

Le dialogue intime entre colorants et argiles révéle par la fluorescence résolue dans le temps

Résumé La fluorescence résolue dans le temps est un outil puissant pour la caractérisation de molécules et biomacromolécules aux interfaces liquide/solide. Elle permet de rendre compte du confinement mais aussi de la mobilité des espèces. L'utilisation de cette technique a permis de résoudre des questions autour de l'orientation et des interactions entre ions et colorants dans différents matériaux de structure lamellaire. Elle a également permis d'identifier le devenir d'un colorant séquestré dans une matrice lamellaire lorsqu'il est remis en suspension dans l'eau, et enfin de mieux comprendre les interactions entre protéines et matériaux en se focalisant sur leurs sites actifs.

Mots-clés **Fluorescence, durée de vie de fluorescence, confinement, anisotropie de fluorescence, adsorption, colorant.**

Abstract **Intimate dialogue between dyes and clays: the role of time-resolved fluorescence**

The time-resolved fluorescence is a powerful tool to characterize molecules and biomacromolecules at solid/liquid interfaces. It allowed investigating the confinement and the mobility of molecules. Using such methods has allowed solving questions about the orientation and the interaction ion/dyes inside layered materials as clay minerals. It also allowed investigating the release in water of dyes confined in materials and to understand the interaction between proteins and materials with a focus on active sites.

Keywords **Fluorescence, fluorescence lifetime, confinement, fluorescence anisotropy, adsorption, dyes.**

La fluorescence révèle les interactions

Extrêmement sensibles, les méthodes de caractérisation basées sur l'émission de fluorescence sont utilisées dans une large gamme d'applications [1]. En biologie, l'utilisation de marqueurs spécifiques est essentielle pour obtenir des images de la distribution des objets auxquels on s'intéresse (protéine, ADN, etc.). L'interaction spécifique entre un marqueur fluorescent et une structure permet des mesures de cinétique ; ce principe a été utilisé par exemple pour l'étude de la formation d'amyloïdes grâce à l'emploi des propriétés d'intercalation de la molécule fluorescente thioflavine T dans les structures de feuillet β [2]. Les propriétés de transfert de fluorescence sont largement utilisées pour rendre compte d'interactions spécifiques de type protéine-protéine, ligand-protéine, ou encore pour doser des traces de molécules [3]. Des études plus sophistiquées par spectroscopie de corrélation de fluorescence permettent de mesurer le coefficient de diffusion de molécules ou macromolécules spécifiquement marquées [4]. Bien que beaucoup d'expérimentations de routine soient basées sur des mesures de fluorescence, celle-ci reste un processus complexe.

Après excitation, un fluorophore peut relaxer vers son état de moindre énergie selon plusieurs processus, chacun ayant sa propre dynamique (*figure 1*). L'énergie absorbée peut être restituée par des voies non radiatives, comme dans l'exemple des processus de conversion interne (constante de vitesse k_i), ou par voies radiatives, avec émission d'un photon. Le mécanisme de fluorescence est un processus radiatif ; il correspond au retour vers le niveau fondamental S_0 à partir du premier niveau excité de même multiplicité S_1 avec une constante de vitesse k_f (*figure 1*). Les constantes de vitesse des différentes voies de relaxation impliquées déterminent le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie de fluorescence d'une molécule.

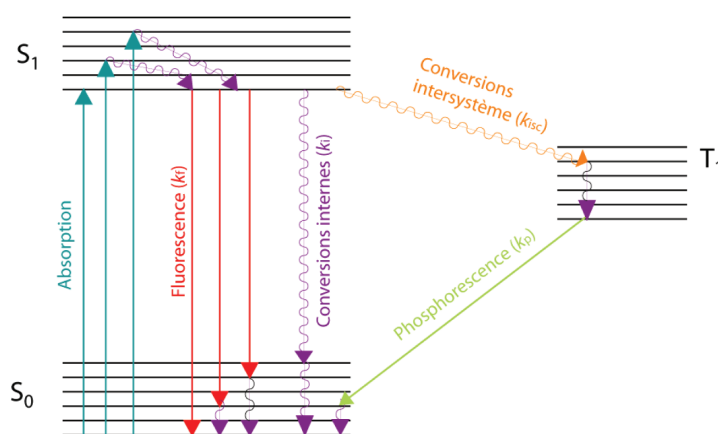


Figure 1 - Diagramme de Jablonski illustrant les différentes voies de relaxation entre les niveaux S_1 et S_0 .

