de 6,2 nm. On prendra pour ce calcul des QDs émettant à 570 nm, avec un QY de 0,1, l'indice du milieu sera pris à 1,33 (eau) et κ^2 sera de 2/3 puisqu'il correspond à une orientation aléatoire des dipôles l'un par rapport à l'autre. Dans ces conditions et vu les caractéristiques

optiques de nos QDs, J serait de $1,29 \times 10^{16} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$. Le rayon de Förster est de 5,38 nm. L'efficacité de transfert pour une distance de 6,22 nm est de 29,4 %. Ceci implique que le FRET entre deux QDs peut avoir lieu 30 fois sur 100 et donc le risque de créer des erreurs et du même niveau. Pour que ce taux d'erreur diminue jusqu'à 1/1000, il faut que la distance entre deux QDs soit augmentée jusqu'à 17 nm.

Cependant, ces calculs ne tiennent compte que de la présence de deux QDs séparées par une distance fixe et dont les dipôles sont orientés aléatoirement. Ils ne tiennent pas compte de la présence d'accepteurs multiples que peuvent être les bR ou les six premières QDs voisines. Nul doute que ces paramètres influenceront le taux d'erreur de notre système. Néanmoins, ce petit calcul simple indique bien qu'un risque de transfert QD à QD est possible dans notre composant et donc que des erreurs peuvent se produire.

G. Conclusion

D'un point de vue général, il est maintenant clair que les interactions responsables ou non de la formation du complexe bR/QD avec ce type de complexes sont de type électrostatique. En utilisant la bonne charge surfacique et les bons paramètres expérimentaux, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir une extinction de l'émission des QDs de l'ordre de 70% ce qui valide le concept pour la fabrication d'un nanomatériau hybride QDs/bR pour des applications en commutation optique. En revanche, l'utilisation des interactions électrostatiques pour coupler QDs et bR représente donc une limitation dans le but de créer un composant car de nombreux paramètres entrent en compte (variation de la charge, pH, ligands, faible couplage électrostatique...) et rendent difficile la mise au point systématique et reproductible des composants. Une optimisation de ces interactions est donc indispensable si nous voulons atteindre l'objectif à long terme qu'est la création d'un démonstrateur. C'est dans ce sens que nous avons cherché à stabiliser le couplage entre QDs et bR en liant de façon covalente bR et QDs.

III. Renforcement des interactions bR/QD

Comme nous venons de le voir, les interactions bR/QD sont de type électrostatique. L'intensité de ce type d'interaction est assez faible et le renforcement de la stabilité des liaisons QDs/bR semble nécessaire au développement de notre composant. Cependant, peu de choix s'offrent à nous pour l'optimisation de ce complexe. La solution la plus évidente est de renforcer la liaison et donc d'en venir à une liaison plus forte se rapprochant d'une liaison covalente : une solution peut être par exemple d'utiliser de la biotine et de la streptavidine qui ont une forte affinité.

En effet, la biotine est une co-enzyme (partie d'une enzyme organique mais non protéique), qui a la particularité de se lier fortement avec la protéine streptavidine. La constante de dissociation de cette liaison est de 10^{-14} à 10^{-16} M [174]. Elles sont énormément utilisées en biologie pour réaliser des marquages spécifiques. C'est donc naturellement que ce couple a été utilisé pour renforcer les liaisons bR/QD.

Dans un premier temps, il a donc fallu biotiner les bRs et streptavidiner les QDs, travail effectué grâce au Dr Alyona Sukhanova, ingénieur au laboratoire. Les QDs streptavidinés sont à la base des QDs PEGyNILÉES COOH ou OH et il est connu que la chimie carbodiimide permet de leur lier plusieurs streptavidines par QDs. D'un autre côté, des kits de biotinylation sont vendus (Pierce) et permettent d'attacher des biotines aux lysines accessibles. Si on regarde la Figure 4 page 13 de ce manuscrit, on se rend compte qu'il y a plusieurs lysines accessibles. Il a été montré que dans le cas de la bR à l'intérieur des PMs, la biotinylation se faisait des deux côtés, via les lysines 129 et 159 [175]. De plus, la protéine conserve sa fonctionnalité après biotinylation.

Les biotines utilisées (au nombre de trois) étaient des Sulfo-NHS biotine. Le groupe Sulfo permet la solubilité dans l'eau, alors que le NHS permet la liaison aux amines primaires. Il est responsable de la liaison avec les lysines. En plus de ces deux groupes, nos biotines avaient également un groupe dit LC, qui est en fait un bras espaceur. Ce bras a une longueur d'environ 1 nm et un des intérêts de son utilisation dans le cadre d'un éventuel effet FRET est qu'on peut jouer sur la longueur de ce bras et donc de l'efficacité du FRET. Les biotines utilisées avaient donc des espaceurs de 13,5 Å (notée biotine dans la suite du document), 22,5 Å (notée Biotine LC) et 30,5 Å (notée Biotine LCLC). La biotine est représentée sur la Figure 62.

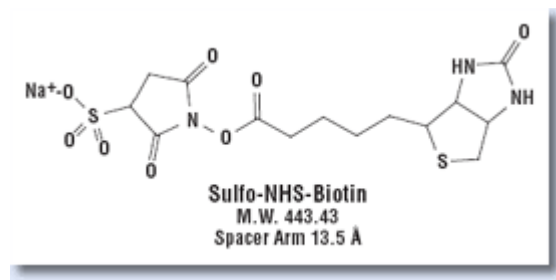


Figure 62 : Représentation de la Sulfo-NHS biotine.

Les QDs streptavidinés et la bR biotinilée avec différentes longueurs de bras ont été mélangées de la même façon que précédemment pour réaliser des mesures de PL. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la Figure 63.

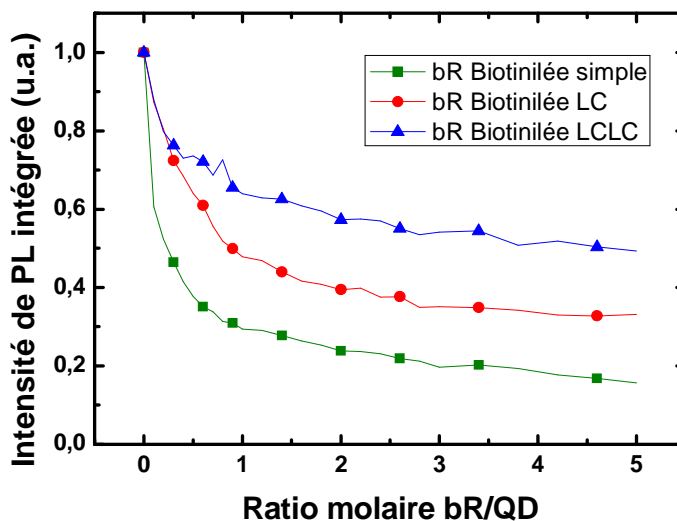


Figure 63 : Courbe représentant l'intensité de PL de QDs streptavidinés en fonction du rapport bR/QD. La courbe verte représente la biotine simple, la rouge la biotine LC et la bleue la biotine LCLC.

La PL des QDs streptavidinés couplés à la bR biotinilée avec la biotine simple (bras le plus court) décroît de plus de 82 % ce qui représente une amélioration de 12% par rapport à ce que nous avons obtenu avec les QDs aminés. Ce résultat très important confirme qu'un transfert d'énergie très efficace a lieu. Ce transfert semble bien cohérent avec un effet FRET puisqu'en faisant augmenter la longueur du bras espaceur, on obtient des diminutions d'intensité plus faible de 63 % (biotinilée LC) et de 50 % (biotinilée LCLC) cohérentes avec une augmentation de la distance D-A (Figure 63). Il semble donc que le FRET soit très important lorsque les QDs et la bR sont couplés de façon quasi-covalente grâce à un couplage par biotine et streptavidine. Ceci représente donc une bonne optimisation

de notre système. On peut se demander si cette baisse d'intensité de PL est bien due à un effet FRET ou à une agrégation des QDs par exemple mais l'utilisation de différentes longueurs de biotines permettent d'écarter cette hypothèse. Effectivement, si la diminution de la PL est due à une agrégation et non à un effet FRET, alors les différentes longueurs de biotine ne devraient rien changer à la diminution de la PL. Or dans notre cas, entre une biotine simple et une biotine LCLC qui mesure deux nanomètres de plus, la différence d'efficacité de transfert est de 30 %. Il y a donc bien un effet de la distance sur le transfert d'énergie. Le FRET étant dépendant de la distance en $1/r^6$ on peut supposer que cette différence d'efficacité est bien due au FRET. De plus, les QDs streptavidinés, sont des QDs très stables, puisque solubilisés à l'aide de très grandes protéines parfaitement solubles. Ces QDs peuvent rester en solution plusieurs mois sans subir aucun dommage, il est alors improbable que la baisse de l'intensité de leur PL soit due à une agrégation.

type de biotine	longueur de biotine (nm)	Efficacité de transfert d'énergie mesurée	distance calculée grâce à l'efficacité (nm)
simple	1,35	82%	5,08
LC	2,25	63%	5,99
LCLC	3,05	50%	6,55

Figure 64 : Tableau récapitulatif des longueurs des différentes biotines utilisées ainsi que les efficacités de transfert mesurées et les distances apparentes calculées grâce à notre modèle théorique.

Cependant, une question importante se pose au vu de cette forte efficacité du fait de la longueur de la liaison biotine-streptavidine qui est de plusieurs nanomètres (5 nm pour la streptavidine, 0,5 nm pour la biotine) [176]. Les résultats obtenus paraissent assez surprenants car la longueur de cette liaison est beaucoup plus importante que les longueurs qu'on avait dans le cadre de QDs fonctionnalisés avec la cystéine ou l'amine qui montraient des efficacités plus faibles. La question se pose alors d'expliquer des efficacités si importantes qui nécessiteraient dans le modèle FRET des distances d'interaction QDs/bR beaucoup plus courtes que ce que l'on a en réalité (voir Figure 64).

Alors, pourquoi la décroissance de PL observée est si importante, puisque la distance D-A est censée être environ dix nanomètres ? On peut émettre plusieurs hypothèses. La streptavidine a la possibilité de se lier à plusieurs biotines. On peut alors supposer qu'une QD serve de « pont » entre différentes zones d'une PM, voire de différentes PMs entre elles. Il pourrait alors y avoir un phénomène d'écrantage des QDs par les PMs lors de la mesure de PL mais dans ce cas, les courbes montreraient alors une saturation très rapide et ce n'est pas le cas.

La seconde solution serait que la streptavidine serait déformée au contact de la membrane. Il est possible, qu'elle s' « étale » à la surface de la PM et donc que la distance bR-QD soit modifiée de cette manière. Encore une fois, ce n'est qu'une hypothèse et rien ne permet d'affirmer que cette hypothèse soit la bonne. Cependant, à la vue des efficacités de transfert affichées par cette série d'échantillons, il semble que cette hypothèse soit vraisemblable.

Un second problème vient de l'indétermination du QY. En effet, les QDs streptavidinés sont réalisés à partir de QDs PEGylinés et leur QY a été supposé identique. Or ces QDs sont nettement plus solubles et plus stables que les QDs PEGylinés et donc, leur QY peut être plus élevé. Cette indétermination sur le QY provoque une indétermination sur le Rayon de Förster, mais elle ne peut expliquer une différence de 4 nm entre la théorie et l'efficacité réellement mesurée.

Le point le plus important pour expliquer cette différence d'efficacité observée est que la liaison biotine/streptavidine est beaucoup plus stable que les liaisons électrostatiques permettant le couplage dans le cas des complexes QDs aminés/bR. Dans ce dernier cas, les liaisons étant faibles, on peut imaginer qu'une simple agitation de la solution ou toute autre perturbation viendra diminuer le nombre de QDs en interaction avec la bR au contraire du couple QDs streptavidinés / bRs biotinilés plus stable.

En conclusion, les efficacités de transfert affichées par cette série d'échantillons sont assez remarquables ; une efficacité de FRET de 80 % est le meilleur résultat obtenu avec notre complexe bR-QD. Le nouveau type de couplage biotine-streptavidine semble être une alternative envisageable pour le développement d'un composant fiable. Bien sûr, d'autres solutions sont encore à l'étude, tel qu'un couplage parfaitement covalent grâce à la chimie carbodiimide. Néanmoins, l'optimisation envisagée ici est réellement positive dans l'optique du développement de notre complexe.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réussi à mettre au point des nanomatériaux hybrides basés sur un transfert d'énergie entre bR et QDs. Les différentes études effectuées montrent que ce transfert semble bien dû à un effet FRET. En effet, tout comme le FRET, le transfert d'énergie observé est dépendant de la longueur d'onde de PL des QDs, donc de l'intégrale de recouvrement J entre les spectres d'absorption de l'accepteur et d'émission du donneur et il est également fortement dépendant de la distance D-A. En outre, nous avons montré que le FRET était dépendant des interactions électrostatiques entre bR et QD. Les QDs aminées, ayant une charge positive opposée à celle des PMs, montrent la meilleure efficacité de transfert alors que les QDs cystéinées ou PEG-COOH, ayant une charge fortement négative, interagissent moins fortement avec les PMs. Cette interaction est néanmoins possible grâce à une disparité de charge à la surface des PMs et à la présence d'amines primaires dans la bR. Au contraire, les QDs PEG-OH quasiment neutres n'ont que très peu d'interactions avec les PMs et montrent une efficacité de FRET très faible.

L'organisation des QDs par rapport aux PMs a été étudiée grâce aux images AFM des PMs en présence de QDs. Les QDs réagissent différemment lors du dépôt sur les membranes en fonction de leur charge surfacique ce qui confirme les interactions électrostatiques. Il est cependant important de noter que les QDs aminées sont les seules à avoir montré un caractère organisé à la surface des PMs. Elles respectent d'ailleurs le réseau de bR. Cependant, le risque de FRET entre QDs est assez important et une étude de ce problème sera nécessaire avant une utilisation de ce système dans un composant.

Nous avons ensuite optimisé notre complexe bR/QD à l'aide de liaison biotine-streptavidine, montrant une efficacité de transfert très importante de l'ordre de 80%. La modulation de ce transfert en fonction de la longueur de la chaîne de biotine est cohérente avec un transfert énergétique type FRET.

Au final, ces études fondamentales sur les interactions QDs/bR ont permis de montrer que le principe même de fonctionnement du commutateur optique envisagé était avéré ce qui devrait maintenant permettre de mettre au point un démonstrateur.

Quatrième partie :
Influence des QDs sur la monomérisation de
la bR par du Triton X-100

Le FRET est un phénomène très dépendant de la distance donneur-accepteur. Cette distance ne peut être réduite indéfiniment dans le cas de notre complexe bR/QD. En effet, les bRs étant comprises dans les PMs, et le rétinol se situant au milieu de la membrane, la distance bR/QD présente un minimum d'au moins 5,5 nm. Nous l'avons d'ailleurs calculé théoriquement dans la partie précédente. Si nous voulons encore augmenter l'efficacité du FRET, il faut donc que les QDs pénètrent les membranes. Les QDs ne semblant pas avoir cette capacité seules, nous avons envisagé une méthode qui doit être capable de les faire pénétrer. La solution envisagée a été de fluidifier les membranes à l'aide de détergent.

En s'insérant entre les lipides dans les membranes le détergent les fluidifie. En plus de cette fluidification des PMs, un second phénomène, relié au premier, se produit. Les PMs étant plus fluides, le réseau de bR est déstabilisé. Les protéines ont plus de liberté et elles commencent à se déplacer les unes par rapport aux autres. Ce processus est appelé monomérisation de la bR puisque les protéines passent d'un état ordonné en trimères à un état désordonné en monomères.

Notre idée est alors de fluidifier les PMs en présence de Triton X-100 (détergent) et tenter d'incorporer les QDs dans les membranes puisque celles-ci sont plus fluides. Si les QDs pénètrent dans la membrane alors la distance D-A doit diminuer et le FRET augmenter. Les résultats obtenus lors des mesures de PL, qui seront détaillées dans un premier temps, ont permis de mettre en évidence une influence inattendue des QDs sur la monomérisation des PMs, phénomène qui pourra trouver des applications en biologie.

I. Mesures de FRET

A. Mesure de FRET en statique

Puisque nous voulions augmenter le FRET entre bR et QDs en réduisant la distance bR-QD à l'aide de détergent, nous avons réalisé des mesures de PL pour le vérifier. Celles-ci ont été réalisées en mélangeant des QDs cystéinées, les plus simples à utiliser, à du Triton X-100, puis en incorporant les PMs progressivement lors des mesures.

La PL de ces échantillons a été suivie sur plusieurs heures pour permettre de savoir si la fluidification a un impact sur la distance bR/QD puisque, si la distance D-A est réduite, le FRET doit augmenter. Le rapport bR/QD a été fixé à 3/1, ce qui correspond à une QD par trimère de bR dans la solution. Les QDs émettent à 570 nm. La température a été fixée à 20°C, température ambiante, puisque l'appareil ne dispose pas de système de refroidissement. Le Triton X-100 représente 0,4 % du volume de la solution. Cette concentration de Triton est suffisante pour monomériser la bR comme indiqué dans la référence [177]. Si on augmente cette concentration (2%), la bR se retrouve piégée dans des liposomes ce qui n'est pas le but de notre étude. Les échantillons sont mélangés au commencement de l'expérience et laissés dans l'appareil pour plusieurs heures. En effet, l'appareil mesure la PL de l'échantillon toutes les 15 minutes, en moyennant le signal sur vingt secondes. Le système étant complètement automatisé, il permet de reproduire parfaitement le même écart de temps entre chaque mesure et de bien contrôler la durée de la mesure. De même, tous les paramètres peuvent être conservés pour plusieurs échantillons de suite. Les résultats sont présentés sur la Figure 65.

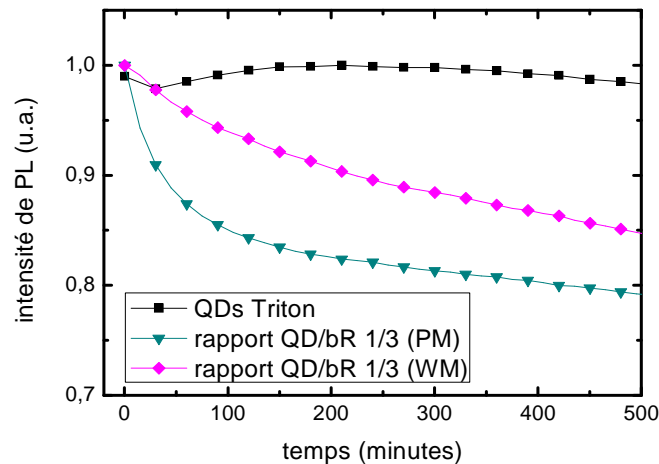


Figure 65 : Courbes représentant la PL de QDs cystéinées en présence de bRs et de Triton X-100. Le rapport bR/QDs est de 1/4. La courbe verte a été enregistrée avec des PMs alors que la rose l'a été avec des WMs. La courbe noire représente la PL des QDs seules dans le Triton à la même concentration.

La Figure 65 présente les résultats obtenus pour des QDs cystéinées mises en présence de Triton et de bRs. La PL des QDs en présence de Triton ne montre pas de réelle décroissance, ce qui signifie que les QDs sont stables dans le Triton. Cette mesure nous permet de vérifier que les particules ne s'agrègent pas car dans ce cas, la PL diminuerait fortement et le spectre d'émission se décalerait dans le rouge, ce qui n'est pas le cas ici.

Cette même figure présente également les valeurs de la PL des QDs en présence de bR et de Triton. Cependant, deux types de bR ont été utilisés, celle provenant de PMs et celle provenant de WMs. Les QDs en présence de PMs montrent une décroissance d'environ 20 %, mais la décroissance est très importante sur les 150 premières minutes et beaucoup plus faible par la suite. Pour les QDs en présence de WMs, la décroissance est de 15 % environ, mais est quasiment linéaire du début à la fin de l'expérience. La différence entre PMs et WMs semble donc importante en terme de forme du signal, mais inexplicablement faible en terme d'intensité finale.

De plus, lors des mesures de FRET en statique avec les mêmes QDs nous obtenions une efficacité de 61 %, valeur bien meilleure que celle de 20 % obtenue ici. Le Triton semble avoir un effet néfaste sur le FRET, c'est-à-dire sur la distance bR-QD qu'il semble augmenter. Alors comment expliquer ce résultat ?

La première explication envisagée serait que le Triton en désorganisant la bR agit également sur son absorption. En effet, Wu *et al.* ont montré que l'absorption de la bR était

modifiée lors de la fluidification des PMs par du Triton X-100 [177]. Le maximum d'absorption de la bR se déplace de 568 à 556 nm et son coefficient d'extinction molaire diminue de 15 % comme le montre la Figure 66. Cette variation de l'absorption de la bR induit forcément des changements sur l'intégrale de recouvrement (J). Cependant, cette variation sur J doit représenter une perte de FRET de moins de 5 %. La variation de J est de 17 %, mais J n'intervient qu'à la puissance $1/6^e$ dans le calcul du rayon de Förster ce qui réduit son influence à seulement 5 % de R_0 .

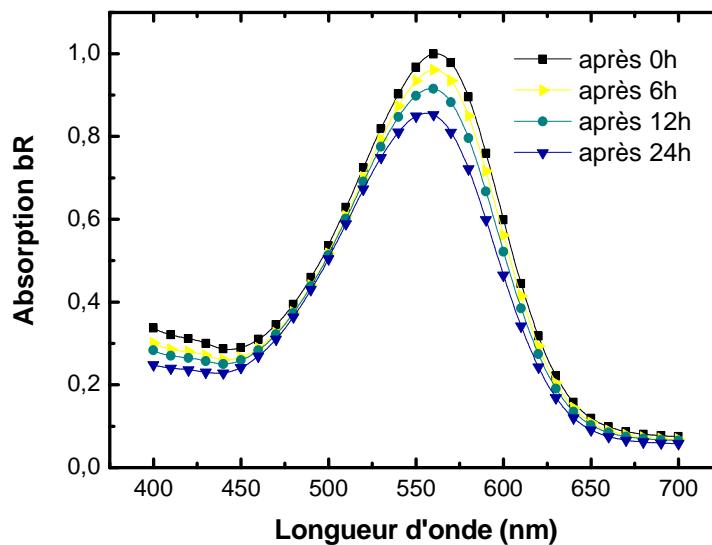


Figure 66 : Spectres d'absorption de la bR après traitement au Triton X-100. Les spectres ont été enregistrés après 0 min, 6 heures, 12 heures et 24 heures de présence de la bR dans le Triton.

Si les changements dans le spectre d'absorption de la bR ne sont pas responsables de la faible efficacité du FRET observée, quel phénomène peut expliquer ce changement d'intensité de transfert d'énergie ? Nous avons émis l'hypothèse que probablement la présence de Triton pouvait influencer sur la formation du complexe. Pour vérifier s'il se forme bien nous avons réalisé des images à l'aide de l'AFM, puisqu'il a déjà démontré toutes ses possibilités dans la partie précédente.

B. Imagerie par AFM

La préparation des échantillons est un facteur important en microscopie à force atomique. Un protocole de dépôt des PMs à la surface du mica a été proposé dans la seconde partie de ce manuscrit et il a montré son efficacité. Nous avons donc décidé de suivre ce protocole pour préparer nos échantillons de complexe bR/QD avec du Triton. Nous avons

alors déposé des PMs sur du mica, puis nous avons injecté les QDs et le Triton dans le milieu. Ainsi, il nous a été possible de suivre le dépôt des QDs et de savoir s'il y a ou non formation de complexe.

Les images obtenues avec ce protocole sont présentées sur la Figure 67. Elles ont été enregistrées quelques minutes après injection des QDs et du Triton. La concentration en Triton est de 0,4 % en volume et les images ont été enregistrées en mode tapping. Sur ces images, on ne discerne pas de QDs, et les membranes présentent des crevasses. Il semblerait que la concentration en Triton soit localement si importante que les membranes sont solubilisées en quelques minutes. Deux phénomènes ont donc été notés. Tout d'abord, les QDs ne semblent pas se déposer ni sur le mica ni sur les PMs. Deuxièmement, aucun réseau de bR n'a été observé. La monomérisation des bRs semble fortement accélérée par ajout de QDs.

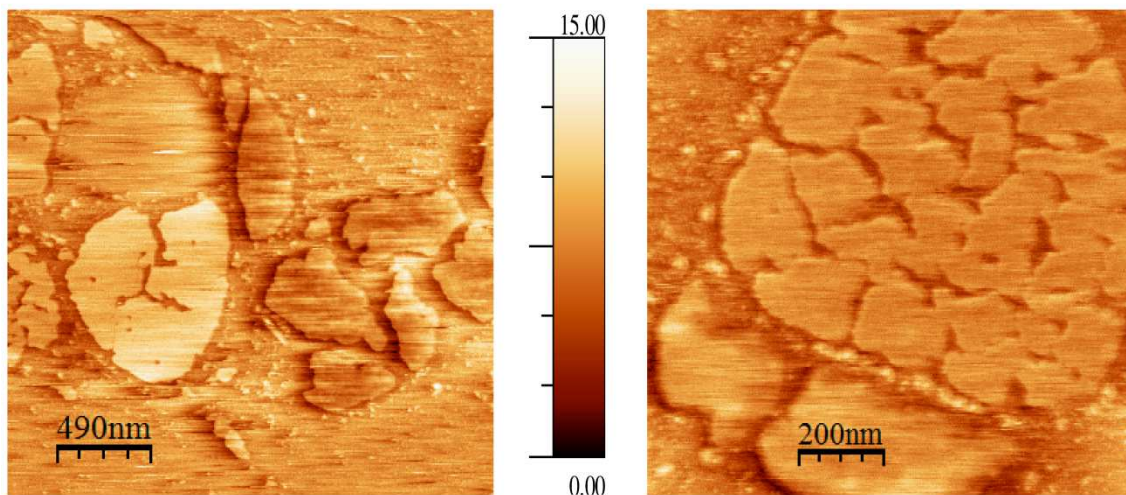


Figure 67 : Images AFM de PMs après quelques minutes en présence de Triton X-100 à 0,4 % en volume et de QDs.

Un second protocole a donc été établi pour vérifier si cette solubilisation rapide de la membrane était due à la préparation des échantillons ou à un autre effet. Pour cela, nous avons préparé le mélange PMs, QDs et Triton que nous avons laissé incuber quelques heures. Dans ces conditions, il semblerait que les membranes se déposent bien sur le mica. Cependant, leur nombre est faible et elles ont l'air très fragmentées comme en atteste l'image de droite de la Figure 68.

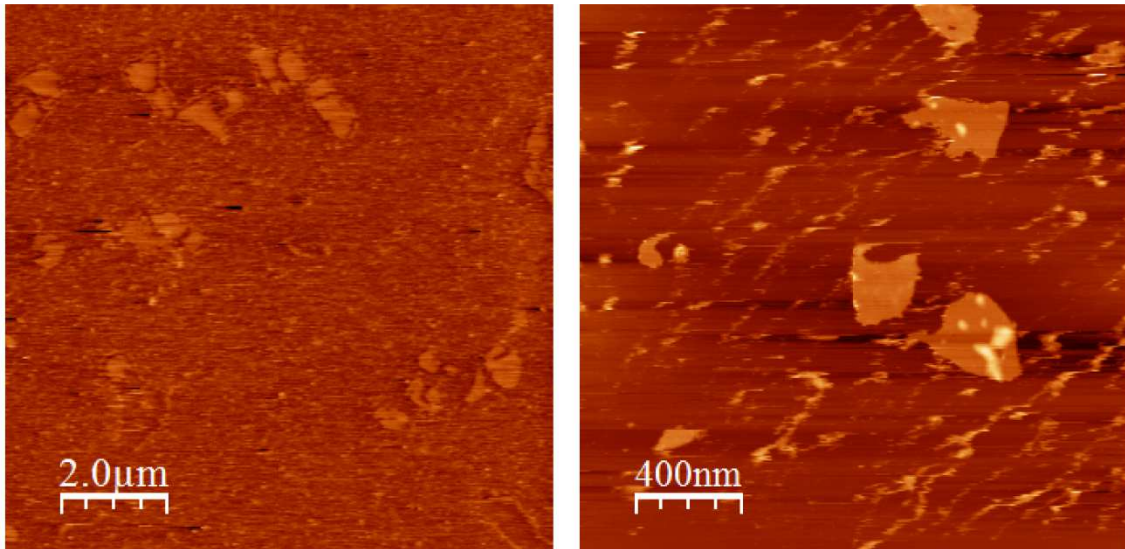


Figure 68 : Images AFM d'échantillons de PMs traitées avec du Triton X-100 et des QDs. Elles ne laissent apparaître que quelques fragments de membranes et aucune QD ne se trouve sur le substrat ou sur les PMs après rinçage.

Sur l'image de gauche, on s'aperçoit que les membranes observées à la surface du mica sont en fait des fragments de membranes plus grandes que nous observions avant. Leurs formes ont changé. Les PMs sont, comme dans le cas précédent, morcelées par l'attaque du Triton, mais ne présentent pas de crevasses. De plus, les QDs ne sont pas visibles. Il semble donc que les interactions bR/QDs soient modifiées par la présence de Triton. En effet, lors de l'imagerie du même type d'échantillon, mais sans Triton, les images AFM montraient des QDs agrégées sur le mica (Figure 53, troisième partie de ce document). Sur la Figure 68, aucune QD n'est visible. Cependant, sur des images de cette taille il est impossible de savoir si les QDs sont liées à la surface des PMs ou non. En effet, elles pourraient être épitaxiées à la surface des PMs comme sur la Figure 56, et seraient invisibles à ce grandissement. Pour vérifier cela nous avons réalisés des images plus petites mais aucun réseau de bR n'a été observé. Si au vu des résultats observés, l'utilisation de détergent et la monomérisation des membranes ne sont pas des options intéressantes dans l'optique de l'amélioration du FRET, des effets importants dus au couplage QDs/bR/détergent semblent exister. Nous avons donc décidé d'approfondir ces expériences pour comprendre les effets observés sur la monomérisation.

II. Influence des QDs sur la monomérisation de la bR

D'après les images précédemment réalisées, il semblerait que les QDs aient un effet sur la monomérisation de la bR. Dans le but de suivre cet effet, deux types de caractérisation ont été utilisés :

- le dichroïsme circulaire (CD). Comme nous l'avons vu dans la seconde partie, la bR possède un spectre de CD dans la bande d'absorption du rétinale (Figure 69). Cette bande de CD est due aux interactions excitoniques et permet de rendre compte de l'organisation des protéines à l'intérieur de la membrane [152]. En effet, pour avoir ce type d'interaction il faut que les rétinals soient très proches et parfaitement ordonnés, ce qui n'est plus le cas lorsque la bR est monomérisée. Cette bande de CD a donc été utilisée dans le but de savoir si les protéines étaient toujours organisées dans les PMs en présence de détergent et de QDs.

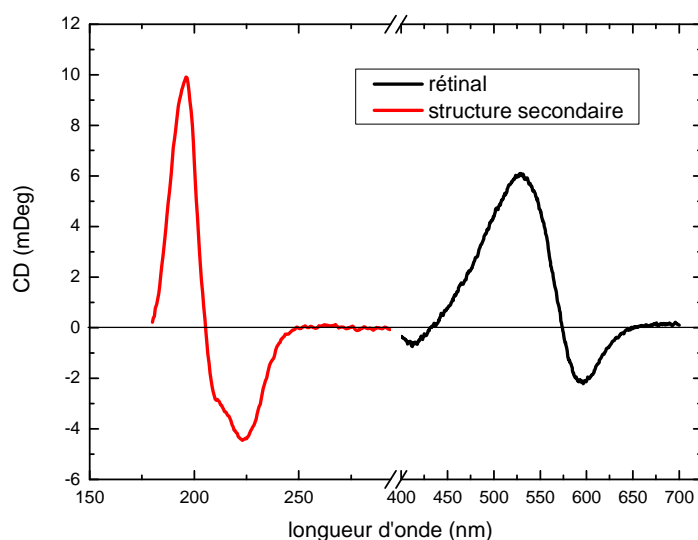


Figure 69 : Spectre de CD de la bR dans l'UV (structure secondaire) et dans le visible (rétinal).

- l'AFM. En effet, nous avons vu dans la seconde partie que l'AFM permet d'imager la structure cristalline de la bR. S'il est capable de résoudre cette structure, il est également capable d'indiquer quand elle n'existe plus. Nous avons donc réalisé une série de mesures AFM pour savoir à quel moment les protéines étaient complètement désorganisées.

A. Influence du Triton seul sur le réseau de bR

Pour mener à bien nos expériences de CD, nous avons besoin d'informations sur l'influence du Triton seul sur le réseau de la bR dans les PMs. Nous avons pour cela enregistré le spectre CD de la bR dans la zone d'absorption du rétinale à différents temps et en présence de 0,4 % (volume/volume) de Triton X-100. La concentration de bR est de 17 μ M. La cuve de mesure fait 5 mm d'épaisseur. Les résultats sont présentés sur la Figure 70.

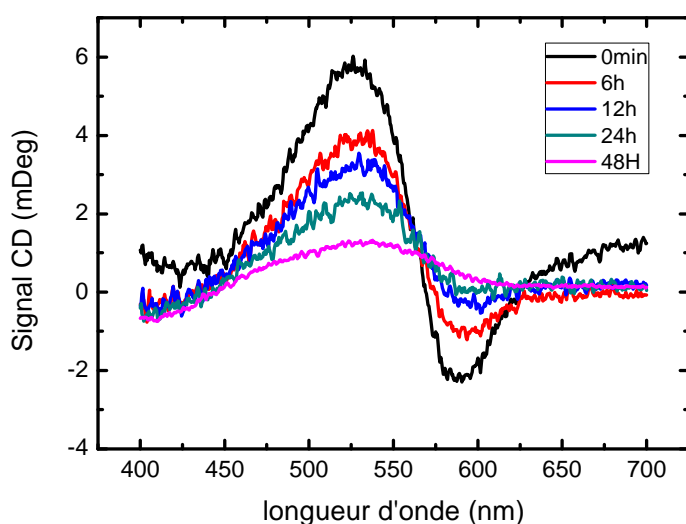


Figure 70 : Spectres de CD de bR en présence de Triton X-100 à 0,4% en volume après différents temps d'incubation.

Dans les conditions expérimentales choisies, la monomérisation de la bR prend entre 24 et 48 heures. En effet, passé ce délai, il ne reste plus qu'une seule bande de CD. Cette bande est due aux interactions rétinale-protéine qui, elles, ne changent pas durant la monomérisation.

Nous avons donc confirmé l'effet du Triton déjà observé par ailleurs [177] sur le réseau de bR grâce au spectre de CD de la protéine. Cette mesure représentera notre première référence. Une seconde référence est nécessaire pour savoir si les QDs ont un effet sur la monomérisation de la bR. Effectivement, nous devons vérifier que les QDs seules n'ont pas d'effet sur l'organisation de la protéine.

B. Influence des QDs sur le réseau de bR

Encore une fois, nous avons utilisé le CD pour vérifier l'influence des QDs sur le réseau de bR. Pour cela, nous avons pris un échantillon de bR pure et nous avons enregistré

son spectre de CD. Nous avons ensuite progressivement incorporé à notre échantillon des QDs solubilisées à la cystéine et émettant à 570 nm jusqu'à un rapport de 1 QD/bR. Les conditions expérimentales sont identiques à celle de l'expérience précédente.

Les résultats ont été corrigés du biais de dilution de l'échantillon et sont présentés sur la Figure 71.

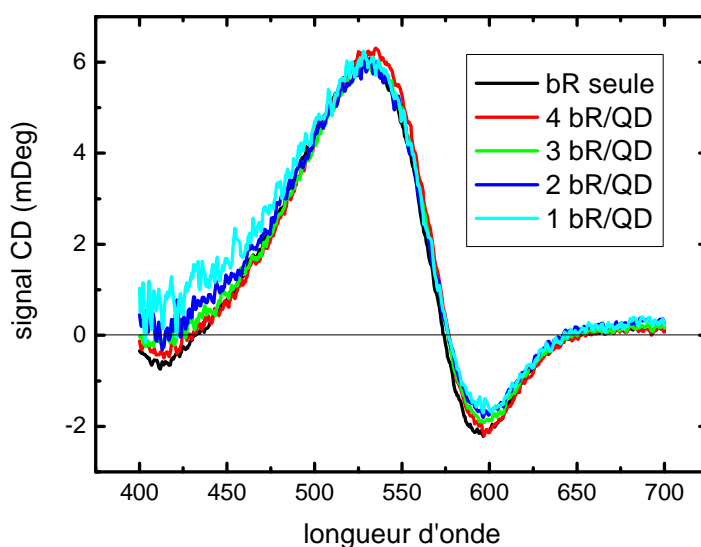


Figure 71 : Spectres de CD de bR seule et de bR en présence de différents ratios de QDs.

On ne note aucun changement entre le spectre de bR seule et les spectres en présence de QDs. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'influence des QDs cystéinées sur l'organisation de la bR à l'intérieure des PMs.

Cependant, il est bon de nuancer ce résultat. L'absence de changement de CD ne signifie pas forcément que les QDs n'ont pas d'influence sur l'organisation des bRs. En effet, l'absence de modification indique que les phénomènes responsables de ce spectre de CD n'ont pas connu de modification. Dans notre cas, une partie du spectre est due à l'interaction rétinal-protéine, qui n'a pas réellement lieu d'être modifiée puisque les QDs ne pénètrent pas la membrane et donc ne modifie pas la structure de la protéine. Il est donc naturel que cette partie du spectre ne soit pas modifiée.

D'un autre côté, le spectre de CD de la bR est aussi dû aux interactions entre rétinals. Ces interactions sont dépendantes de l'organisation des bRs les uns par rapport aux autres (présence d'un réseau fixe) et de la faible distance qui les sépare. Si l'une de ces deux conditions n'est plus vérifiée, alors le spectre de CD ne présente plus le changement de signe caractéristique de ce genre d'interaction. C'est le cas lors de la monomérisation de la bR à

l'aide de détergent, puisque la distance protéine-protéine augmente et la bR se désorganise, ce qui implique la disparition de cette partie du spectre.

L'absence de changement dans le cas où on ajoute les QDs peut directement être reliée à un maintien de l'organisation de la bR dans la membrane et à un maintien de la distance rétinale à rétinale. Il n'y a donc pas d'influence des QDs sur l'organisation des protéines. Cependant, ceci ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'influence des QDs sur les protéines. En effet, il n'y aurait pas non plus de modifications du spectre si les QDs n'interagissaient qu'avec une partie de la protéine ne participant pas au spectre de CD. Il y a probablement une influence de la présence de QDs à la surface de la PM, mais cette influence est limitée à la surface de la bR et aux boucles qui ressortent de la PM. Puisque ces boucles ne participent pas au spectre de CD du rétinale, alors il n'y a pas d'influence sur ce spectre.

En outre, les QDs utilisées dans cette étude sont des QDs cystéinées, avec un potentiel zêta très négatif, de l'ordre de -40 mV. Ces particules, d'après [178], stabilisent les bicouches lipidiques, ce qui dans notre cas ne favorise pas le mouvement des protéines les unes avec les autres. Il est alors naturel de ne pas observer de changement dans le spectre de CD associé au rétinale. Si la même expérience était menée avec des QDs aminées, il est possible que les résultats soient tout à fait différents et que le spectre de CD du rétinale soit modifié. Les nanoparticules positives fluidifiant localement la membrane, il est imaginable qu'elles modifient l'organisation des protéines. Cependant, les images AFM avec ce type de particules, nous montrent une organisation des QDs dans le même type de réseau que celui de la bR (Figure 56). Il ne semble alors pas y avoir d'influence réelle des QDs sur le réseau cristallin de la bR et donc sur le signal CD du rétinale. De plus, les expériences montrant une fluidification des membranes ont été menées à l'aide de liposomes et non à l'aide de PMs. Dans les liposomes, la stabilité provient des interactions lipides – lipides, alors que dans les PMs, ces interactions sont couplées à des interactions protéines – lipides et protéines – protéines. Les effets des QDs à la surface de la membrane ne sont probablement pas suffisants pour désorganiser les protéines.

Nous venons donc de montrer que les QDs seules ne peuvent désorganiser les bRs dans les PMs. De plus, nous avons montré précédemment que la monomérisation par le Triton X-100 prenait dans nos conditions plus de 24 heures. Qu'en est-il dans le cas où la monomérisation par le Triton se produit en présence de QDs ?