Le rendement quantique de fluorescence Φ est défini par le rapport entre l'énergie restituée par fluorescence et l'énergie totale absorbée. Ceci correspond au rapport entre la constante de désactivation par fluorescence k_f et la somme des constantes de tous les processus de relaxation :

$$\Phi = \frac{k_f}{\sum_i k_i} = \tau_f k_f \quad (1)$$

Ce rapport rend compte de la compétition entre les différentes voies de relaxation d'une molécule excitée.

La durée de vie de fluorescence (τ_f) correspond au temps que met une molécule excitée pour relaxer de son état S_1 vers son état fondamental S_0 . Ce retour est un processus rapide, qui prend de quelques picosecondes à quelques nanosecondes. La durée de vie et le rendement de fluorescence sont liés : ainsi tout processus qui modifie τ_f modifie également Φ (équation 1).

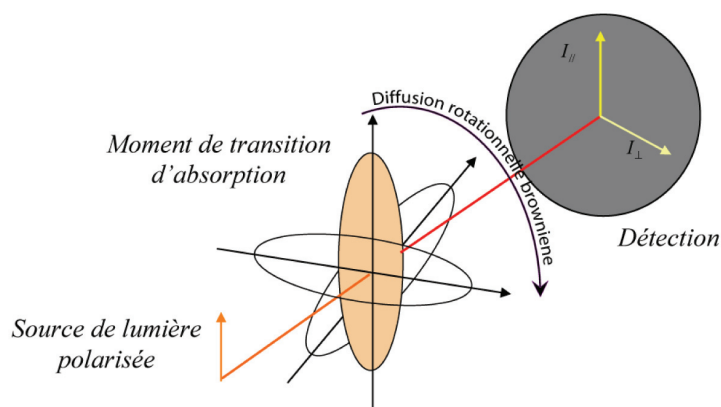


Figure 2 - Illustration de l'anisotropie de fluorescence.

Dans le cas d'une population de molécules excitées simultanément, la décroissance de la population de molécules fluorescentes s'exprime sous la forme :

$$I_F(t) = I_0 \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (2)$$

Un fluorophore excité par une lumière polarisée absorbe préférentiellement les ondes dont le vecteur de polarisation est parallèle au moment de transition dipolaire d'absorption. Ainsi, lorsqu'une molécule fluorescente est soumise à une radiation polarisée, il s'effectue une photosélection ; la répartition des états excités est anisotrope et de ce fait, l'émission de fluorescence l'est également. Suite au mouvement brownien des molécules en solution, le système retourne progressivement vers un état isotrope (figure 2). Si l'on observe l'émission de fluorescence à travers un polariseur, il est possible de mesurer la quantité de molécules orientées suivant l'axe du polariseur. Une mesure de polarisation de fluorescence consiste à exciter une molécule par une lumière polarisée et à observer l'émission suivant les axes parallèle et perpendiculaire à la direction de polarisation de l'excitation. L'émission de fluorescence observée selon chacun de ces axes dépend, d'une part, de la cinétique de réorientation des molécules, et d'autre part, de la durée de vie de l'état fluorescent. Pour un angle d'observation parallèle à l'angle de polarisation de l'excitation, la contribution de l'émission des molécules excitées décroît selon leur réorientation, tandis que pour une observation perpendiculaire à l'angle d'excitation, cette contribution augmente. En polarisation parallèle, on voit les molécules disparaître ; en polarisation perpendiculaire, on les voit apparaître. Pour un angle particulier du polariseur, dit « angle magique », les contributions dues à la rotation s'annihilent et la décroissance de fluorescence n'est due qu'à la seule durée de vie de l'état excité. Expérimentalement, les mesures de

durée de vie de fluorescence sont effectuées en collectant les photons émis avec un polariseur placé à « l'angle magique » (54,73° par rapport à la polarisation de l'excitation).

Les propriétés de fluorescence d'une molécule dépendent étroitement de son microenvironnement. La durée de vie de fluorescence étant liée aux caractéristiques des niveaux électroniques de la molécule, toute interaction physique qui influera sur les transitions électroniques aura un effet : variation du pH, de la polarité du solvant ou d'interactions intermoléculaires. L'anisotropie va permettre de sonder la viscosité ou encore l'adsorption d'une sonde sur un matériau. Ainsi, la fluorescence résolue dans le temps est une technique de choix pour l'étude et la caractérisation d'homomorphes confinés dans des structures poreuses et pour comprendre les interactions entre molécules et hôtes.