C. Influence des QDs sur la monomérisation de la bR par le Triton

1. Mesures par dichroïsme circulaire

Nous avons préparé un échantillon dans les mêmes conditions que lors de la monomérisation par du Triton seul. La bR est à une concentration de 17 μM , la cuve fait 5 mm et le Triton est à 0,4 % par volume. En plus de cela, nous avons injecté des QDs jusqu'à un rapport de 3 bR/QD. Le spectre de CD de l'échantillon était enregistré régulièrement pour suivre sa monomérisation. Les résultats sont présentés sur la Figure 72

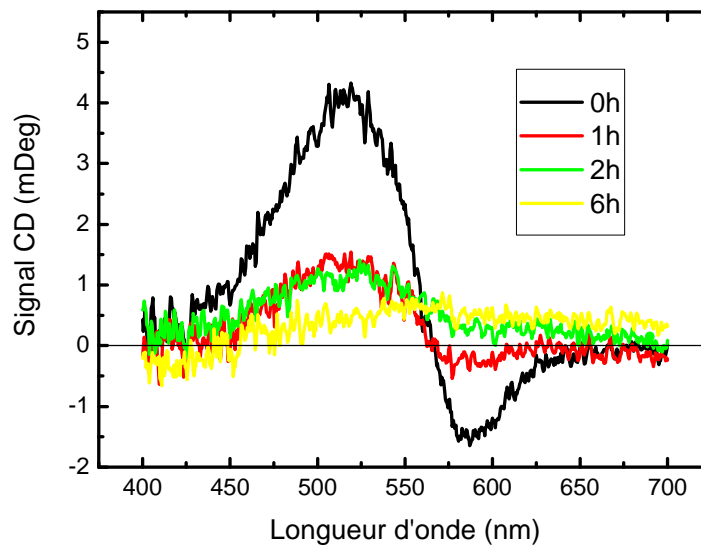


Figure 72 : Spectres de CD de bR en présence de QDs et de Triton X-100 à 0,4% en volume à différents temps d'incubation.

La Figure 72 nous montre qu'après seulement 6 heures, la monomérisation de la bR est complète, dans les mêmes conditions que précédemment, mais avec l'ajout des QDs cystéinées. Il semble donc que les QDs cystéinées accélèrent fortement la monomérisation de la bR en présence de Triton X-100. En effet, nous avons montré précédemment que dans les mêmes conditions expérimentales mais sans QDs, cette monomérisation prenait 48 heures. En présence de QDs la monomérisation de la bR par le Triton X-100 est donc 8 fois plus rapide.

Pour s'assurer de la monomérisation, l'AFM nous a permis de visualiser directement le réseau. Il a donc fallu trouver un protocole pour déposer les PMs de façon lisse sur le mica malgré la présence de Triton X-100. Il a fallu également parfaire le protocole d'imagerie pour obtenir des images de la meilleure qualité possible et être sûr que le réseau soit visible s'il existe.

2. Mesure par AFM

a) Protocole expérimental

Nous avons préparé des échantillons de PMs en solution avec du Triton X-100 à 0,4 % en volume, dans de l'eau, avec ou sans QDs (rapport de 3 bR/QD environ) suivant le cas étudié. Ensuite, ils étaient incubés pour un temps t -30 min dans un réfrigérateur à 4°C. Les 30 dernières minutes de l'incubation servant au dépôt sur le mica. Dans ces conditions l'échantillon était mélangé à du tampon à base de 10 mM de TRIS (pH 9) et 150 mM de KCl. Le TRIS a été choisi puisque les QDs cystéinées sont solubles à pH basique et le KCl est utilisé pour étendre les membranes sur le mica. Pour les échantillons ayant incubé plus de 4 heures il faut augmenter légèrement cette concentration pour que les PMs se déposent sur le mica. Une augmentation jusqu'à 200 mM est normalement suffisante. Le principal problème de cette méthode est le taux de recouvrement de l'échantillon, qui reste relativement faible et qui diminue lorsque le temps d'incubation augmente. De plus, les patches de PMs sont de plus en plus petits, passant de plusieurs centaines de nanomètres voire plusieurs micromètres à seulement 300 nm au maximum. Ce changement de taille pose un problème pour avoir une image complète sur laquelle on ne distingue que le réseau de bR.

Une fois l'échantillon déposé sur le mica pendant 30 minutes, il était rincé abondamment avec le même tampon, puis imagé toujours dans le même tampon. L'échantillon était considéré comme inutilisable après une heure et demie passée dans le microscope parce que du Triton se libérait dans la cellule fluide. Ceci signifie que l'échantillon était partiellement dialysé par notre mode d'imagerie et que le Triton s'échappait des membranes s'il restait trop longtemps dans le microscope. Il détériorait alors la qualité de l'image et la qualité des membranes à la surface de l'échantillon.

Le mode d'imagerie est également très important ici puisque les membranes sont très fragiles à cause de l'insertion de détergent. Elles présentent également une grande fluidité. Le passage de la pointe peut aisément les détériorer et donc rendre impossible toute image. Il est alors simple de comprendre que le mode contact doit être abandonné pour ce genre d'expérience. Il était très difficile de faire des images des PMs après seulement une heure ou deux avec ce mode, car le contrôle de la force d'interaction était impossible. Par contre, le mode tapping a donné de très bonnes images permettant de réaliser l'analyse souhaitée.

b) Résultats

Les PMs ont été imagées au bout de plusieurs heures en présence de Triton sans et avec QDs. Pour rappel, à l'aide du dichroïsme circulaire, nous avons montré que le temps de monomérisation en présence de QDs était de 6 heures alors qu'il était de 48 H en l'absence de QD. La Figure 73 présente les images obtenues après seulement 3 heures passées sans et avec QDs pour comparaison.

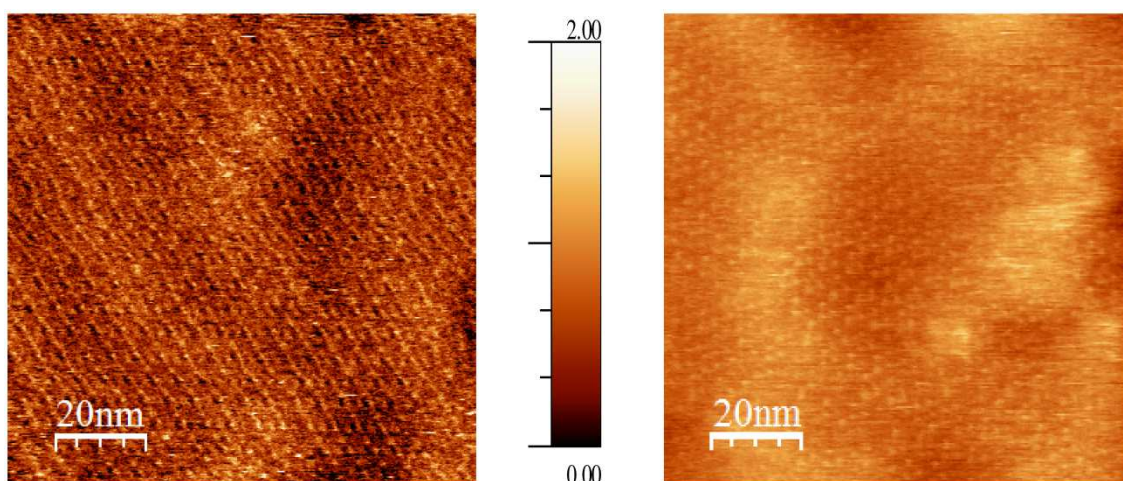


Figure 73 : Images AFM du réseau de bR à l'intérieure des PMs après 3 heures passées incubées avec du Triton X-100 à 0,4 % en volume, sans QDs à gauche et avec QDs à droite.

La figure ci-dessus présente les images AFM obtenue après trois heures d'incubation. Les réseaux de bR sont encore visibles sur les deux images mais en présence de QDs le réseau semble moins discernable. Le mode d'imagerie (tapping) semble être suffisamment performant pour cette expérience.

Après 5 heures d'incubation, il était très difficile de visualiser le réseau de bR et donc d'être certain qu'il existait encore ou non. Nous avons alors opté pour la transformée de Fourier (TF) de l'image. La TF est une représentation en fréquences de l'image, les fréquences les plus présentes dans l'image apparaissent dans la TF comme des points brillants, notamment si un réseau est présent sur l'image réelle.

La Figure 74 nous montre des images enregistrées après 5 heures d'incubation. Les réseaux de bR sont encore discernables sans les QDs mais ne sont quasiment plus visibles à l'œil nu avec les QDs. Pour l'image de droite en présence de QDs, il faut recourir à la TF, pour s'apercevoir qu'un réseau est toujours présent. En effet, sur la TF persistent toujours 6 points représentatifs d'un réseau hexagonal. Cependant, ces points sont difficilement visibles, même en TF, et un zoom est nécessaire pour les discerner. Pour l'image sans QDs, même si le

réseau n'est pas facile à distinguer sur l'image réelle, la TF nous montre plusieurs ordres, ce qui implique que le réseau est parfaitement bien organisé dans l'image.

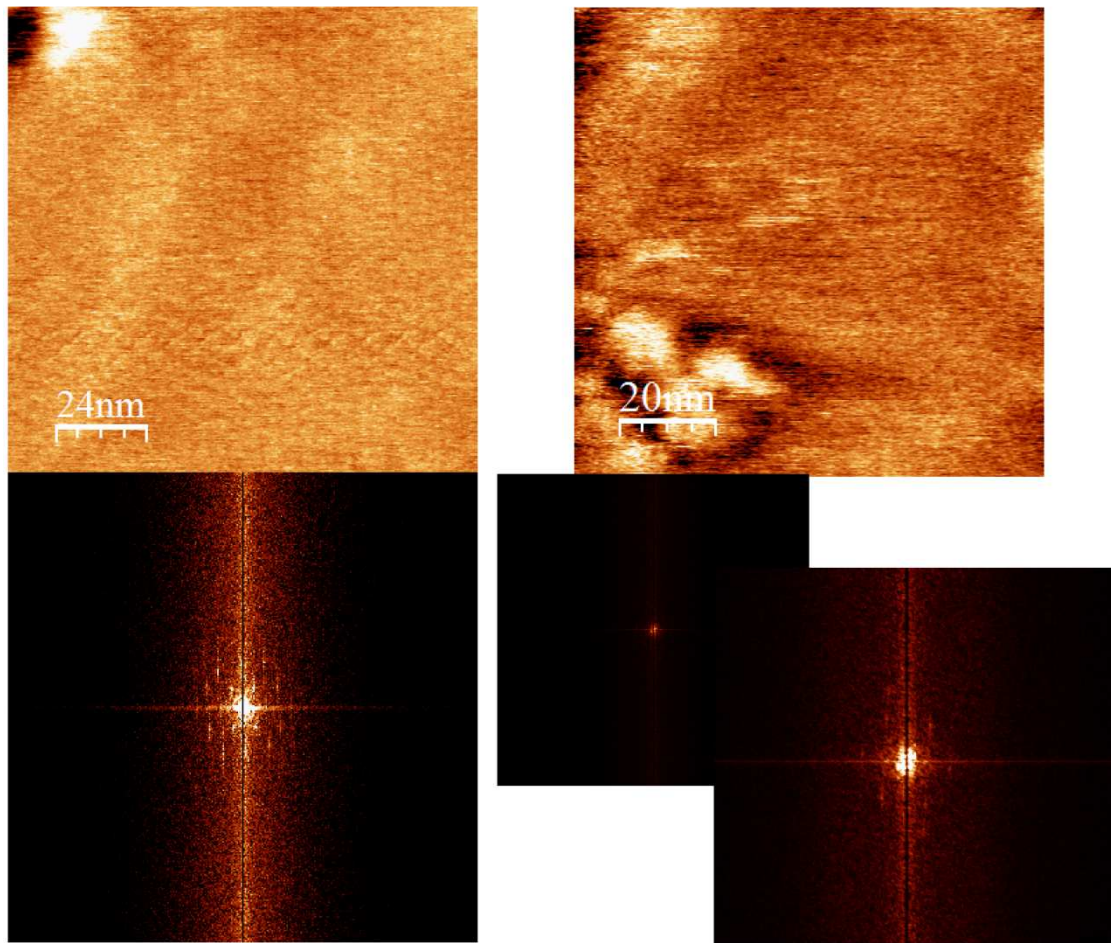


Figure 74 : Images AFM et transformées de Fourier associées. Ces images ont été réalisées après 5 heures d'incubation avec du Triton, sans QDs à gauche et avec QDs à droite.

Les images à 5 heures montrent toujours la présence du réseau de bR même avec des QDs. Ce n'est plus le cas à 6 heures. La Figure 75 montre qu'en présence de QDs après 6 heures d'incubation, le réseau de bR n'est plus visible et que les bRs sont parfaitement monomérisées. La TF associée à cette image ne donne pas non plus de signe d'organisation. Il n'y a plus de points correspondant à des fréquences bien précises. En revanche, sans les QDs le réseau est toujours discernable sur l'image réelle et bien entendu sur la TF. Plusieurs ordres sont toujours visibles sur la TF montrant encore un grand signe d'organisation. Il est donc clair que les QDs influent sur la monomérisation de la bR et qu'après six heures les bR sont complètement monomérisée en présence de QDs alors qu'elles ne le sont pas sans QDs.

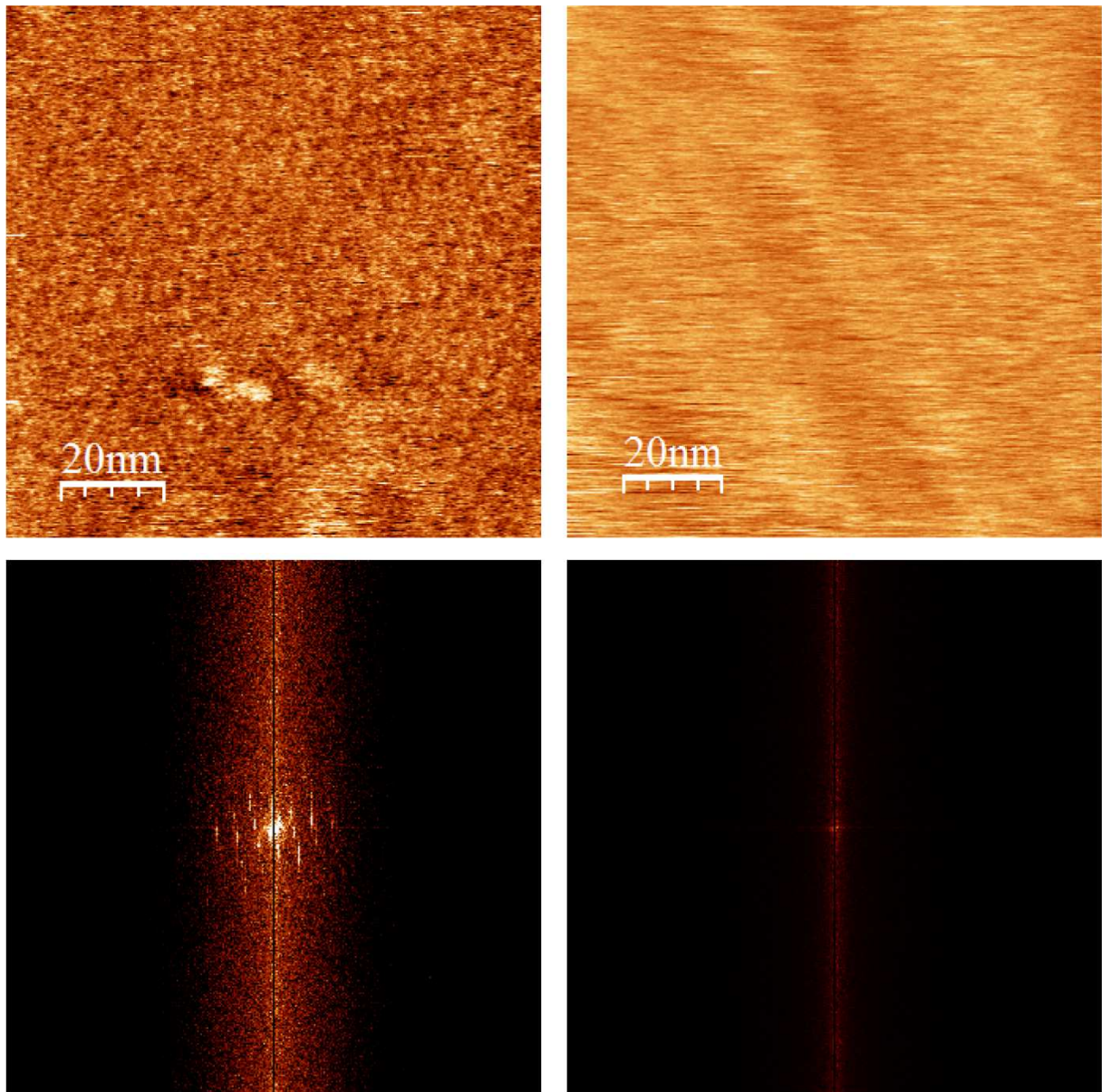


Figure 75 : Images AFM et TF associées après 6 heures en présence de Triton et sans QDs à gauche, avec à droite.

Pour connaître la fiabilité de cette méthode, des images ont été faites jusqu'à 24 heures pour les PMs sans QDs. La Figure 76 montre une image obtenue après 24 heures d'incubation avec du Triton sans QDs.

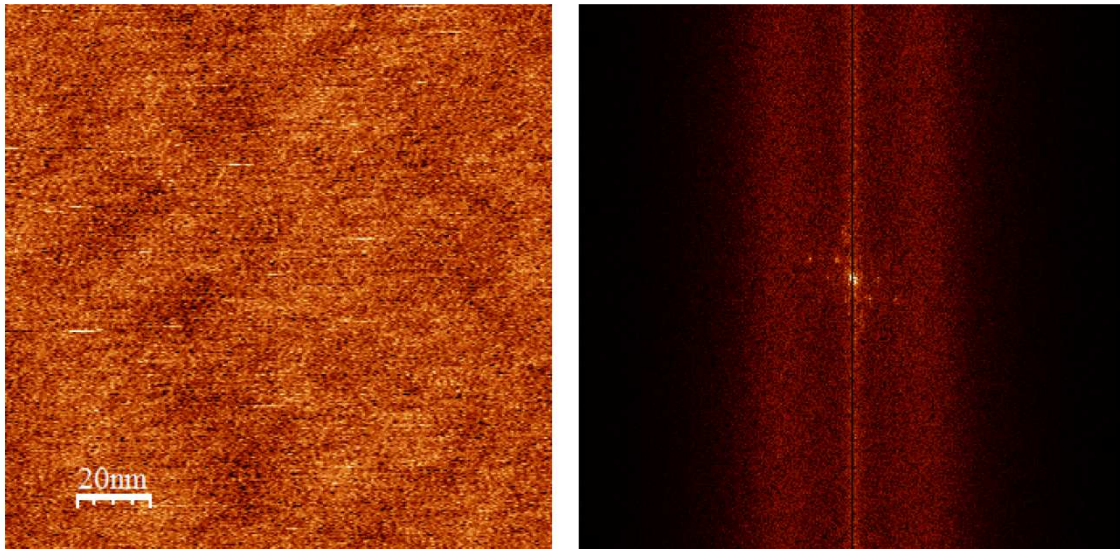


Figure 76 : Image AFM et TF associée de la surface d'une PM après 24H d'incubation avec du Triton et sans QDs.

Il semble en regardant l'image réelle que le réseau de bR ait quasiment disparu. Cependant, malgré cette absence de réseau visible à l'œil sur l'image réelle, la TF montre toujours des signes d'organisation et le spectre d'un réseau hexagonal est toujours visible sur cette image. Cette expérience démontre bien que cette méthode est fiable et que l'absence de réseau noté sur plusieurs échantillons après 6 heures d'incubation en présence de QDs n'est pas due à un problème d'imagerie, mais bien à la monomérisation de la bR. La visualisation après 24 heures du réseau de bR en l'absence de QDs est cohérente avec les résultats de CD et est donc une très bonne information sur la fiabilité de la méthode.

Il est donc clair que la monomérisation de la bR par le Triton est accélérée par la présence de QDs. L'observation d'un tel effet n'a jamais été observé à notre connaissance et pour l'expliquer, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

III. Bilan et Discussion

Nous avons montré que les QDs semblent avoir un effet très important sur le mécanisme de monomérisation de la bR par du Triton X-100. Cet effet s'est caractérisé dans nos expériences par une diminution par un facteur 8 du temps de monomérisation de la bR par du Triton. Le temps de monomérisation en l'absence de QDs est de 48 heures, dans les conditions expérimentales fixées, alors qu'il n'est que de 6 heures en présence de QDs. Cet effet est d'autant plus surprenant que nous avons montré par CD et par AFM que les QDs seules n'induisaient aucun changement d'organisation dans les PMs. La Figure 56 le montre pour les QDs aminées en les présentant épitaxiées à la surface d'une PM et respectant le réseau de bR. La Figure 71 le montre par CD pour les QDs cystéinées qui ne modifient pas le spectre du rétinale. On peut alors se demander quel phénomène permet au QDs d'accélérer le processus de monomérisation de la bR. Même si peu de travaux relatifs à la mise en évidence de tels effets ont été effectués, quelques pistes peuvent expliquer le phénomène observé.

Tout d'abord, une étude réalisée sur des liposomes montrent que des nanoparticules (NPs), à base de polystyrène ou de silice, peuvent avoir des effets très importants sur la phase dans laquelle se trouvent les lipides des liposomes [178]. Dans cette étude, il est montré que des NPs de polystyrène chargées positivement fluidifient les membranes. Il est montré que ces NPs réduisent l'angle entre chaque lipide dans le liposome ce qui conduit à une plus grande surface couverte par lipide et donc à une plus grande fluidité. Pour les NPs chargées négativement, un effet « inverse » semble exister puisque ces NPs gélifient les membranes. En effet, comme les NPs chargées positivement diminuent l'angle entre les lipides et donc augmentent la surface par lipide, les NPs anioniques augmentent cet angle et donc gélifient les membranes. Cette étude s'appuie notamment sur le fait que les liposomes rétrécissent d'environ 20 % après ajout des NPs. La rigidité des NPs est un facteur important puisque couplée aux interactions électrostatiques elle semble à la base de l'effet. Ceci a été démontré grâce à l'ADN qui est fortement chargé négativement mais qui ne montre pas les mêmes propriétés car il se déforme à la surface des liposomes.

Un des points importants de cette étude est que le changement de fluidité semble dû à une interaction locale entre NPs et liposomes. En effet, il existe dans le même liposome plusieurs phases distinctes en fonction de la présence ou non des NPs. Un marqueur a été inséré dans les liposomes et rend compte de la phase dans laquelle se trouvent les lipides (gel ou fluide). Ce marqueur met en avant le fait que les NPs n'influencent que leur

environnement local et non l'intégralité du liposome sur lequel elles sont fixées. Il peut donc y avoir plusieurs phases sur le même liposome. Ces changements montrent que les NPs peuvent induire localement d'importantes modifications de l'organisation des liposomes (et des lipides à l'intérieur).

Au final, cette étude montre que les changements de propriétés sont induits localement par les NPs mais n'identifie pas clairement les mécanismes impliqués dans la gélification ou la fluidification des membranes. Elle montre également ce phénomène n'est pas uniquement réservé aux NPs de polystyrène mais également à des particules de silice si la fonctionnalisation de surface est identique. Il est donc clair que toutes NPs, si elles sont chargées peuvent influencer la densité locale des lipides dans les liposomes et donc la phase dans laquelle se trouvent ces derniers. En outre, il semblerait que plus la charge de surface des NPs est importante plus l'effet est visible. Le diamètre des NPs, lui, ne change que très peu leur influence.

Par rapport à nos expériences, ces résultats sont obtenus sur des membranes artificielles et composées uniquement de lipides, ce qui n'est pas le cas des PMs et change donc certainement les résultats obtenus mais les effets sont bien observés et le caractère local des interactions doit certainement être également majeur dans les résultats que nous obtenons.

Les QDs que nous avons utilisées sont, elles aussi, très négativement chargées et puisque la taille des NPs importe peu, il serait normal selon l'étude précédente qu'elles aient également des effets sur l'état des membranes. Cependant, cet effet ne va pas dans le sens de nos expériences car les QDs CdSe/ZnS chargés négativement favorisent dans notre cas la fluidification de la membrane, alors que sur les liposomes les NPs anioniques de [186] provoquent une gélification. Cet effet ne peut alors pas être le phénomène responsable de nos observations. Toutefois, il met en avant le fait que les QDs sont capables d'influencer fortement leur entourage et donc provoquer des effets sur les molécules qui les entourent. Pour aller plus loin que l'étude précédente, il faut certainement se poser la question de savoir sur quelles interactions les QDs vont pouvoir influencer pour provoquer une monomérisation de la bR plus rapide ?

Il peut exister quatre types d'interactions entre les QDs (ou des NPs en général) et les PMs : les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes et les forces de Van der Waals (VdW) [179]. Ces quatre types d'interaction pourraient éventuellement être altérés ou renforcés du fait de l'influence des QDs sur la bR ce qui expliquerait l'accélération de la monomérisation. Dans les PMs, la stabilité du réseau est due à plusieurs types d'interaction différents [34]. Il existe dans les PMs des interactions

hydrophobes entre les protéines et les chaînes alkyl des lipides et des liaisons hydrogènes entre les tyrosines de la bR et les atomes d'oxygène des lipides. Toutefois, ces 2 types de liaison ne participent que de façon minoritaire dans la formation du trimère au contraire des forces de VdW qui sont les plus importantes pour expliquer la cohésion des PMs. Pour accélérer d'une façon si importante la monomérisation des membranes, il faudrait certainement que les QDs agissent sur les forces de VdW. Mais cela est-il possible ? Ces forces s'appliquent majoritairement sur les lipides 502, 503, 507 et 508 qui sont en liaison directe avec deux trimères chacun. Les lipides 500 et 506 qui sont à l'intérieur et à l'extérieur du trimère aident également à la stabilité. Tous ces lipides ainsi que les trois protéines de chaque trimère sont principalement retenus à leur place à l'aide des forces de VdW.

Pour d'autres systèmes, une étude récente a démontré que les forces de VdW qui s'appliquaient entre des QDs et des peptides amyloïdes pouvaient être suffisantes à la non formation des fibrilles responsables de la maladie d'Alzheimer [179]. Cette étude montre que les nouvelles interactions dues à la présence de QDs ne conduisent pas à la formation de fibrilles mais à la formation d'amas autour des QDs. Les nouvelles forces de VdW entre les QDs et les peptides amyloïdes expliqueraient alors que la formation de ces amas soit favorisée au détriment de la formation des fibrilles.

Dans notre cas, les interactions responsables de la stabilité de la membrane sont également de type VdW. On peut alors avancer que les QDs modifieraient alors localement l'intensité de ces interactions et favoriseraient ainsi l'action du Triton sur la détérioration du réseau de bR. En modifiant localement les forces qui s'appliquent entre les différents constituants des PMs, les QDs pourraient localement réduire la stabilité de la membrane. Cependant, cette modification, seule, ne serait suffisante pour désorganiser les protéines car utilisées seules, les QDs ne modifient pas le spectre de CD du rétinale (Figure 71). La présence des QDs n'est pas suffisante pour désorganiser le réseau. Cependant, si on additionne à cette réduction de stabilité la présence de détergent, il pourrait y avoir une augmentation sensible de la vitesse de monomérisation. Tout ceci n'est pour le moment qu'hypothétique et reste donc à être démontré.

Pour étoffer cette étude et expliciter les mécanismes impliqués, il faut effectuer d'autres études pour connaître les influences de la concentration en QDs et de leur charge de surface sur la monomérisation de la bR. On peut imaginer que des mesures effectuées à plusieurs rapports molaires bR/QD nous permettraient de mieux mettre en évidence le phénomène responsable de cet effet. De même, un changement de type de ligands de surface des QDs permettrait peut-être de mettre en évidence une éventuelle dépendance à la charge de

surface. Comme nous savons également qu'il y a un effet FRET entre la bR et les QDs, cet effet même faible pourrait également avoir une influence sur la monomérisation rapide observée. Il serait également intéressant de modifier le type de particules, leur composition chimique ou même leur forme pour connaître leur influence sur l'effet observé.

IV. Conclusion

En conclusion, nous avons mis en évidence que les QDs cystéinées modifient le temps de monomérisation de la bR en présence de Triton X-100. Cette étude est basée sur des mesures de dichroïsme circulaire et d'AFM. Elles montrent distinctement que les QDs cystéinées augmentent fortement la vitesse de monomérisation de la bR, la monomérisation par le Triton prenant environ 48 heures en l'absence de QDs alors qu'elle ne prend que 6 heures avec des QDs. La vitesse de monomérisation est donc multipliée par un facteur huit simplement grâce à la présence des QDs. Toutefois, même si des explications de ce phénomène ont été avancées, ces résultats restent des résultats préliminaires et demandent à être confirmés par des expériences complémentaires.

Conclusion générale et perspectives

Au final ce travail de thèse a permis d'obtenir des résultats intéressants quant au couplage entre QDs CdSe/ZnS et la bR.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés optiques de ce complexe. Un transfert d'énergie apparaissant entre les deux composants du complexe, il a été nécessaire de vérifier la nature de ce transfert. Les différentes dépendances de ce transfert ont été traitées dans ce but. Tout d'abord, nous avons vérifié que la baisse d'intensité de PL observée n'était pas uniquement due à l'agrégation des particules dans la solution mais bel et bien à un transfert d'énergie. Pour cela, il a été nécessaire de produire des WMs, permettant ainsi d'avoir un échantillon témoin parfait, puisqu'il contient exactement les mêmes membranes contenant les mêmes protéines mais sans leur rétinal (composé responsable de l'absorption dans le visible). La dépendance vis-à-vis de l'intégrale de recouvrement (J) a été testée, montrant que le transfert d'énergie était plus important lorsque celle-ci était maximale. Dans ce but, nous avons utilisé trois échantillons de QDs, émettant à trois longueurs d'onde différentes. Le premier échantillon émettait à 570 nm soit au maximum d'absorption de la bR, les autres émettaient à 610 et 650 nm, soit partiellement et complètement en dehors de la zone d'absorption de la bR. L'échantillon émettant à 570 nm a montré une perte d'énergie d'environ 60 % là où les deux autres ne montraient que 25 et 10 %. Cette expérience a mis en lumière la dépendance du transfert d'énergie en fonction de l'intégrale de recouvrement, ce qui a apporté une preuve de plus en faveur du FRET.

Nous avons ensuite utilisé la chimie de surface des QDs pour modifier leurs propriétés. Effectivement, grâce à la méthode d'échange de ligands, nous avons pu créer des particules solubles dans l'eau avec des diamètres et des potentiels zêta différents. Ces différents types de QDs ont servi à plusieurs expériences, mettant en avant la dépendance de notre transfert d'énergie vis-à-vis de la distance donneur-accepteur. Grâce à des particules de même charge mais de diamètres différents, ainsi qu'à des particules de charge et de diamètre identiques, mais solubles à différents pH, nous avons montré une forte dépendance du transfert en terme de distance donneur-accepteur. Tous ces résultats nous ont amené à conclure que le transfert d'énergie observé était du FRET.

La nature de ces interactions a également été testée, à l'aide des différents potentiels zêta que nous pouvons atteindre grâce à la chimie de surface des QDs. En effet, nous avons montré que des interactions électrostatiques existaient entre bR et QDs. Les efficacités de transfert des différents types de QDs ont dévoilé une forte dépendance à la charge de surface des QDs. Le FRET entre les QDs quasiment neutres et la bR a été mesuré à 19 % au maximum, alors qu'il est de 70 % pour des QDs chargées positivement. L'hypothèse des

interactions électrostatiques a d'ailleurs été étayée par les images AFM du complexe. Les QDs positives étant les seules à s'adsorber à la surface des PMs dans les conditions d'imagerie fixées. Les autres types de QDs s'adsorbent préférentiellement à la surface du substrat (QDs PEG-COOH ou cystéinées) ou à l'interface PM-mica (PEG-OH). Ceci nous a donc clairement indiqué que ces interactions étaient de type électrostatique.

Même si ces interactions ont donné satisfaction, tant au niveau de l'efficacité du FRET que de l'organisation des QDs, nous avons tenté d'optimiser notre complexe à l'aide de la liaison quasi-covalente biotine-streptavidine. Cette optimisation a été motivée par le besoin de renforcer les interactions bR/QD qui ont clairement montré leurs limites lors de l'imagerie AFM. L'optimisation par la liaison biotine-streptavidine a donné lieu à un FRET de l'ordre de 80 %, qui pour notre système est la meilleure efficacité mesurée et laisse entrevoir des potentialités importantes.

Ce travail de thèse sur l'effet FRET pose les bases d'un nouveau matériau hybride bR/QD mais le développement de ce complexe n'en est encore qu'à ses débuts. Au niveau des perspectives sur cette partie du travail, plusieurs pistes pourront être explorées :

- ➔ Au vu de la réussite des liaisons biotine/streptavidine, un développement vers une liaison parfaitement covalente pourrait être développée. La chimie carbodiimide permettrait de greffer de façon covalente des QDs à la bR. Il existe de nombreux mutants de la protéine permettant d'avoir certains acides aminés accessibles ce qui favorise ce type de réaction chimique. Par exemple, un des acides aminés terminal peut être remplacé par une cystéine rendant la réaction chimique très sélective. La distance bR-QD sera alors faible et la liaison très forte.
- ➔ Les interactions électrostatiques ont été mises en évidence dans ce travail. Cependant aucune mesure de forces d'interaction entre bR et QDs n'a été réalisée pour confirmer directement ces interactions. En fonctionnalisant des pointes AFM avec des QDs chargées de différentes façons et en effectuant des courbes de forces entre ces pointes et des PMs, il sera possible de connaître les forces mises en jeu dans la formation du complexe bR/QD.
- ➔ Au niveau du développement d'un éventuel commutateur optique, il faudra que toute la surface de l'échantillon soit recouverte de PMs. De tels échantillons peuvent être élaborés par poly-électrolytes. Au niveau des composants envisagés, un commutateur tout-optique peut être fabriqué en utilisant un réseau de QDs émettant de la lumière à 600 nm qui sont liées à des PMs qui contiennent les

mutants D85N ou D85N/D96N de la bR. Ces deux mutants, à pH>9, absorbent la lumière à 412 nm, ainsi un effet FRET entre les QDs émettant à 600 nm et la bR absorbante n'existe pas. Si un laser ou une lampe excite l'émission des QDs à 600 nm, celles-ci émettent de la lumière sans affecter la photo-isomérisation de la bR, laquelle reste dans l'état M. Par contre, une excitation en lumière bleue (400 nm) causera une transition de l'état M (absorption à 412 nm) à un état d'absorption à 600 nm suivi d'un transfert d'énergie efficace entre QDs et bR. Ce transfert d'énergie éteindra transitoirement l'émission des QDs, constituant ainsi un nano-commutateur optique extrêmement rapide.

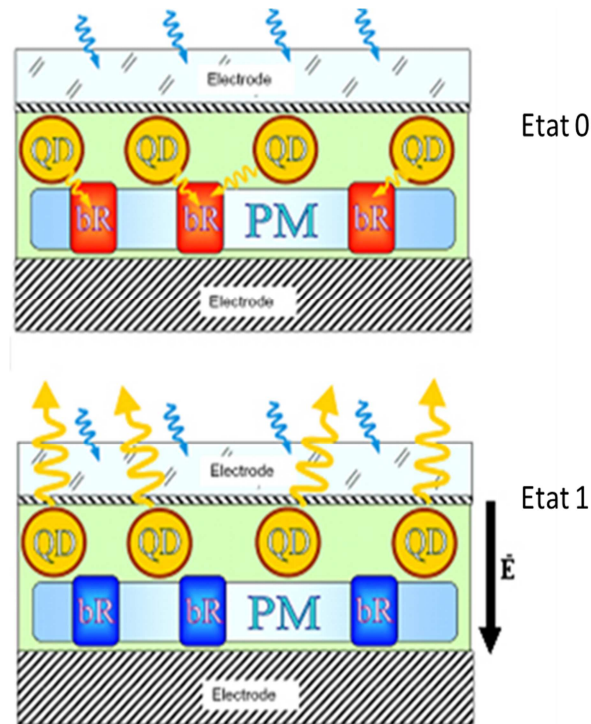


Figure 77 : Schéma du commutateur opto-électrique à base de QDs et de bR.

Par ailleurs, un autre commutateur optique contrôlé par champ électrique basé sur l'utilisation de QDs associées au mutant D85 N de la bR peut être réalisé (voir Figure 77). Le commutateur optique serait fabriqué en forme de sandwich construit à partir de 2 électrodes et 2 films. Les électrodes sont transparentes faites en verre et en couche mince conductrice d'ITO. Entre ces électrodes, les couches contenant la PM avec bR et la couche de QDs sont immobilisées. Le mutant D85N est rouge dans son état fondamental à pH neutre. A cause de l'effet FRET entre QDs et bR, le commutateur est dans l'état ouvert « off ». Le commutateur passe dans l'état fermé « on » quand le champ électrique est appliqué. Sous l'effet du champ électrique, le mutant D85N perd ses protons et

son maximum d'absorption se déplace à 410 nm (comme dans l'état M). Dans cet état, l'émission de fluorescence des QDs et l'absorption de la bR ne se recouvrent pas, le FRET n'est pas effectif et les QDs fluorescent efficacement.

- ➔ En plus des commutateurs, le complexe bR/QD peut être utilisé dans la fabrication de cellule solaire. Puisque la bR est une pompe à proton, elle peut créer un courant électrique. Il suffit de fabriquer des films de bR parfaitement orientés comprise entre deux substrats conducteurs et en contact avec un électrolyte. Dans ce cas, elle peut être utilisée comme cellule photovoltaïque. Cependant, elle reste transparente pour une grosse partie des spectres UV et visible. En greffant des QDs à la bR, plus de photons seront collectés par le système et l'énergie sera transférée par FRET des QDs vers les protéines, augmentant ainsi le rendement de la cellule.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons également montré que les QDs influençait la monomérisation de la bR et fluidifiait très rapidement les membranes en présence de détergent. Nous avons montré par dichroïsme circulaire et par AFM que les QDs seules n'ont pas d'influence sur le réseau cristallin de la bR et que le temps de monomérisation de la bR n'est que seulement de 6 heures en présence de Triton et de QDs, alors qu'il est de 48 heures environ sans les QDs. Ces propriétés jusqu'alors inconnues ouvrent de nouvelles perspectives à l'utilisation des QDs si les mécanismes expliquant ces effets sont clairement identifiés ce qui nécessitera des expériences supplémentaires.

- ➔ D'autres expériences de CD, permettant de tester l'effet des différents ligands à la surface des QDs sur la monomérisation devraient être conduites. Ceci nécessite une étude complète qui permettrait notamment de savoir si les QDs cystéinées sont un cas à part ou si toutes les QDs peuvent jouer le rôle de catalyseur de cette monomérisation. De plus, la solubilité et la stabilité d'autres types de QDs devraient être testées dans le Triton X-100, puisqu'aucune étude à ce jour n'a été réalisée. De même, une étude sur l'influence de la concentration en QDs sur la monomérisation de la bR pourrait servir à comprendre ce phénomène. Sa dépendance en concentration pourrait mettre en évidence si le rôle de catalyseur est dû à la surface des QDs, à leur volume, s'il existe un phénomène de saturation et si la vitesse de monomérisation peut encore être augmentée. Des études plus poussées permettraient sûrement de mettre en avant le type d'interaction qui existe entre bR, Triton et QDs lors de cette catalyse et le principe de cette

catalyse. En effet, il nous est impossible pour le moment d'émettre d'hypothèse sur la manière dont les QDs favorisent la monomérisation de la bR. Les deux études proposées couplées à des études de microcalorimétrie et de microscopie permettraient probablement de comprendre ce phénomène.

- Au niveau des applications, les QDs pourraient être utilisées pour permettre très vite et localement la perméabilité de membrane. Cette perméabilité localement élevée sera alors un atout important pour la pénétration de médicaments ou d'objet dans les cellules. De plus, il est possible de cibler parfaitement les endroits où les QDs doivent agir par simple modification de leur chimie de surface. Toutefois, pour pouvoir réaliser ce genre d'expérience il faut d'abord tester l'effet des QDs sur d'autres types de membranes. En effet, nous avons dans notre cas travaillé sur un objet d'étude à mi-chemin entre des bicouches lipidiques et des membranes cytoplasmiques complexes. Effectivement, les PMs ne sont formées que d'un seul type de protéine : la bR. C'est donc un objet assez spécifique qui diffère grandement de la grande majorité des membranes cellulaires. Des études sur d'autres membranes sont donc nécessaires.