Nous illustrons ici à travers trois exemples l'apport de la spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps à l'étude des interactions entre colorants et matériaux et entre protéines et matériaux. La première partie traite des questions autour de l'orientation et des interactions entre ions et colorants dans différents matériaux de structure lamellaire de type argile. Ces questions sont importantes pour comprendre et caractériser de nouveaux pigments mais aussi des formulations anciennes de peinture. La seconde est dédiée à l'identification du devenir d'un colorant séquestré dans une matrice lamellaire lorsqu'il est remis en suspension dans l'eau. Cette question est cruciale pour des applications environnementales car les matériaux argileux sont considérés comme une solution pour dépolluer à moindre coût les rejets de l'industrie textile. Enfin, nous discuterons des interactions entre protéines et matériaux en nous focalisant sur les sites actifs des protéines.

Les interactions chromophores/matériaux

Effet du confinement sur la durée de vie de fluorescence

L'émission de fluorescence est extrêmement sensible à son environnement. Ainsi, l'adsorption et le confinement de molécules fluorescentes dans des matériaux vont pouvoir être directement caractérisés par une modification de la durée de la fluorescence. La tétracycline et l'oxytétracycline (figure 3) sont des antibiotiques polycycliques fluorescents. Leurs déclin de fluorescence sont complexes (figure 4) et leurs durées de vie moyennes pour une longueur d'onde d'émission de 504 nm sont estimées respectivement à 0,488 et 0,788 ns. Confinées dans des hydroxydes doubles lamellaires, ces durées de vie moyennes sont considérablement allongées : 2,40 et 2,16 ns respectivement [5]. De façon générale, l'allongement de la durée de vie moyenne d'un chromophore au sein d'un matériau est souvent reporté dans la littérature

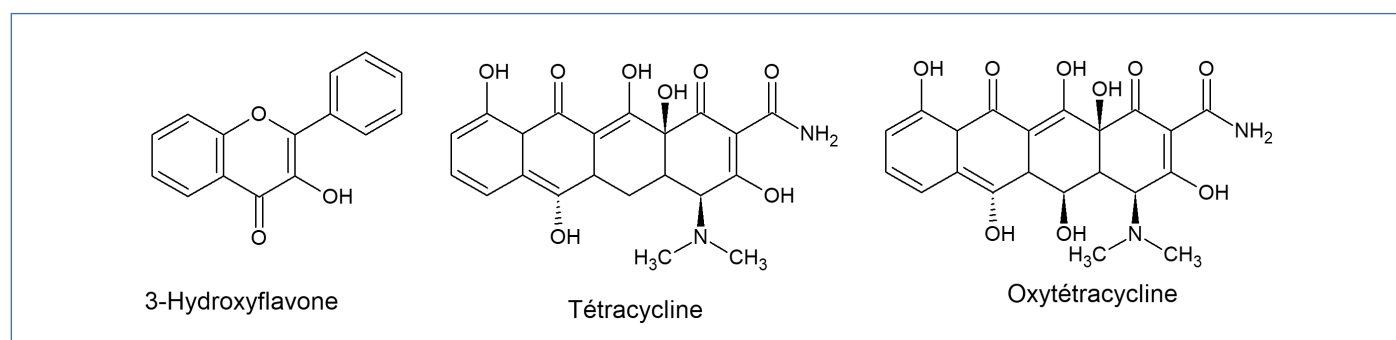


Figure 3 - Formules chimiques de la 3-hydroxyflavone, la tétracycline et l'oxytétracycline.

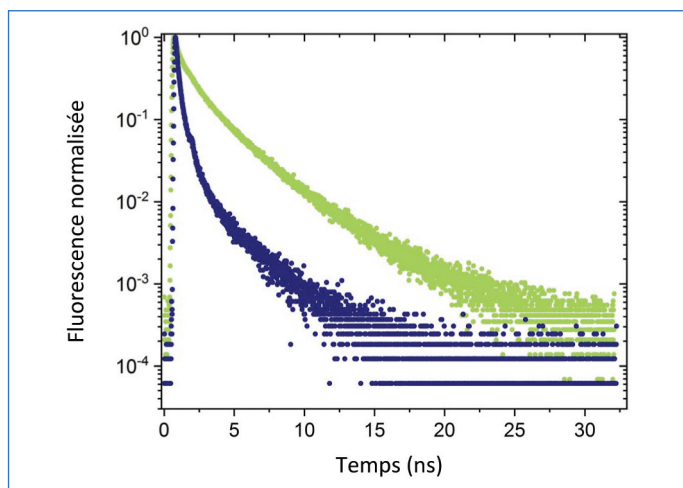


Figure 4 - Déclin de fluorescence de l'oxytétracycline libre en solution (points bleus) et confinée dans des hydroxydes doubles lamellaires (points verts).