Travaux associés

Publications scientifiques

N. Bouchonville, M. Molinari, A. Sukhanova, M. Artemyev, V. A. Oleinikov, M. Troyon, Igor Nabiev (2011) Charge-controlled assembling of Bacteriorhodopsin and semiconductor quantum dots for fluorescence resonance energy transfer-based nanophotonic applications. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 013703.

A. Rakovich, *A. Sukhanova*, *N. Bouchonville*, *E. Lukashev*, *V. Oleinikov*, *M. Artemyev*, *V. Lesnyak*, *N. Gaponik*, *M. Molinari*, *M. Troyon*, *Y. P. Rakovich*, *J.F. Donegan*, *I. Nabiev* (2010) Resonance energy transfer improves the biological function of bacteriorhodopsin within a hybrid material built from purple membranes and semiconductor quantum dots. , *NanoLetters*, **10** (7), 2640–2648.

Conference proceedings

N. Bouchonville, *M. Molinari*, *A. Sukhanova*, *M. Troyon*, *I. Nabiev* (2010) Fluorescence measurements and AFM imaging of bacteriorhodopsin coupled with CdSe quantum dots for optoelectronic applications.; *MRS Proceedings*, **1237**, 1237-TT10-03 doi:10.1557/PROC-1237-TT10-03

A. Rakovitch, *A. Sukhanova*, *N. Bouchonville*, *M. Molinari*, *M. Troyon*, *J.H.M. Cohen*, *Y.P. Rakovitch*, *J.F. Donegan*, *I. Nabiev* (2009) Energy transfer processes in semiconductor quantum dots-bacteriorhodopsin hybrid system. , *Proc. SPIE*, vol. **7366**, 736620.

Présentations orales

N. Bouchonville, *M. Molinari*, *A. Sukhanova*, *M. Troyon*, *I. Nabiev* (2011) Charge-Controlled Assembling of Bacteriorhodopsin and Semiconductor Quantum Dots for FRET-Based Nanophotonic Applications. *MRS Fall Meeting*, Boston, symposium HH, 28 November – 2 December 2011, Boston, USA.

N. Bouchonville, *M. Molinari*, *A. Sukhanova*, *M. Troyon*, *I. Nabiev* (2011) Hybrid material based on fluorescent CdSe/ZnS nanocrystals and photochromic protein bacteriorhodopsin for optoelectronic and photovoltaic applications. *Nano-Hybrides* **8**, 5-9 June 2011, Bastia, Corsica, France

A. Sukhanova, *N. Bouchonville*, *A. Rakovich*, *A. Le Cigne*, *M. Molinari*, *Y. P. Rakovich*, *J.F. Donegan*, *M. Troyon*, *V.A. Oleinikov*, *M. Artemyev*, *I. Nabiev* (2011) Energy transfer from quantum dots improves proton pumping and photovoltaic properties of membrane protein Bacteriorhodopsin within the QD/Bacteriorhodopsin hybrid material.; *241st ACS National Meeting and Exposition*, 27-31 March 2011, Anaheim, California, USA. Invited speaker: Prof. J.F. Donegan.

N. Bouchonville, *M. Molinari*, *M. Troyon* (2010) Liquid AFM imaging of nano-hybrid material based on bacteriorhodopsin and quantum dots. *11th Scanning Probe Microscopy Forum*, 15-18 March 2010, Mittelwihr, France

N. Bouchonville, *M. Molinari*, *A. Sukhanova*, *M. Troyon*, *I. Nabiev* (2009) Fluorescence measurements and AFM imaging of bacteriorhodopsin coupled with CdSe quantum dots for

optoelectronic applications. ; **MRS Fall Meeting**, Boston, symposium TT, 30 November – 5 December 2009, Boston, USA.

I. Nabiev, A. Rakovich, A. Sukhanova, N. Bouchonville, M. Molinari, M. Troyon, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, A.O. Govorov (2009) Resonance energy transfer from semiconductor quantum dots improves biological function of Bacteriorhodopsin within the bacteriorhodopsin-quantum dot hybrid material.; Nano South-West European Conference (NANOSWEC), **Bioinspired nanosystems and nanomaterials**, 2-4 November 2009, Bordeaux, France. Invited speaker: Prof. I. Nabiev.

A. Rakovich, A. Sukhanova, N. Bouchonville, M. Molinari, P. Gilliot, S. Haacke, M. Troyon, J.H.M. Cohen, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, I. Nabiev (2009) Hybrid material from fluorescent quantum dots and photochromic membrane protein bacteriorhodopsin: engineering and dynamic optical switching applications. ; SPIE Conference **European Microtechnologies for the New millennium**, 4-6 May 2009, Dresden, Germany. Invited speaker: A. Rakovich.

Présentation par posters

A. Rakovitch, P. Gilliot, S. Haacke, A. Sukhanova, N. Bouchonville, M. Molinari, M. Troyon, J.H.M. Cohen, Y.P. Rakovitch, J.F. Donegan, I. Nabiev (2009) Hybrid material from fluorescent quantum dots and photochromic membrane protein bacteriorhodopsin: engineering and dynamic optical switching applications. **First International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials**, 15-19 March 2009, Tours, France.

N. Bouchonville, M. Molinari, A. Sukhanova, M. Troyon, I. Nabiev (2009) Fluorescence measurements and AFM imaging of bacteriorhodopsin coupled with CdSe quantum dots for optoelectronic applications. **Nano 09** Conference, 28-30 September 2009, Donostia-San Sebastian, Spain.

N. Bouchonville, M. Molinari, A. Sukhanova, M. Troyon, I. Nabiev. A new nanohybrid material made with protein bacteriorhodopsin and CdSe quantum dots: influence of surface charges. **NanoSmat-5**, 19-21 October 2010, Reims, France.

Bibliographie

- [1] J. Bardeen and W. Brattain, "The transistor, a semi-conductor triode," *Phys. Rev.*, vol. 74, pp. 230-231, 1948.
- [2] J. S. Kilby, "Miniaturized Electronic Circuits," 3138743, Feb. 06, 1959.
- [3] R. N. Noyce, "Semiconductor Device-and-lead Structure," 2981877, July 30, 1959.
- [4] Gordon E. Moore, "Cramming more components onto Integrated Circuits," *Electronics Magazine*, vol. 8, no. 38, pp. 114-117, 1965.
- [5] A. E. Brenner, "Moore's Law," *science*, vol. 275, no. 5306, pp. 1401-1404, 1997.
- [6] Mark Lundstrom, "Moore's law forever?," *science*, vol. 299, no. 5604, pp. 210-211, 2003.
- [7] L. B. Kish, "End of Moore's law : thermal (noise) death of integration in micro and nano electronics," *Physics letters A*, vol. 3-4, no. 305, pp. 144-149, 2002.
- [8] B. Arkles, "Commercial applications of sol-gel-derived hybrid materials," *MRS Bulletin*, vol. 26, p. 402, 2001.
- [9] W.D. Zhang, B. Xu, and L.C. Jiang, "Functional hybrid materials based on carbon nanotubes and metal oxides," *Journal Cover: J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 6383-6391, vol. 20, no. 31, pp. 6383-6391, 2010.
- [10] L. Zhang, T. Li, B. Li, J. Li, and E. Wang, "Carbon nanotube–DNA hybrid fluorescent sensor for sensitive and selective detection of mercury(II) ion," *chemical communications*, vol. 46, no. 9, pp. 1476-1478, 2010.
- [11] C. Laberty-Robert, K. Vallé, F. Pereira, and C. Sanchez, "Design and properties of functional hybrid organic–inorganic membranes for fuel cells ," *chemical society review*, vol. 40, no. 2, pp. 961-1005, 2011.
- [12] R. Pardo, M. Zayat, and D. Levy, "Photochromic organic–inorganic hybrid materials," *chemical society review*, vol. 40, no. 2, pp. 672-687, 2011.
- [13] J. A. Chang et al., "High-Performance Nanostructured Inorganic–Organic Heterojunction Solar Cells," *Nano Letters*, vol. 10, no. 7, pp. 2609-2612, 2010.
- [14] P. Barpanda, K. Djellab, N. Recham, M. Armand, and J.M. Tarascon, "Direct and modified ionothermal synthesis of LiMnPO₄ with tunable morphology for rechargeable Li-ion batteries," *journal of materials chemistry*, vol. 21, no. 27, pp. 10143-10152, 2011.
- [15] B. Lebeau and P. Innocenzi, "Hybrid materials for optics and photonics," *chemical*

- society review*, vol. 40, no. 2, pp. 886-906, 2011.
- [16] L.D. Carlos, R.A.S. Ferreira, V. deza Bermudez, B.Julian-Lopez, and P. Escribano, "progress on lanthanide-based organic-inorganic hybrid phosphors," *Chemical society review*, vol. 40, no. 2, pp. 536-549, 2011.
- [17] D. Oesterhelt and W. Stoeckienus, "Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium," *Nature New biol.*, vol. 233, pp. 149-152, 1971.
- [18] D. Oesterhelt, "photoinduzierte mikrostrukturierung und anisotropie in bakteriorhodopsin filmen," *Nova acta Leopoldina*, vol. 55, no. 246, pp. 21-28, 1982.
- [19] I. Szundi and W. Stoeckienus, "surface pH controls purple-to-blue transition of bR," *biophysic journal*, no. 56, pp. 369-383, 1989.
- [20] H. Michel, D. Oesterhelt, and R. Henderson, "Orthorhombic two-dimensional crystal form of purple membrane," *Proceeding of the National Academy of Science*, vol. 77, no. 1, pp. 338-342, janvier 1980.
- [21] V. Erokhin, P. Facci, A. Kononenko, G. Radicchi, and C. Nicolini, "On the role of molecular close packing on the protein thermal stability," *Thin solid films*, vol. 284-285, pp. 805-808, 1996.
- [22] J. Caldera, M.L. Galisteo, M. Sabes, P.L. Mateo, and E. Padros, *European journal of biochemistry*, vol. 2, no. 207, pp. 581-585, 1992.
- [23] Y. Shen, C.R. Safinya, K.S. Liang, A.F. Ruppert, and K.J. Rothschild, "Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 C in two-dimensional films," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 48-50, 1993.
- [24] S. Messaoudi, K.H. Lee, D. Beaulieu, J. Baribeau, and F. Boucher, "Equilibria between multiple spectral forms of bacteriorhodopsin effect of delipidation, anesthetics and solvents on their pH dependence," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1140, no. 1, pp. 45-52, 1992.
- [25] E. Bamberg, N.A. Dencher, A. Fahr, and M.P. Heyn, "Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers," *Proceeding of the national american society*, vol. 77, no. 12, pp. 7502-7506, 1981.
- [26] M. Eisenbach and S.R. Caplan, "Interaction of purple membrane with solvents," *biochimia biophysica acta*, vol. 554, pp. 281-292, 1979.
- [27] M. Eisenbach and S.R. Caplan, "Interaction of purple membrane with solvents,"

- Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 554, no. 2, pp. 269-280, 1979.
- [28] G. Váró and L. Keszthelyi, "Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of *Halobacterium halobium*," *Biophysical Journal*, vol. 43, no. 1, pp. 47-51, 1983.
- [29] J.L. Howland, "Electrogenic ion pumps," *Biochemical Education*, vol. 20, no. 4, p. 243, 2010.
- [30] K. Mitsuoka et al., "the structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution Based on electron crystallography : implication of the charge distribution," *Journal of molecular biology*, no. 286, pp. 861-882, 1999.
- [31] J.K. Lanyi, "X-Ray cristallography of bacteriorhodopsin and its photointermediates : insights into the mechanism of proton transport," *biochemistry (moscow)*, vol. 66, no. 11, pp. 1192-1196, 2001.
- [32] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, and E. Landau, "Hight resolution X-ray structure of bacteriorhodopsin from microcrystals grown in lipidic cubic phases," *science*, vol. 277, no. 5332, pp. 1676-1681, 1997.
- [33] R. Henderson and P. N. Unwin, "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy," *nature*, vol. 257, no. 5521, pp. 28-32, 1975.
- [34] H. Belrhali et al., "Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9Å resolution," *structure*, vol. 7, no. 8, pp. 909-917, 1999.
- [35] Z. Dancshazy, G.I. Groma, D. Oesterhelt, and J. Tittor, "The photochemical cycle of bacteriorhodopsin has no refractory period," *journal of FEBS letters*, vol. 196, no. 2, pp. 198-202, 1986.
- [36] G. Varo and J.K. Lanyi, "Kinetic and spectroscopic evidence for an irreversible step between deprotonation and reprotonation of the Schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle," *biochemistry*, vol. 30, no. 20, pp. 5008-5015, 1991.
- [37] L. Zimanyi et al., "the two consecutive M substates in the photocycle of bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue replacements," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 55, no. 6, pp. 1049-1055, 1992.
- [38] A. Propp, M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Brauchle, and D. Oesterhelt, "Photochemical conversion of the O-intermediate to 9-cis-retinal-containing products in

- bacteriorhodopsin films," *Biophysical Journal*, vol. 65, no. 4, pp. 1449-1459, 1993.
- [39] J.R. Tallent et al., "Photochemistry in dried polymer films incorporating the deionized blue membrane form of bacteriorhodopsin," *biophysical journal*, vol. 75, no. 4, pp. 1619-1634, 1998.
- [40] G. Varo and J.K. Lanyi, "Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH," *Biophysical Journal*, vol. 56, no. 6, pp. 1143-1151, 1989.
- [41] H.J.M. De Groot et al., "Solid-state carbon-13 and nitrogen-15 NMR study of the low pH forms of bacteriorhodopsin," *Journal of biochemistry*, vol. 29, no. 29, pp. 6873-6883, 1990.
- [42] C.H. Chang, J.G. Chen, R. Govindjee, and T. Ebrey, "Cation binding by bacteriorhodopsin," *Proceedings of the national academy of sciences USA*, vol. 82, no. 2, pp. 396-400, 1985.
- [43] S.Y. Liu and T. Ebrey, "A new method to prepare blue membrane by removing the cations from the purple membrane by electrolysis," *Photochemistry and photobiology*, vol. 46, no. 4, pp. 557-559, 1987.
- [44] C.H. Chang, S.Y. Liu, R. Jonas, and R. Govindjee, "The Pink Membrane: The Stable Photoproduct of Deionized Purple Membrane," *biophysical journal*, vol. 52, no. 4, pp. 617-623, 1987.
- [45] G. Metz, F. Siebert, and M. Engelhard, "Asp85 is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin A solid-state¹³C CP-MAS NMR investigation," *FEBS Letters*, vol. 303, no. 2-3, pp. 237-241, 1992.
- [46] H. Otto et al., "Substitution of amino acids Asp-85, Asp-212, and Arg-82 in bacteriorhodopsin affects the proton release phase of the pump and the pK of the Schiff base," *Proceedings of the national academy of sciences USA*, vol. 87, no. 3, pp. 1018-1022, 1990.
- [47] S.Y. Liu and T.G. Ebrey, "The quantum efficiency for the interphotoconversion of the blue and pink forms of purple membrane," *Photochemistry and photobiology*, vol. 46, no. 4, pp. 263-267, 1987.
- [48] D. Oesterhelt, "Bacteriorhodopsin as a light-drive ion exchanger?," *FEBS letters*, vol. 64, pp. 20-22, 1976.

- [49] G. Hind and J.D. Mills, "Photodesalination by membranes containing bacteriorhodopsin," *Proceedings of the international symposium on biological Applied solar energy*, pp. 175-180, 1978.
- [50] E.P. Lukashov, S.Y. Zaitsev, A.A. Kononenko, and V.P. Zubov, "Photo-electrical properties of bacteriorhodopsin in Langmuir films," *STUDIA BIOPHYSICA*, vol. 132, no. 1-2, pp. 111-118, 1989.
- [51] H. Sasabe, T. Furuno, and K. Takimoto, "Photovoltaics of photoactive protein/polypeptide LB films," *Synthetic metals*, vol. 28, no. 1-2, pp. 787-792, 1989.
- [52] K. Koyama, N. Yamaguchi, and T. Myasaka, "Antibody-mediated bacteriorhodopsin orientation for molecular device architectures," *science*, vol. 265, no. 5173, pp. 762-765, 1994.
- [53] J.A. He, L. Samuelson, J. Kumar L. Li, and S.K. Tripathy, "Bacteriorhodopsin Thin-Film Assemblies—Immobilization, Properties, and Applications," *advances material*, vol. 11, no. 6, pp. 435-446, 1999.
- [54] Y.D. Jin, N. Friedman, M. Sheves, and D. Cahen, "Bacteriorhodopsin-Monolayer-Based Planar Metal–Insulator–Metal Junctions via Biomimetic Vesicle Fusion: Preparation, Characterization, and Bio-optoelectronic Characteristics," *advanced functional material*, vol. 17, no. 8, pp. 1417-1428, 2007.
- [55] Y.D. Jin, N. Friedman, M. Sheves, T. He, and D. Cahen, "Bacteriorhodopsin (bR) as an electronic conduction medium: Current transport through bR-containing monolayers," *PNAS*, vol. 103, no. 23, pp. 8601-8606, 2006.
- [56] H. W. Trissl, "Photoelectric measurements of purple membranes.," *photochemistry and photobiology*, vol. 51, pp. 793-818, 1990.
- [57] P. Bhattacharya, J. Xu, G. Varo, D.L. Marcy, and R.R. Birge, "Monolithically integrated bacteriorhodopsin-GaAs field-effect transistor photoreceiver," *optics letters*, vol. 27, pp. 839-841, 2002.
- [58] K. Koyama, N. Yamaguchi, and T. Myasaka, "Molecular organization of bacteriorhodopsin films in optoelectronic devices," *advanced material*, vol. 7, no. 6, pp. 590-594, 1995.
- [59] T. Myasaka, K. Koyama, and I. Itoh, "Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor," *science*, vol. 255, no. 5042, pp. 342-344, 1992.

- [60] C. Horn and C. Steinem, "Photocurrents generated by bacteriorhodopsin adsorbed on nano-black lipid membranes," *Biophysical journal*, vol. 89, no. 2, pp. 1046-1054, 2005.
- [61] G. Varo, *acta biologica academiae scientiarum hungaricae*, vol. 32, pp. 301-310, 1982.
- [62] A.A. Kononenko et al., "Oriented purple-membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. II. Photoelectric processes," *biochimica biophysica acta*, vol. 892, no. 1, pp. 56-67, 1987.
- [63] R. Simmeth and G.W. Rayfield, "Evidence that the photoelectric response of bacteriorhodopsin occurs in less than 5 picoseconds ," *biophysical journal*, vol. 57, no. 5, pp. 1099-1101, 1990.
- [64] L.M. Zhang, T.Y. Zeng, K. Cooper, and R.O. Claus, "High-Performance Photovoltaic Behavior of Oriented Purple Membrane Polymer Composite Films ," *biophysical journal*, vol. 84, no. 4, pp. 2502-2507, 2003.
- [65] H.E.M. Niemi, M. Ikonen, J.M. Levlín, and H. Lemmetyinen, *Langmuir*, vol. 9, pp. 2436-2447, 1993.
- [66] R. Garcia, J. Tamayo, and C. Bustamante, *Internationnal journal of imaging system technologies*, vol. 8, pp. 168-174, 1997.
- [67] R. Garcia, *applied physics letters*, vol. 64, pp. 1162-1164, 1994.
- [68] J. Xu, D.L. Marcy P. Bhattacharya, J.A. Stuart, and R.R. Birge, *electronic letters*, vol. 37, pp. 648-649, 2001.
- [69] M. Irie, "Photochromism: Memories and Switches," *chemical reviews*, vol. 100, no. 5, pp. 1683-1684, 2000.
- [70] Y. Yokoyama, "Fulgides for Memories and Switches," *chemical reviews*, vol. 100, no. 5, pp. 1717-1739, 2000.
- [71] G.P. Borisevitch, E.P. Lukashev, A.A. Kononenko, and A.B. Rubin, *biochimica biophysica acta*, vol. 546, pp. 171-174, 1979.
- [72] P. Kolodner, E.P. Lukashev, Y.C. Ching, and A.B. Druskho, *thin solid films*, vol. 302, no. 1-2, pp. 231-234, 1997.
- [73] A. Popp, M. Wolperdinger, N. Hampp, C. Brauchle, and D. Oesterhelt, *Biophysical journal*, vol. 65, no. 4, pp. 1449-1459, 1993.
- [74] R.R. Birge, 559 732, 1994.
- [75] R.R. Birge et al., *molecular crystal liquid crystal science and technologies B*, vol. 3, pp.

- 133-148, 1993.
- [76] R.R. Birge and D.S.K. Govender, 559 732, 1991.
- [77] D.A. Parthenopoulos and P.M. Rentzepis, *Science*, vol. 245, pp. 843-845, 1989.
- [78] R.R. Birge, *Scientific american journal*, vol. 3, pp. 90-95, 1995.
- [79] E. Korchemskaya, M. Soskon, T. Dyukova, and N. Vsevolodov, *SPIE Proceedings*, vol. 2083, pp. 217-224, 1993.
- [80] R. Thoma, N. Hampp, C. Brauchle, and D. Oesterhelt, *optical letters*, vol. 16, no. 9, pp. 651-653, 1991.
- [81] T. Okamoto, I. Yamaguchi, and K. Yamagata, *optical letters*, vol. 22, no. 5, pp. 337-339, 1997.
- [82] E.Y. Korchemskaya, M.S. Soskin, and V.B. Taranenko, *Kvantovaya elektron*, vol. 14, pp. 714-721, 1987.
- [83] O. Werner, B. Fischer, A. Lewis, and I. Nebenzhal, *optical letters*, vol. 15, no. 20, pp. 1117-1119, 1990.
- [84] Y. Okada, I. Yamaguchi, J. Otomo, and H. Sasabe, *Reza kagaku kenkyu*, vol. 13, pp. 151-153, 1991.
- [85] N. Hampp, R. Thoma, D. Osterhelt, and C. Brauchle, *Applied optics*, vol. 1, no. 11, pp. 1834-1841, 1992.
- [86] N. Hampp, R. Thoma, D. Osterhelt, and C. Brauchle, *SPIE Proceedings*, vol. 1732, pp. 260-270, 1993.
- [87] R. Thoma, M. Dratz, and N. Hampp, *optical engeneering*, vol. 34, pp. 1345-1351, 1995.
- [88] R. Thoma and N. Hampp, *optical letters*, vol. 19, pp. 1364-1366, 1994.
- [89] Y.O. Barmenkov et al., *sovietic physics acoustic*, vol. 33, pp. 334-335, 1987.
- [90] N.M. Kozhevnikov and Y.O. Barmenkov, *SPIE Proceedings*, vol. 1584, pp. 387-395, 1991.
- [91] D. Zeisel and N. Hampp, *molecular crystals liquid crystals science and technologies*, pp. 371-374, 1994.
- [92] T. Renner and N. Hampp, *optic communication*, vol. 96, pp. 142-149, 1993.
- [93] B.O. Dabbousi et al., "(CdSe)ZnS Core-shell quantum dots : synthesis and characterization of a size series of higly luminescent nanocrystallites.," *Journal of*

Physical Chemistry, vol. 101, no. 46, pp. 9463-9475, 1997.

- [94] H. Li and W.Y. Shih, "Synthesis and characterization of aqueous carboxyl-capped CdS quantum dots for bioapplications," *industrial and engineering chemistry research*, vol. 46, pp. 2013-2019, 2007.
- [95] Z. Sedaghat, N. Taghavinia, and M. Marandi, "Thermal control of the size and crystalline phase of CdS nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 3812-3816, 2006.
- [96] Q. Wang et al., "Bovine serum albumin-directed synthesis of biocompatible CdSe quantum dots and bacteria labeling," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 355, no. 1, pp. 9-14, 2011.
- [97] S. J. Rosenthal, J. McBride, S. J. Pennycook, and L. C. Feldman, "Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals," *Surface Science Reports*, vol. 62, no. 4, pp. 111-157, 2007.
- [98] Y.-x. YAN et al., "Novel Strategy for Synthesis of High Quality CdTe Nanocrystals in Aqueous Solution," *Chemical Research in Chinese Universities*, vol. 24, no. 1, pp. 8-14, 2008.
- [99] J. Liu, Z. Shi, Y. Yu, R. Yang, and S. Zuo, "Water-soluble multicolored fluorescent CdTe quantum dots: Synthesis and application for fingerprint developing," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 342, no. 2, pp. 272-282, 2010.
- [100] M. Li et al., "Direct synthesis of monodispersed ZnO nanoparticles in an aqueous solution," *Materials Letters*, vol. 61, no. 3, pp. 690-693, 2007.
- [101] R. Kho, C. L. Torres-Martínez, and R. K. Mehra, "A Simple Colloidal Synthesis for Gram-Quantity Production of Water-Soluble ZnS Nanocrystal Powders," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 227, no. 2, pp. 561-566, 2000.
- [102] S. Jana, I. C. Baek, M. A. Lim, and S.-I. Seok, "ZnSe colloidal nanoparticles synthesized by solvothermal method in the presence of ZrCl₄," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 322, no. 2, pp. 473-477, 2008.
- [103] A. L. Efros, "Interband absorption of light in a semiconductor sphere," *Soviet Physics Semiconductors USSR*, vol. 16, no. 7, pp. 772-775, 1982.
- [104] L.E. Brus, "Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state," *Journal of Chemical Physics*, vol. 80, no. 9, pp. 4403-4409, 1984.

- [105] M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, and L. E. Brus, "The Quantum Mechanics of Larger Semiconductor Clusters ("Quantum Dots")," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 41, pp. 477-496, 1990.
- [106] L.E. Brus, "Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory," *Jouranal of physical chemistry*, vol. 90, no. 12, pp. 2555–2560, 1986.
- [107] Q. Zhao et al., "Shape Dependence of Band-Edge Exciton Fine Structure in CdSe Nanocrystals," *Nano Letters*, vol. 7, no. 11, pp. 3274-3280, 2007.
- [108] M. Nirmal, D. J. Norris, M. Kuno, and M. G. Bawendi, "Observation of the "Dark Exciton" in CdSe Quantum Dots," *Physic review letters*, vol. 75, no. 20, pp. 3728-3721, 1995.
- [109] A. M. Kapitonov et al., "Luminescence properties of thiol-stabilized CdTe nanocrystals," *journal of physical chemistry B*, vol. 103, no. 46, pp. 10109-10113, 1999.
- [110] A. L. Rogach, D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig, and N. A. Kotov, "'Raisin Bun"-Type Composite Spheres of Silica and Semiconductor Nanocrystals," *chemical of materials*, vol. 12, no. 9, pp. 2676-2685, 2000.
- [111] M. J. Bowers, J. R. McBride, and S. J. Rosenthal, "White-Light Emission from Magic-Sized Cadmium Selenide Nanocrystals," *Journal of american chemical society*, vol. 127, no. 44, pp. 15378-15379, 2005.
- [112] Y. -W. Lin, M. -H. Hsieh, C. -P. Liu, and H. -T. Chang, "Photoassisted synthesis of CdSe and core-shell CdSe/CdS quantum dots," *Langmuir*, vol. 21, no. 2, pp. 728-734, 2005.
- [113] P. Reiss, M. Protière, and L. Li, "Core/Shell Semiconductor Nanocrystals," *small*, vol. 5, no. 2, pp. 154-168, 2009.
- [114] D. Battaglia, J.J. Li, Y. Wang, and X. Peng, "Colloidal Two-Dimensional Systems: CdSe Quantum Shells and Wells," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, no. 41, pp. 5035-5039, 2003.
- [115] S. Kim, B. Fisher, H. J. Eisler, and M. Bawendi, "Type-II Quantum Dots: CdTe/CdSe(Core/Shell) and CdSe/ZnTe(Core/Shell) Heterostructures," *Journal of american chemical society*, vol. 125, no. 38, pp. 11466-1467, 2003.
- [116] R. G. Xie, X. H. Zhong, and T. Basché, "Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Type-II Core/Shell Semiconductor Nanocrystals with ZnTe Cores," *Advanced*

- material*, vol. 17, pp. 2741-2744, 2005.
- [117] H. Zajicek et al., "Photoluminescence from ultrathin ZnSe/CdSe quantum wells ," *applied physics letters*, vol. 62, no. 7, pp. 717-719, 1993.
- [118] M. Nirmal et al., "Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals," *nature*, vol. 383, pp. 802-804, 1996.
- [119] A.L. Efros and M. Rosen, "Random Telegraph Signal in the Photoluminescence Intensity of a Single Quantum Dot," *Physical review letters*, vol. 78, no. 6, pp. 1110-1113, 1997.
- [120] R. Verberk, A. M. van Oijen, and M. Orrit, "Simple model for the power-law blinking of single semiconductor nanocrystals," *Physic review B*, vol. 66, no. 23, p. 233202, 2002.
- [121] K. T. Shimizu et al., "Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots," *physic review B*, vol. 63, no. 20, p. 205316, 2001.
- [122] P. A. Frantsuzov and R. A. Marcus, "Explanation of quantum dot blinking without the long-lived trap hypothesis," *physic review B*, vol. 72, no. 15, p. 155321, 2005.
- [123] S. Rosen, O. Schwartz, and D. Oron, "Transient fluorescence of the off state in blinking CdSe/CdS/ZnS Semiconductor Nanocrystals is not governed by auger recombination," *Physical review letters*, vol. 104, no. 15, p. 157404, 2010.
- [124] A. Sukhanova et al., "Highly Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin-Embedded Tissue Sections," *laboratory investigations*, vol. 82, no. 9, pp. 1259-1261, 2002.
- [125] C.-A. J. Lin et al., "Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating," *small*, vol. 4, no. 3, pp. 334-341, 2008.
- [126] T. Pelegriano et al., "On the Development of Colloidal Nanoparticles towards Multifunctional Structures and their Possible Use for Biological Applications," *small*, vol. 1, no. 1, pp. 49-63, 2005.
- [127] A. Sukhanova and I. Nabiev, "Fluorescent nanocrystal-encoded microbeads for multiplexed cancer imaging and diagnosis ," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 68, no. 1, pp. 39-59, 2008.
- [128] C. Roh, H.-Y. Lee, S.-E. Kim, and S.-K. Jo, "Quantum-dots-based detection of hepatitis C virus (HCV) NS3 using RNA aptamer on chip," *journal of chemical technology and*

- biotechnology*, vol. 85, no. 8, pp. 1130-1134, 2010.
- [129] Z. Ding et al., "Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots," *Science*, vol. 296, no. 5571, pp. 1293-1297, 2002.
- [130] J. Lei and H. Ju, "Fundamentals and bioanalytical applications of functional quantum dots as electrogenerated emitters of chemiluminescence," *Trends in Analytical Chemistry*, 2011.
- [131] C.-C. Chang et al., "A Surface Plasmon Enhanced Infrared Photodetector Based on InAs Quantum Dots," *Nano letters*, vol. 10, no. 5, pp. 1704-1709, 2010.
- [132] A. J. Nozik et al., "Semiconductor Quantum Dots and Quantum Dot Arrays and Applications of Multiple Exciton Generation to Third-Generation Photovoltaic Solar Cells," *chemical review*, vol. 110, no. 11, pp. 6873-6890, 2010.
- [133] S.J. Gallagher, B. Norton, and P.C. Eames, "Quantum dot solar concentrators: Electrical conversion efficiencies and comparative concentrating factors of fabricated devices ," *solar energy*, vol. 81, no. 6, pp. 813-821, 2007.
- [134] S. M. Geyer, J. M. Scherer, N. Moloto, F. B. Jaworski, and and M. G. Bawendi, "Efficient Luminescent Down-Shifting Detectors Based on Colloidal Quantum Dots for Dual-Band Detection Applications," *ACS Nano*, 2011.
- [135] A. Lochmann et al., "Electrically pumped, micro-cavity based single photon source driven at GHz," *electronic letters*, vol. 45, pp. 566-567, 2009.
- [136] E. Stock et al., "High-speed single-photon source based on self-organized quantum dots," *Semiconductor Science and Technology*, vol. 26, no. 1, 2011.
- [137] J. R. Lakowicz, *principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., springer, Ed., 2006.
- [138] R.M. Clegg, *Fluorescence resonance energy transfer in fluorescence imaging spectroscopy and microscopy*, XF Wang and B Herman, Eds. New York: John Wiley & sons.
- [139] B. W. Van Der Meer, G. Coker III, and S.-Y. Simon Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*. New york: John Wiley & Sons, 1994.
- [140] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, "Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane," *Methods in Enzymology*, vol. 31, pp. 667-678, 1974.
- [141] D. Birnbaum and S. Seltzer, "A HIGHLY REACTIVE HETEROATOM ANALOG OF

- RETINAL AND ITS INTERACTION WITH BACTERIORHODOPSIN," *Photochemistry and photobiology*, vol. 39, no. 6, pp. 745-752, 1984.
- [142] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites," *Journal of american chemical society*, vol. 115, no. 19, pp. 8706-8715, 1993.
- [143] L. Qu and X. Peng, "Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth," *Journal of american shemical society*, vol. 124, pp. 2049-2055, 2002.
- [144] L. Qu, A. Peng, and X. Peng, "Alternative routes toward high quality CdSe nanocrystals," *Nano Letters*, vol. 1, pp. 333-337, 2001.
- [145] D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, and H. Weller, "Highly luminescent monodisperse CdSe and (CdSe)ZnS nanocrystals synthesized in a hexadecylamine-trioctylphosphine oxide-trioctylphosphine mixtute," *nano Letters*, vol. 1, pp. 207-211, 2001.
- [146] M. Rehorek and M. P. Heyn, "Binding of all-trans-Retinal to the Purple Membrane. Evidence for Cooperativity and Determination of the Extinction Coefficient," *biochemistry*, vol. 18, no. 22, pp. 4973-4983, 1979.
- [147] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, "Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals," *Chem. Mater.*, vol. 15, pp. 2854-2860, 2003.
- [148] J. Jasieniak, L. Smith, J. van Embden, and P. Mulvaney, "Re-examination of the Size-Dependent Absorption Properties of CdSe Quantum Dots," *Journal of physical chemistry*, vol. 113, pp. 19468–19474, 2009.
- [149] Y. Jobin, "A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields".
- [150] A. Diaspro, *confocal and two-photon microscopy foundations, applications and advances*. New jersey: Wiley-Liss, 2002, vol. 56.
- [151] H. Vogel and W. Gärtner, "The secondary structure of bacteriorhodopsin determined by Raman and circular dichroism spectroscopy," *Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 24, pp. 11464-11469, 1987.
- [152] M.P. Heyn, P.J. Bauer, and N.A. Dencher, "A natural CD label to probe the structure of the purple membrane from Halobacterium halobium by means of exciton coupling

- effects.," *Biochemical and biophysical research communications* , vol. 67, no. 3, pp. 897-903, 1975.
- [153] S. Nishimura, H. Tateyama, K. Tsunematsu, and K. Jinnai, "Zeta Potential Measurement of Muscovite Mica Basal Plane-Aqueous Solution Interface by Means of Plane Interface Technique," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 152, no. 2, pp. 359-367, 1992.
- [154] D.J. Muller and A. Engel, "Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins," *Nature protocol*, vol. 2, no. 9, pp. 2191-2197, 2007.
- [155] Z. Tang, N.A. Kotov, and M. Giersig, "Spontaneous organization of single CdTe nanoparticles into luminescent nanowires," *Science*, vol. 297, pp. 237-240, 2002.
- [156] V. Poderys, M. Matulionyte, A. Selskis, and R. Rotomskis, "Interaction of water soluble CdTe Quantum dots with bovine serum albumin," *nanoscale research letters*, vol. 6, no. 9, 2011.
- [157] I. Nabiev et al., "Fluorescent Quantum Dots as Artificial Antennas for Enhanced Light Harvesting and Energy Transfer to Photosynthetic Reaction Centers (supplementary information)," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 40, pp. 7217-7221, 2010.
- [158] R. Li, C.M. Li, H. Bao, and Q. Bao, "Stationary current generated from photocycle of a hybrid bacteriorhodopsin/quantum dot bionanosystem," *Applied Physics Letters*, vol. 91, p. 223901, 2007.
- [159] M. H. Griep, K.A. Walczak, E.M. Winder, D.R. Lueking, and C.R. Friedrich, "Quantum dot enhancement of bacteriorhodopsin-based electrodes," *Biosensors and bioelectronics*, vol. 25, pp. 1493-1497, 2010.
- [160] A.R. Clapp et al., "Fluorescence energy transfer between QD donor and dye-labeled protein acceptors," *JACS*, vol. 126, pp. 301-310, 2004.
- [161] I.L. Medintz et al., "Resonance energy transfer between luminescent quantum dots and diverse fluorescent protein acceptors," *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, vol. 113, no. 43, pp. 18552-18561, 2010.
- [162] T. Kouyama, K. Kinosita, and A. Ikegami, "Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin," *Biophysical journal*, vol. 47, pp. 43-54, 1985.
- [163] A. Sukhanova et al., "Energy transfer from quantum dots improves proton pumping and

- photovoltaic properties of membrane protein bacteriorhodopsin within the QD/bR hybrid material," *american chemical society proceedings*, vol. 55, no. 1, 2010.
- [164] G. Giraud et al., "Fluorescence Lifetime Imaging of Quantum Dot Labeled DNA microarrays," *international journal of molecular science*, vol. 10, pp. 1930-1941, 2009.
- [165] A. Rakovich et al., "Energy transfer processes in semiconductor quantum dots: bacteriorhodopsin hybrid system," *SPIE Proceedings*, vol. 7366, 2009.
- [166] S.V. Gaponenko, *optical properties of semiconductor nanocrystals*, Cambridge University Press, Ed. Cambridge, 1998.
- [167] A.L. Efros and M. Rosen, "The electronic structure of semiconductor nanocrystals," *Annual Review of Materials Science*, vol. 30, pp. 475-521, 2000.
- [168] I.L. Medintz et al., "Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors," *Nature materials*, vol. 2, pp. 630-638, 2003.
- [169] E.G. Maksimov et al., "Hybrid systems of quantum dots mixed with the photosensitive protein Phycoerythrin," *Nanotechnologies in Russia*, vol. 5, no. 7-8, pp. 531-537, 2010.
- [170] T. Pons, I.L. Medintz, X. Wang, D.S. English, and H. Mattoussi, "Solution-phase single quantum dot fluorescence resonance energy transfer," *JACS*, vol. 128, pp. 15324-15331, 2006.
- [171] N. Hampp, "Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories," *chemical review*, vol. 100, pp. 1755-1776, 2000.
- [172] D.J. Müller, F.A. Schabert, G. Büldt, and A. Engel, "Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Sub-Nanometer Resolution by Atomic Force Microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 68, pp. 1681-1686, 1995.
- [173] Z. Zhelev et al., "Enhancement of the photoluminescence of CdSe quantum dots during long term UV irradiation: privilege or fault in life science research?," *Journal of Photochemistry and Photobiology*, vol. 75, pp. 99-105, 2004.
- [174] O. H. Laitinen, V. P. Hytönen, H. R. Nordlund, and M. S. Kulomaa, "Genetically engineered avidins and streptavidins," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, pp. 2992-3017, 2006.
- [175] T. Su, S. Zhong, Y. Zhang, and K.-S. Hu, "Asymmetric distribution of biotin labeling on the purple membrane," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 92, no. 2, pp. 123-127, 2008.

- [176] S.A. Darst et al., "Two-dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules," *Biophysical Journal*, vol. 59, no. 2, pp. 387-396, 1991.
- [177] S. Wu, E.S. Awad, and M.A. El-Sayed, "Circular dichroism and photocycle kinetics of partially detergent solubilized and partially retinal regenerated bacteriorhodopsin," *Biophysical Journal*, vol. 59, pp. 70-75, 1991.
- [178] B. Wang, L. Zhang, S. C. Bae, and S. Granick, "Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes," *PNAS*, vol. 105, no. 47, pp. 18171–18175, 2008.
- [179] S.I. Yoo et al., "Inhibition of amyloid peptide fibrillation by inorganic Nanoparticles : fonctional similarities with proteins," *Angewandte Chemie*, vol. 50, pp. 5110-5115, 2011.
- [180] R. Kromig and H.A. Kramers, "Absorption and dispersion in X-Ray Spectra," *Zeits F. Phys.*, vol. 174, no. 48, 1928.
- [181] E.H. Strikland, "Aromatic contribution to circular dichroism spectra of proteins," *CRC Crit REV Biochem*, vol. 2, no. 1, pp. 113-175, 1974.
- [182] R.W. Woody, "Circular dichroism," *Methods in enzymology*, vol. 246, pp. 34-71, 1995.
- [183] S.M. Kelly and N.C. Price, "The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function ," *Current Protein and peptide Science*, vol. 1, no. 4, pp. 349-384, 2000.
- [184] C.F. Quate G. Binnig and C. Gerber, "Atomic force microscope," *Physical review letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930-933, 1986.
- [185] G. Binnig, G. Gerber H. Rohrer, and E. Weibel, "Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy," *physical review letters*, vol. 49, no. 1, pp. 57-61, 1982.
- [186] R.J. Hunter, "Transport properties of suspensions," *Foundations of Colloid Science*, pp. 449-536, 1986.
- [187] K. Kimura, S. Takashima, and H. Ohshima, "Molecular approach to the surface potential estimate of thiolate-modified gold nanoparticles," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, pp. 7260-7266, 2002.
- [188] K. A. Fisher et al., "Measuring changes in membrane thickness by scanning tunneling microscopy ," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1023, no. 3, pp. 325-334, 1990.