comme une signature du confinement des fluorophores. Le cas de la 3-hydroxyflavone est particulièrement intéressant (figure 3) : dans l'éthanol, le déclin de fluorescence est décrit par une seule durée de vie de l'ordre de 0,3 ns ; confinée dans une zéolithe, deux composantes sont nécessaires pour l'analyse. Ces composantes de 4,4 et 1,8 ns représentent respectivement 90 et 10 % du déclin [6] ; elles sont associées à deux populations d'hydroxyflavone qui interagissent avec des sites différents du matériau.

Adsorption et confinement des rhodamines

Outre les informations obtenues sur les interactions colorants/matériaux, les mesures de durées de vie de fluorescence peuvent donner des indications sur l'orientation et l'état d'agrégation des colorants. Les colorants laser tels que les rhodamines (figure 5) sont extrêmement stables et ont été particulièrement étudiés. Parmi eux, la rhodamine 6G a une durée de vie unique, dans l'eau, de 3,95 ns. Confinée dans des films de laponite, cette durée de vie augmente jusqu'à 4,2 ns pour un faible taux d'intercalation (0,1 %). Avec l'augmentation de charge en rhodamine, la durée de vie décroît pour atteindre des

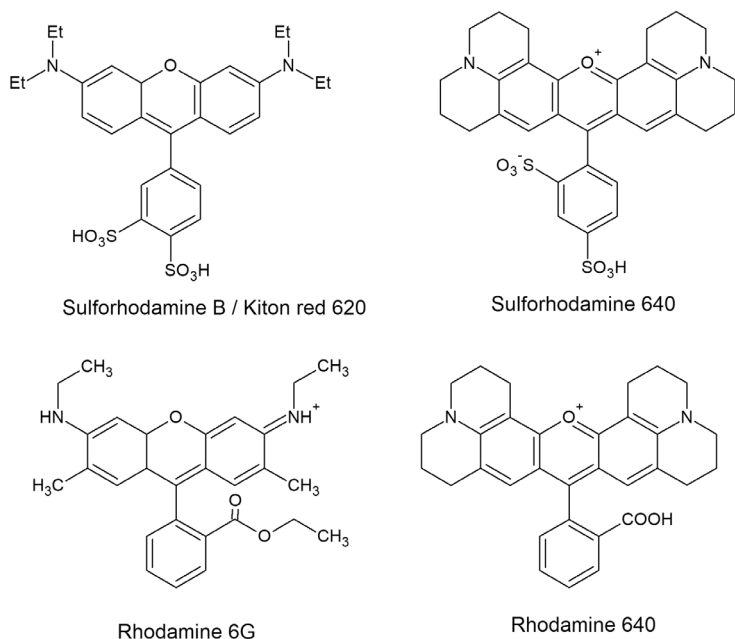


Figure 5 - Formules chimiques des rhodamines et sulforhodamines.

valeurs inférieures à 1 ns [7-8]. Cette réduction de durée de vie est attribuée à l'agrégation des molécules dans les espaces interlamellaires des films de laponite. En effet, l'agrégation des noyaux fluorone induit un transfert du processus de relaxation radiatif vers un processus non radiatif qui entraîne une réduction de la durée de vie de fluorescence. Ce phénomène est également observé dans le cas de la sulforhodamine B qui, dans l'eau, a une durée de vie plus courte (1,45 ns) que la sulforhodamine 640 (4,1 ns) du fait de son organisation sous forme de dimère [9].