- [189] P.L.T.M. Frederix et al., "Atomic force bio-analytics ," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 7, no. 5, pp. 641-647, 2003.
- [190] T. Förster, "intermolecular energy migration and fluorescence," *Ann Phys*, vol. 2, pp. 55-75, 1948.
- [191] D. Magde, R. Wong, and 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," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 75, no. 4, pp. 327-334, 2002.
- [192] C et al., "Reversible Loss of Crystallinity on Photobleaching Purple Membrane in the Presence of Hydroxylamine," *Journal of molecular Biology*, pp. 869-879, 2000.

Annexes

Annexe 1 : Principe de la mesure de taille et de potentiel zêta à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière

La DLS permet de remonter au mouvement brownien de solutions colloïdales et d'en déduire leur taille et leur potentiel de surface. Voyons maintenant son fonctionnement et le principe sur lequel il repose. L'appareil utilisé était un Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments, Angleterre), équipé d'un laser HeNe émettant à 633 nm. Il peut détecter des particules allant de 0,6 nm à 6 µm. Les mesures ont été faites à 25 °C.

1. Principe de la DLS

La mesure de taille de particules par DLS utilise la diffusion de la lumière par des particules dans une solution colloïdale. Ces particules sont soumises au mouvement brownien. A un angle donné, l'intensité de la lumière diffusée par la solution colloïdale est dépendante du temps et peut être corrélée au coefficient de diffusion des particules dans leur solvant.

La lumière est émise par un laser HeNe. Sa longueur d'onde est de 633 nm. Dans une approche classique le champ électrique de cette onde incidente induit une oscillation de la polarisation des électrons des particules du milieu diffusant. Ces particules deviennent alors des sources secondaires et diffusent la lumière incidente. C'est cette diffusion que l'appareil analyse au cours du temps.

La *Figure 78* montre le principe de fonctionnement du Zetasizer. Le détecteur enregistre la variation de l'intensité diffusée au cours du temps. Fixons maintenant un temps $t=0$ comme origine temporelle de notre expérience. À un temps $t \neq 0$, mais très proche de zéro, l'intensité relevée par le détecteur $I(t \neq 0)$ sera très proche de $I(t=0)$ car les particules n'auront pas eu le temps de beaucoup se déplacer dans le volume. Par contre si on prend maintenant, un temps T très loin après le début de notre expérience, la fonction $I(T)$ sera très différente de $I(t=0)$, car les particules se seront toutes déplacées dans le milieu. Donc plus le temps est long, moins $I(t)$ est corrélée avec $I(t=0)$. Ceci est d'autant plus vrai que les particules sont petites, puisqu'elles se déplacent plus vite que les grosses particules.

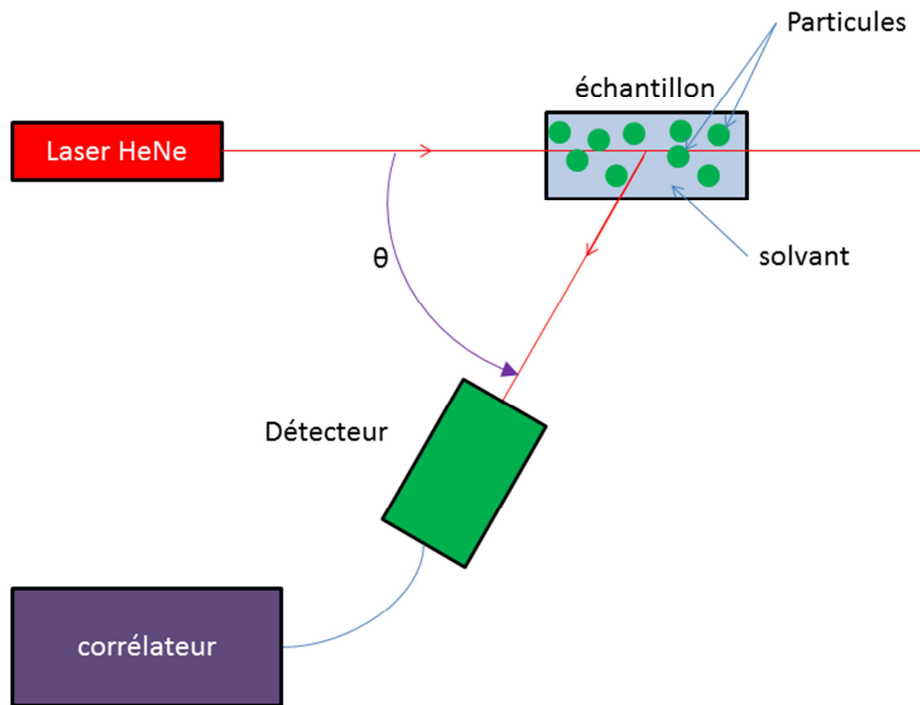


Figure 78 : Schéma de fonctionnement d'un Zetasizer

Pour quantifier cette corrélation, le corrélateur exprime une fonction $G(t)$. Cette fonction $G(t)$ montre combien une mesure est « identique » à elle-même au cours du temps. Elle s'exprime sous la forme :

$$G(t) = \frac{\langle (I(t) - \bar{I}) \cdot (I(t + \tau) - \bar{I}) \rangle}{\langle (I(0) - \bar{I})^2 \rangle} \quad (\text{Eq 25})$$

Avec $I(t)$ intensité de la lumière diffusée à l'instant t , \bar{I} valeur moyenne de l'intensité diffusée. A $t=0$, $G(0)=1$. Il n'y a aucune différence entre la fonction et elle-même, la corrélation donne bien son maximum. Cependant, au cours du temps cette valeur diminue pour atteindre 0 lorsque le système est complètement différent de ce qu'il était au départ. Pour des particules monodisperses et avec un coefficient de diffusion D , la décroissance de la fonction d'autocorrélation est donnée par :

$$G(t) \propto e^{-2Dq^2t} \quad (\text{Eq 26})$$

Avec \vec{q} vecteur de mesure $\|\vec{q}\| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\frac{\theta}{2})$, où n est l'indice de réfraction du solvant, θ l'angle de mesure, λ la longueur d'onde d'émission du laser. On peut alors à partir de la fonction $G(t)$ remonter au coefficient de diffusion des particules et, dans l'hypothèse de Stokes-Einstein, s'il n'y a pas d'interaction entre les particules, on en déduit la taille de ces dernières grâce à :

$$d_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (\text{Eq 27})$$

Dans laquelle d_h est le diamètre hydrodynamique des particules, k_B la constante de Boltzmann, T la température, η le coefficient de viscosité du milieu et D le coefficient de diffusion des particules. Cependant, cette équation n'est valable que dans le cas de solutions diluées, ce qui a toujours été le cas lors de nos mesures.

2. Mesure de potentiel zêta

Le potentiel zêta des particules est également mesuré grâce au zêta sizer Nano ZS de Malvern instruments. Contrairement à la mesure de taille, un potentiel est appliqué à l'intérieur de la cuve et les particules vont se mouvoir selon leur charge. L'appareil étant capable de mesurer leur vitesse, on peut en déduire leur potentiel de surface.

En effet, la vitesse de déplacement des particules est mesurée grâce à la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée. De cette vitesse, grâce à la théorie de Von Smoluchowski modifiée par Henry [186], on peut en déduire la mobilité électrophorétique des particules par l'équation :

$$\mu_E = v/E \quad (\text{Eq 28})$$

Dans laquelle, v est la vitesse des particules en cm/s, E est le champ électrique appliqué par unité de longueur (V/cm) et μ_E la mobilité électrophorétique en cm²/s.V.

La mobilité électrophorétique est définie comme la vitesse par unité de temps et elle peut être transformée en potentiel zêta grâce à :

$$\zeta = \frac{3\eta f(\kappa a)}{2\varepsilon\mu_E} \quad (\text{Eq 29})$$

Où ε est la permittivité du milieu, η la viscosité du milieu de dispersion, $f(\kappa a)$ est une fonction liée à la proportion entre la taille (a) et la longueur de Debye ($1/\kappa$) [187].

Les solutions utilisées pour ces mesures avaient toujours une concentration de l'ordre du μM . En dessous de cette concentration, il n'y a pas suffisamment de particules dans le volume d'analyse, alors que si cette concentration est trop élevée, l'appareil ne détecte plus le laser et les résultats ne sont plus réellement cohérents. Le potentiel zêta des QDs testées durant cette thèse s'étalonne entre -50 mV et +40 mV.

Annexe 2 : Principe du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est un appareil très utilisé en biologie pour connaître les structures secondaires des protéines et pour bien d'autres applications qui seront détaillées dans cette partie. Pour notre équipe, c'était la première fois qu'il était utilisé. Nous développerons donc le principe sur lequel il est basé, l'origine du signal des protéines et celui spécifique à la bR ainsi que l'utilisation que nous en avons fait.

3. Rappel sur la lumière polarisée

Dans l'approche ondulatoire, on considère que la lumière est composée d'un champ électrique \vec{E} et d'un champ magnétique \vec{H} , perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière (onde transversale) et perpendiculaires l'un à l'autre. Chacun de ces champs se comporte comme une onde se déplaçant à une vitesse qui, dans le vide, est appelée célérité de la lumière notée c . Pour la suite de ce rappel nous ne nous intéresserons qu'à \vec{E} .

La lumière est dite polarisée dans un plan lorsque le champ électrique qui lui est associé se déplace en restant dans un même plan. Bien évidemment, le champ magnétique reste dans un plan perpendiculaire au précédent. On peut également parler de polarisation rectiligne. La lumière naturelle est non polarisée, puisqu'elle est composée de lumières polarisées dans toutes les directions de façon aléatoire. Chaque onde successive se déplace alors dans un plan différent.

La lumière est dite polarisée circulairement lorsque la projection de l'extrémité du vecteur \vec{E} sur un plan perpendiculaire à la direction de propagation décrit un cercle. Si le cercle est décrit dans le sens des aiguilles d'une montre, la lumière est dite polarisée circulairement droite, si le cercle est décrit dans l'autre sens, alors elle est polarisée circulairement gauche. Dans les deux cas, l'extrémité du vecteur \vec{E} décrit une hélice, droite si la lumière est polarisée circulairement droite et gauche sinon.

A l'aide de la construction de Fresnel, il est possible de montrer que la lumière polarisée dans un plan peut être assimilée à la somme de deux ondes lumineuses polarisées circulairement droite pour l'une et gauche pour l'autre et de même intensité.

4. Rotation optique et dichroïsme circulaire

On dit de certains milieux qu'ils sont optiquement actifs ou qu'ils possèdent de l'activité optique ou encore qu'ils sont doués de pouvoir rotatoire. Cela se traduit par deux phénomènes liés que sont : la rotation optique et le dichroïsme circulaire.

a) Rotation optique

Les milieux optiquement actifs possèdent la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière qui les traverse.

Considérons alors qu'une onde plane est la superposition de deux ondes polarisées circulairement, de sens opposés et de même intensité. Si dans un milieu l'une des deux se déplace plus vite que l'autre alors à la sortie du milieu, l'une des deux ondes va se retrouver déphasée par rapport à l'autre. A la sortie du milieu, la lumière sera alors toujours polarisée dans un plan, mais ce plan sera tourné d'un angle α par rapport au plan incident.

Le milieu possède alors deux indices de réfraction différents, l'un pour la lumière polarisée circulairement droite (n_d) et l'autre pour la lumière polarisée circulairement gauche (n_g). Cette différence d'indice de réfraction est appelée biréfringence circulaire. Si le trajet optique dans le milieu est l , on peut montrer que l'angle α dont a tourné le plan de polarisation de la lumière est relié à la biréfringence par la relation :

$$\alpha = \frac{\pi l}{\lambda} (n_g - n_d) \quad (\text{Eq 30})$$

dans laquelle λ est la longueur d'onde de la lumière traversant le milieu. On définit la rotation spécifique d'une solution à la longueur d'onde λ par la relation :

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha}{C \cdot l} \quad (\text{Eq 31})$$

où α est l'angle effectif en degré dont a tourné le plan de polarisation et C la concentration, l étant la longueur du trajet optique dans le milieu. On utilise également la rotation molaire

$$[m]_\lambda = [\alpha]_\lambda \times \frac{M}{100} \quad (\text{Eq 32})$$

où M est la masse moléculaire du produit en solution.

L'angle α varie avec la longueur d'onde : la courbe représentant cette variation est appelée spectre de dispersion optique rotatoire (DOR). Lorsque l'on trace le spectre de DOR dans une région où il n'y a pas d'absorption, on observe une décroissance régulière en valeur absolue de la rotation. Cependant elle tend vers 0 mais ne l'atteint jamais. Par contre, si la molécule a une bande d'absorption à une longueur d'onde λ_a , la courbe prend une forme

particulière, représenté sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, la rotation changeant de signe et s'annulant à λ_a .

Ce type de courbe est appelé effet Cotton. Cet effet est qualifié de positif quand la rotation est positive pour les longueurs d'onde supérieures à λ_a et de négatif dans le cas contraire.

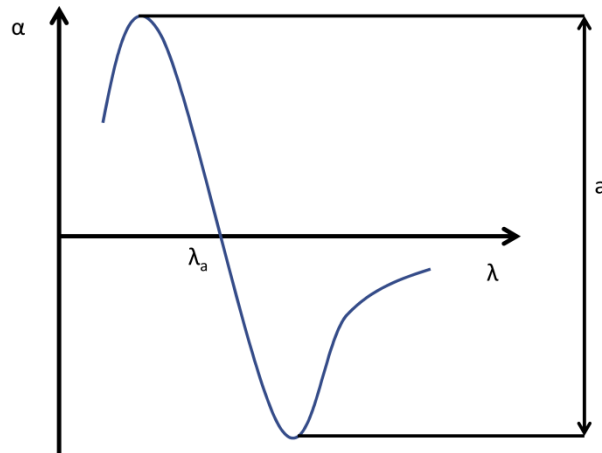


Figure 79 : Courbe de dispersion optique rotatoire. (*a* caractérise l'intensité de l'effet Cotton)

b) Dichroïsme circulaire

Dans tout domaine spectral où la solution présente de l'absorption, lorsqu'il existe de l'activité optique, les deux radiations correspondant aux lumières polarisées circulairement droite et gauche ne sont pas absorbées avec la même intensité. Dans ces conditions, la projection de l'extrémité du vecteur champ électrique résultant décrit une ellipse. La lumière est donc polarisée elliptiquement. Le grand axe de cette ellipse fait un angle α par rapport à la direction de polarisation de la lumière incidente.

Deux paramètres peuvent être alors utilisés pour caractériser ce phénomène :

- Le coefficient d'absorption molaire dichroïque qui est la différence entre le coefficient d'absorption molaire pour la lumière polarisée circulairement droite et celui pour la lumière polarisée circulairement gauche. Il est donné par ($M^{-1}cm^{-1}$) :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d \quad (\text{Eq 33})$$

- On peut également employer l'ellipticité ψ , telle que :

$$\tan \Psi = \frac{B}{A} \quad (\text{Eq 34})$$

où B et A sont le petit et le grand axe de l'ellipse.

Comme cette valeur est très petite, on peut considérer que $\tan \psi = \psi$. On utilise usuellement l'ellipticité molaire, par analogie avec la rotation molaire, en employant les mêmes unités :

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta}{c \cdot l} x \frac{M}{100} \quad (\text{Eq 35})$$

Il existe une relation entre les valeurs du dichroïsme circulaire et l'ellipticité puisque l'on peut démontrer que, pour des faibles valeurs de θ , on a en première approximation la relation :

$$\Delta\varepsilon = 3300x[\theta]_{\lambda} \quad (\text{Eq 36})$$

Les deux types de paramètres sont autant utilisés l'un que l'autre. Bien entendu, l'ellipticité et le coefficient dichroïque varient avec la longueur d'onde ce qui conduit au spectre de dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire ne se manifeste que dans les régions de longueur d'onde où la solution présente de l'absorption. Lorsqu'un composé optiquement actif présente de l'absorption dans une bande centrée sur la longueur d'onde λ_a , dans cette même bande il présentera du dichroïsme circulaire positif ou négatif. A cette même longueur d'onde, la courbe de dispersion optique rotatoire présentera un effet Cotton, lui aussi positif ou négatif. Il est important de noter que le dichroïsme circulaire, comme l'absorption, n'existe que dans certaines régions spectrales, alors que la rotation d'une substance optiquement active n'est jamais nulle, même si sa valeur est très faible à certaines longueurs d'onde.

Kronig et Kramers ont montré que, si l'on connaît la totalité du spectre de dispersion optique rotatoire (entre $\lambda = 0$ et $\lambda = \infty$), il est possible de calculer à chaque longueur d'onde la valeur du dichroïsme circulaire [180]:

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2}{\pi\lambda} \int_0^{\infty} [m(\lambda')] \frac{\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (\text{Eq 37})$$

Réciproquement, la connaissance de la totalité du spectre de dichroïsme circulaire permet de calculer la rotation :

$$[m(\lambda)] = -\frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} [\theta(\lambda')] \frac{\lambda'^2}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (\text{Eq 38})$$

Dans la pratique, on ne connaît jamais la totalité de l'un des deux spectres, néanmoins ces relations ont permis de développer des formules permettant de relier approximativement les intensités des bandes dichroïques aux amplitudes des effets Cotton correspondants. Dans tous les cas, puisqu'à partir d'un des spectres on peut calculer l'autre, il est clair que le contenu en information des deux types de spectre est le même. Dès lors,

l'utilisation de l'une ou l'autre technique pour étudier des solutions n'est qu'une question d'opportunité.

Au cours des dernières décennies, le dichroïsme circulaire a progressivement remplacé la dispersion optique rotatoire, essentiellement parce que la forme des spectres est plus facile à interpréter et que l'instrumentation a considérablement progressé.

c) Application aux protéines

C'est incontestablement dans le domaine des protéines que le CD a été le plus appliqué. Si l'on sait depuis longtemps que cette technique peut donner rapidement des informations structurales sur ces molécules sans nécessiter de grandes quantités de matériel, le développement de différents programmes liés à la génomique, avec la possibilité de produire de nombreuses nouvelles protéines et de façon rapide, a conduit à une augmentation considérable du nombre d'études basées sur cette approche.

Pour les protéines, deux types de chromophores contribuent à l'activité optique :

- Les chromophores aromatiques, tryptophanes, tyrosine et phénylalanine, contribuent aux signaux des protéines aux longueurs d'onde supérieures à 250 nm. Les acides aminés soufrés, cystéines et cystines, présentent également une absorption dans cette région spectrale mais leur faible coefficient d'absorption et leur faible concentration dans les protéines (dans la majorité des cas) les rendent négligeables. L'information obtenue concerne l'environnement des groupements aromatiques.
- Le chromophore peptidique absorbe pour les longueurs d'onde inférieure à 250 nm. Même s'il n'est pas le seul absorbeur dans cette région spectrale, le très grand nombre de liaisons peptidiques ($N-1$ pour une protéine de N acides aminés) fait que c'est lui qui apporte la contribution prépondérante au spectre en dessous de 250 nm. L'information que l'on obtient dans ce cas concerne la structure globale de la molécule.

(1) Région aromatique

Les groupements aromatiques du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine, c'est-à-dire l'indole, le phénol et le benzène présentent entre 250 et 300 nm des transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$. Ces chromophores sont plans et ne devraient pas présenter d'activité optique. Mais dans les protéines, ils sont perturbés de façon asymétrique par les divers groupements chimiques de la protéine se situant dans leur voisinage. On considère en général que tout

groupement localisé à moins de 5 Å du cycle aromatique est susceptible de participer à cette perturbation. Lorsque plusieurs acides aminés aromatiques sont présents dans une protéine, le spectre de dichroïsme circulaire sera la somme des contributions dues à chacun d'entre eux [181].

Une des conséquences est que, dans cette région spectrale, chaque protéine va posséder un spectre de dichroïsme circulaire qui lui sera propre. Toute modification du spectre traduira un changement de conformation de la protéine ou la présence d'une impureté. Mais à l'inverse, l'absence de modification du spectre ne traduira pas l'absence de changement conformationnel, car celui-ci peut être intervenu dans une partie de la protéine loin de tout acide aminé aromatique.

(2) Région peptidique

Le chromophore peptidique isolé présente une transition $n \rightarrow \pi^*$ vers 230 nm et une transition de type $\pi \rightarrow \pi^*$ vers 200 nm. Le groupement peptidique étant plan, il ne possède pas d'activité optique intrinsèque. Cependant, dans les protéines, ce groupement subit deux perturbations :

- Une perturbation par la chaîne latérale commençant au carbone α qui est un carbone asymétrique, sauf pour la glycine
- Et une deuxième perturbation qui est celle produite par les groupements peptidiques voisins du groupement considéré.

La première perturbation est faible et a peu d'influence.

Comme dans le cas des bases des acides nucléiques, c'est donc la géométrie des liaisons peptidiques les unes par rapport aux autres qui détermine la forme du signal. Cette géométrie est caractéristique de la structure secondaire de la chaîne polypeptidique et, en conséquence, chaque élément de structure secondaire possédera un spectre de dichroïsme circulaire qui lui est propre [182,183].

Par exemple une hélice α , hélice droite avec 3,6 résidus par tour, présentera un spectre avec un maximum négatif à 222 nm, un autre maximum négatif à 208 nm et un maximum positif vers 192 nm. La bande à 222 nm est due à la transition $n \rightarrow \pi^*$, tandis que les bandes localisées à 208 nm et 192 nm résultent du dédoublement excitonique de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du groupement peptidique (voir *Figure 80*).

Comme c'est la perturbation peptide-peptide qui constitue la contribution majeure à l'activité optique, le signal dichroïque observé dépend essentiellement de la structure secondaire et seulement de façon marginale de la nature des acides aminés, c'est-à-dire de la

séquence. La *Figure 80* présente également le spectre de séquences peptidiques sous différentes formes illustrant bien la sensibilité du spectre à la structure secondaire.

On peut donc utiliser le CD pour analyser le contenu en structures secondaires des protéines. Si on considère que les contributions des différents types de structures sont additives, on peut analyser les spectres par simple combinaison linéaire des spectres de référence. Il suffit pour analyser les protéines de connaître au moins autant de valeur du CD à différentes longueurs d'onde qu'il y a de structure dans la protéine. Bien sûr maintenant les algorithmes ont suffisamment progressé pour qu'on puisse calculer les pourcentages de chaque type d'arrangement à partir d'un spectre complet.

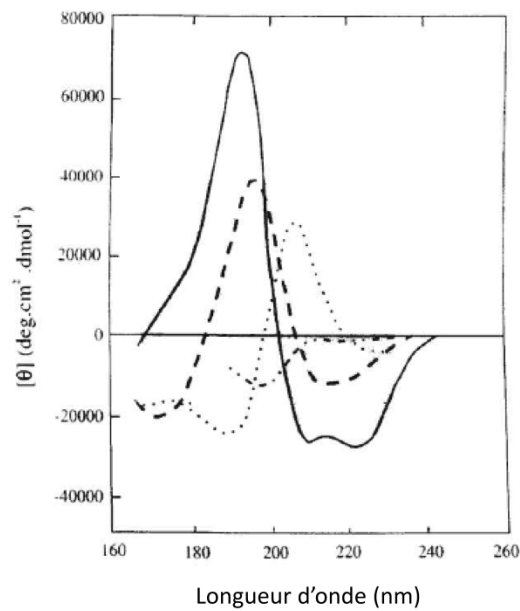


Figure 80 : Spectres de CD associés à des structures en hélice α (ligne pleine), en feuilletts β anti parallèles (tirets), en coude β de type I (points) et en structure irrégulière (tirets et points) [183].

Annexe 3 : Principe de la microscopie à force atomique (AFM)

1. Généralités

Le microscope à force atomique (AFM) a été développé par Binnig, Quate et Gerber en 1986 [184]. Il a été développé sur la base d'un autre microscope, le microscope à effet tunnel (STM) créé par la même équipe quelques années avant [185], ayant fait l'objet du prix Nobel de physique en 1986. Le concept général de ces deux instruments est de sonder point par point les interactions entre une pointe et la surface d'un échantillon par balayage de la pointe ou de l'échantillon. Dans le cas du STM, on maintient la distance constante entre la pointe et l'échantillon grâce à un courant tunnel existant entre la pointe et l'échantillon. Ceci implique que l'échantillon soit conducteur ou semi-conducteur, ce qui limite énormément le type d'échantillon utilisable. L'AFM par contre est lui capable d'imager des échantillons isolants. On utilise cette fois-ci les forces d'interactions pouvant exister entre la pointe et l'échantillon. Elles peuvent être multiples, Van der Waals, électriques, magnétiques ou de répulsion par exemple. L'AFM permet assez aisément d'étudier des échantillons biologiques en milieu liquide. Il est possible par exemple de faire circuler du liquide physiologique et de charger l'atmosphère à 5% de CO₂ pour pouvoir imager des cellules vivantes.

2. Le microscope

Le schéma classique d'un AFM est présenté en *Figure 81*. Une pointe microscopique fixée à l'extrémité d'un microlevier est placée à proximité de la surface d'un échantillon à étudier. L'échantillon est monté sur une platine de balayage XYZ. Le déplacement relatif de la pointe par rapport à l'échantillon donne soit une cartographie de la grandeur mesurée, soit une surface d'isograndeur, si une boucle d'asservissement ajuste la hauteur de l'échantillon pour maintenir constante la grandeur mesurée.

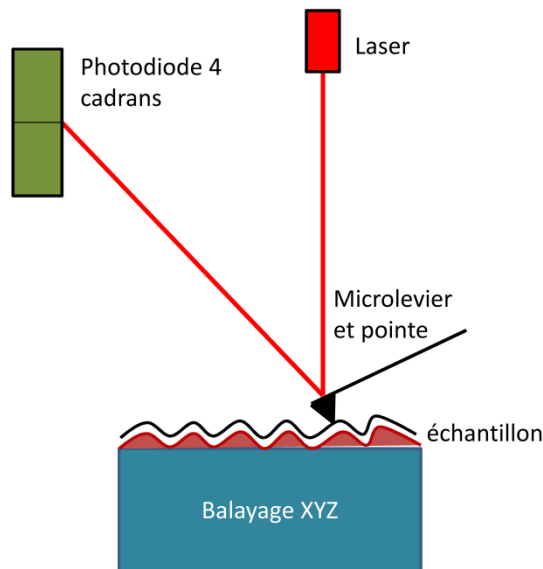


Figure 81 : Schéma d'un AFM. La déflexion du microlevier est détectée grâce au mouvement d'un laser sur la photodiode 4 cadrans. L'échantillon est déplacé grâce à une platine de balayage XYZ à base de quartz piézoélectrique.

La déflexion et/ou la torsion du microlevier sous l'effet des forces d'interaction est mesurée par la déviation du rayon laser. Il est réfléchi par le microlevier et renvoyé sur une photodiode à 4 cadrans. Une boucle de rétroaction agit alors sur les quartz piézoélectriques, pour maintenir la déflexion constante. La topographie de la surface peut ainsi être obtenue. Il suffit pour cela d'enregistrer point par point le déplacement en z de l'échantillon pour connaître le profil de la surface. Tout le fonctionnement de l'AFM ainsi que les différents modes reposent sur les interactions existantes entre pointe et échantillon. Elles peuvent être modélisées grâce au potentiel de Lennard-Jones.

3. Potentiel de Lennard-Jones

Ce potentiel représente les interactions pouvant exister entre deux atomes en fonction de la distance qui les sépare (potentiel d'interaction moléculaire). Il peut servir de modèle pour les interactions pointe-échantillon. Les forces appliquées aux abords de la surface peuvent avoir différentes portées et intensités. Elles peuvent être attractives ou répulsives. On obtient ce potentiel en sommant toutes les interactions attractives et répulsives. Sa forme est la suivante :

$$U(r) = -\frac{A}{r^n} + \frac{A}{r^m} \quad (\text{Eq 39})$$

Dans cette équation n et m sont des entiers. Le terme négatif représente les forces attractives, le terme positif les forces répulsives. Le potentiel de Lennard-Jones utilise cette base mais présente une forme un peu plus développée où $n = 12$ et $m = 6$:

$$U(r) = 4\varepsilon \left(-\left(\frac{\xi_0}{r}\right)^{12} + \left(\frac{\xi_0}{r}\right)^6 \right) \quad (\text{Eq 40})$$

avec ξ_0 distance interatomique d'équilibre. Il existe bon nombre d'autres potentiels empiriques (Coulomb, London, Debye...). La force liée à ce potentiel est représentée sur la *Figure 82*.

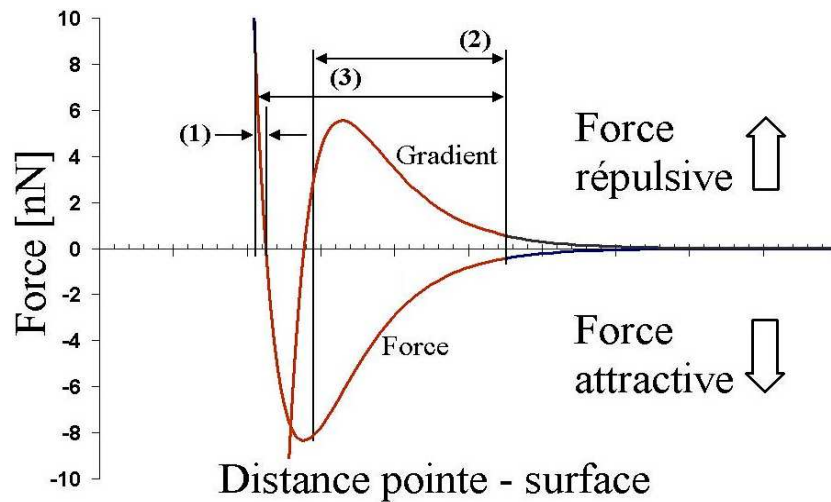


Figure 82 : Force dérivée du potentiel de Lennard-Jones.

On distingue plusieurs zones dans ce potentiel. Dans un premier temps, lorsque la pointe se trouve loin de l'échantillon, il n'y a pas d'interactions avec la surface. Quand elle s'approche, elle est soumise aux forces de Van Der Waals qui l'attirent vers l'échantillon. Elles sont donc de longue portée par rapport aux forces de répulsion. Lorsque la pointe est très proche du contact avec la surface, les orbitales atomiques des derniers atomes de la pointe et de la surface vont commencer à se recouvrir. Le principe d'exclusion de Pauli ne permet pas d'avoir deux électrons ayant les mêmes énergies et les mêmes nombres quantiques sur la même orbitale. Il y a donc répulsion des orbitales atomiques les unes par rapport aux autres et la pointe est repoussée de la surface. De plus, les orbitales se repoussant, elles écrantent beaucoup moins les noyaux atomiques. Il y a répulsion électrostatique des noyaux qui sont moins bien écrantés. La somme de ces interactions fait qu'il y a répulsion de la pointe par l'échantillon.

L'équilibre des forces répulsives et attractives correspond à un minimum d'énergie stable à environ 0,2 nm de distance entre pointe et échantillon.

Suivant les interactions qu'on va utiliser, le mode d'imagerie sera différent. On distingue trois domaines sur la Figure 82. Le domaine 1 représente les interactions répulsives utilisées dans le mode contact, le domaine 2 représente le mode non contact et enfin le domaine 3 est le domaine dans lequel travaille le mode contact intermittent nommé mode « tapping ».

4. Le mode contact

Le mode contact utilise les interactions répulsives entre la pointe et l'échantillon. Une valeur de la déflexion du microlevier, et donc une valeur de la force d'interaction entre pointe et échantillon, est fixée par l'expérimentateur. La boucle de rétroaction du microscope maintient la position du laser sur la photodiode par l'intermédiaire d'un tube piézoélectrique. En effet, pour maintenir la déflexion constante, ce dernier fait monter ou descendre l'échantillon en même temps qu'il balaye la surface pour que la valeur de l'interaction soit toujours la même et donc que la déflexion ne change pas. Si la déflexion du microlevier est constante, la position du laser sur la photodiode l'est également.

Ce mode possède plusieurs avantages, il est relativement simple d'utilisation, donne une bonne résolution aussi bien latérale que verticale et est assez rapide. L'utilisation est en effet assez simple, l'expérimentateur ne devant contrôler que la force qu'il applique avec la pointe sur l'échantillon. Les fréquences de balayage mises en jeu dans ce mode peuvent être très importantes (plusieurs Hz) lorsque la qualité de l'image n'est pas primordiale permettant ainsi d'avoir un aperçu rapide des zones intéressantes de l'échantillon.

Cependant, ce mode n'est pas parfait et présente des inconvénients. Premièrement, ce mode donne lieu à des forces de friction puisque la pointe reste en contact constant avec la surface de l'échantillon pendant son déplacement. Ces forces peuvent provoquer une usure assez rapide de la pointe ou de l'échantillon réduisant alors la résolution de l'appareil. Deuxièmement, à l'air, une fine couche d'hydratation se forme sous la pointe augmentant par capillarité la force appliquée par la pointe sur l'échantillon. Ce problème n'intervient pas en liquide puisque tout l'échantillon est plongé dans le liquide. Le dernier inconvénient de ce mode d'imagerie est qu'un mauvais contrôle de la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon peut conduire à la déformation ou à la détérioration d'échantillons mous.

C'est principalement pour cela que les constantes de raideur des microleviers associés à ce mode d'imagerie sont faibles. Elles peuvent aller de 0,01 N/m jusqu'à 2 N/m (pour imager des échantillons durs). Dans notre cas, la bR étant un matériau mou, les constantes de raideur utilisées sont de 0,08 N/m à 0,4 N/m. Des constantes de raideur plus

élevées rendent l'imagerie de la protéine très difficile et l'échantillon est souvent endommagé par le passage de la pointe car la force appliquée sur l'échantillon est difficilement contrôlable. Par exemple, il m'a été impossible d'imager la bR avec des microleviers aux constantes de raideur supérieure à 0,8 N/m, même si les rayons de courbures de pointes étaient suffisamment faibles pour y parvenir. De même, lorsque le rayon de courbure de la pointe est trop faible, l'imagerie est très compliquée puisque la pointe endommage énormément l'échantillon malgré un contrôle régulier de la force d'interaction pointe-échantillon. Les images de bR en mode contact en milieu liquide ont été très compliquées à obtenir avec des pointes ayant des rayons de courbure très faible (environ 2 nm pour les pointes MSNL de chez Bruker), même quand ces dernières étaient montées sur des microleviers avec des constantes de raideur de 0,02 N/m.

5. Le mode tapping

Le mode tapping est un mode oscillant pour lequel le microlevier vibre à sa fréquence de résonance. A chaque cycle, la pointe entre en contact avec la surface pendant un temps très court (inférieur à la microseconde). Ceci n'induit aucune force de frottement (ou très peu) et on évite ainsi la déformation de certains échantillons.

Le système pointe/microlevier peut être assimilé à un oscillateur du type masse ressort avec une fréquence de résonance ω_0 et un facteur de qualité Q . Le facteur de qualité correspond à la largeur à mi-hauteur du spectre de résonance. Il avoisine les 100 à l'air. Les fréquences de résonance des microleviers sont de plusieurs centaines de kHz à l'air. Leurs constantes de raideur sont d'environ 100-200 N/m. Lorsque la pointe s'approche de la surface, sa fréquence de résonance diminue sous l'effet du gradient de force attractive. C'est comme si sa constante de raideur était diminuée sous la forme :

$$k_{eff} = k_l - \frac{\partial F}{\partial Z} \quad (\text{Eq 41})$$

Dans laquelle k_{eff} est la nouvelle constant de raideur du système, k_l celle d'origine et $\frac{\partial F}{\partial Z}$ le gradient de force. De plus, l'amplitude de vibration peut alors être reliée à la fréquence à laquelle le système oscille. Elle dépend également du gradient de force qui s'exerce. En tapping à l'air les amplitudes sont généralement de 10 à 100 nm.

Lorsque la pointe s'approche de la surface, le gradient de force augmente et d'après la *Figure 82* le gradient est d'abord positif, puis négatif. La pointe ne faisant qu'effleurer la surface, le gradient reste sur l'ensemble d'un cycle en moyenne toujours positif, c'est

pourquoi la fréquence diminue, puisque k_{eff} diminue si $\frac{\partial F}{\partial z}$ augmente. Cet effet peut être exploité si on choisit une fréquence d'oscillation légèrement différente de ω_0 . Dans le mode tapping, on choisit souvent la fréquence de telle sorte que l'amplitude libre soit un certain pourcentage de l'amplitude de vibration maximale.

Le mode tapping donne une autre information liée au décalage de phase. Cette information correspond à la différence entre l'angle de phase du signal d'excitation et la déflexion du levier. Ceci n'est possible que si la fréquence d'excitation est fixe et que l'amplitude d'oscillation est maintenue constante, ce qui est le cas lors de l'imagerie en mode tapping. La phase permet d'obtenir une information sur le processus de dissipation intervenant lors du contact entre pointe et échantillon. Cette information permet de différencier deux matériaux différents, même lorsque la surface est parfaitement plane.

De façon générale, les avantages du mode tapping sont multiples à l'air. Il permet d'avoir une haute résolution latérale, les risques d'endommagement de l'échantillon sont faibles permettant ainsi de réduire les rayons de courbure des pointes. Enfin, les forces latérales sont éliminées et ne provoquent pas d'usure par friction. Cependant, le mode tapping a un gros inconvénient par rapport au mode contact : le temps d'acquisition des images.

Effectivement, si on prend le temps théorique d'acquisition, il faut que le régime transitoire de l'oscillateur soit terminé pour enregistrer un pixel. Le régime transitoire est de 4τ , si τ est la durée du régime transitoire du microlevier. Il est égal à

$$\tau = QT_0 \quad (\text{Eq 42})$$

si T_0 est la période d'oscillation du microlevier.

Une application numérique permet d'avoir un ordre de grandeur. Avec une fréquence de vibration à 300 kHz ($T_0 = 30\mu\text{s}$) et un facteur de qualité Q de 100, τ vaut 3 ms. Il faut donc attendre 12 ms entre chaque pixel. Pour une image de 256 x 256 pixels, il faut 3 s par ligne et 12 min pour l'image entière. De plus, une résolution de 256 pixels est assez faible. En pratique, on règle la vitesse de façon empirique, mais la capture d'image reste très longue. Ainsi la capture d'images de plusieurs dizaines de microns prend énormément de temps alors qu'en mode contact ces images peuvent être relativement rapides à enregistrer.

En résumé, le tapping donne donc à l'air de très bonnes images, avec une résolution latérale très haute et une information supplémentaire avec la phase, tout ceci avec des forces d'interactions très faibles.

D'un point de vue expérimental, deux paramètres sont réglables : la valeur de l'amplitude de l'excitation (plus ou moins grande oscillation libre) et l'amplitude

d'interaction. Certains échantillons nécessitent une grande amplitude libre et une petite amplitude d'interaction, alors que d'autres nécessitent de faibles amplitudes libres et de grandes amplitudes d'interactions. C'est là tout le rôle du microscopiste de trouver les réglages les plus adaptés à l'échantillon qu'on essaye d'imager. Ce mode n'est pas énormément compliqué à l'air, il dépend beaucoup de la nature des échantillons à imager. Pour un néophyte, si la taille d'image est grande (environ 10 μm), il est simple de le maîtriser.

Le mode tapping utilisé en milieu liquide devient un mode très difficile à maîtriser. Les interactions sont très faibles, les fréquences de balayage très lentes (0,25 Hz pour une image de 10 μm), la résolution est plus limitée qu'en mode contact. Ce mode utilise des microleviers avec des constantes de raideur identique à celle du contact (0,01 à 0,4 N/m), avec des fréquences de vibration très faibles (environ 10 kHz). Leur utilisation provient du fait que les forces détectées en liquide sont beaucoup plus faibles qu'à l'air et donc qu'il faut réduire les constantes de raideur des microleviers pour pouvoir les détecter. En réduisant les constantes de raideur les fréquences de vibration le sont aussi, ralentissant encore la vitesse de balayage de la pointe sur l'échantillon.