Les matériaux 2D tels que l'oxyde de graphène et le nitrure de bore interagissent avec les colorants laser, comme par exemple la sulforhodamine 640, en induisant une extinction de fluorescence [10]. La durée de vie de fluorescence de ce colorant en présence d'oxyde de graphène est de 4,1 ns, identique à celle de sa solution. La mesure du temps de corrélation par anisotropie de fluorescence résolue en temps, qui est une mesure de la mobilité de l'émetteur, donne une valeur de 182 ps, identique à celle obtenue pour une solution du colorant. Ces résultats permettent de penser que dans la solution colorant-oxyde de graphène, la fluorescence observée n'est due qu'aux seules molécules libres en solution. Les molécules de chromophores qui sont adsorbées ont leur émission totalement éteinte ; cela est probablement dû à un empilement π . Le cas du nitrure de bore permet de mieux illustrer cette notion. En effet, le déclin de fluorescence de la sulforhodamine 640 mis en contact avec des feuillettes de nitrure de bore nécessite une analyse en trois composantes. La première, de 3,9 ns, est couplée avec un temps de corrélation court de 207 ps. Elle est attribuée aux molécules libres en solution et représente 10 % de la fluorescence globale. Les deux composantes de durée de vie plus courte, 1,37 et 0,4 ns, représentent 90 % de la fluorescence. Elles sont associées à un temps de corrélation beaucoup plus long de 80 ns et peuvent donc être attribuées à une population adsorbée sur le matériau.

Adsorption et confinement de l'acide carminique

Les colorants qui présentent plusieurs états de protonation peuvent avoir des propriétés photophysiques très différentes en fonction du pH ou encore de la complexation de cations métalliques. Parmi eux, l'acide carminique (figure 6) est un triacide communément utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme colorant rouge, ou encore comme constituant de peinture. Pour cette dernière utilisation, l'une des problématiques est la sensibilité du colorant à la lumière, mais aussi au changement de pH. Le confinement dans des matrices argileuses est une solution simple pour stabiliser le colorant en fixant sa couleur et éviter sa photodégradation. En tant que composé anionique, l'acide carminique ne va pas s'intercaler par un échange simple ; il va se complexer avec différents cations présents dans la matrice argileuse. Ainsi, chaque type de complexe va avoir des propriétés de durée de vie

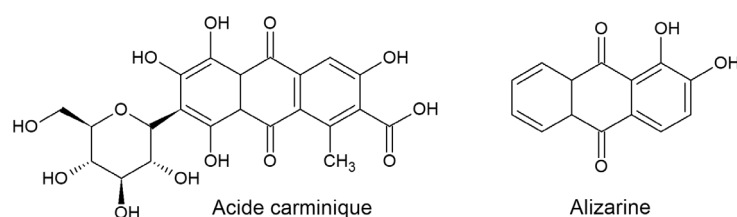


Figure 6 - Formules chimiques de l'acide carminique et l'alizarine.

de fluorescence propres. En solution, la fluorescence de l'acide carminique se décompose en trois durées de vie : 0,09 ns, 0,46 ns et 1,33 ns, avec une durée de vie moyenne de 0,2 ns. Lorsqu'il est intercalé dans de la montmorillonite, cette durée de vie moyenne augmente à 1,62 ns, 0,34 ns, et 0,72 ns si l'argile est échangée avec du calcium, de l'étain ou de l'aluminium [11]. Une étude plus détaillée a montré que le pH (acide ou neutre) va aussi jouer un rôle sur le type d'interaction entre l'acide carminique et l'aluminium. Ainsi, à pH acide, l'acide carminique interagit avec l'aluminium libre, alors qu'à pH neutre l'interaction se fait préférentiellement avec les atomes d'aluminium présents sur les bords des feuillettes. L'impact sur les propriétés photophysiques de l'acide carminique est largement visible puisque, si son environnement est principalement le solvant, sa durée de vie est courte, alors que s'il est entouré de matériaux, sa durée de vie moyenne s'allonge à 1,52 ns.

Un second exemple est le cas des argiles à pilier dans lesquelles ont été adsorbés l'acide carminique et l'alizarine. Il a été montré que les cations d'oxydes métalliques utilisés dans l'architecture d'argiles dites « à pilier » mais également le degré de protonation de l'acide carminique ont un impact sur les propriétés photophysiques. Pour le titane, il a été montré qu'à pH 5, les fonctions carboxylate de l'acide carminique vont créer des interactions électrostatiques. Il résulte de ces interactions une durée de vie de fluorescence moyenne de 0,945 ns avec une composante longue de 2,2 ns qui représente 25 % du déclin. À pH 2,5, lorsque le colorant est totalement protoné, les interactions vont se faire par le site anthraquinone riche en électrons π . Dans ce cas, la durée de vie moyenne est plus courte (0,47 ns) ; ceci est dû à une diminution de la composante longue qui passe à 1,72 ns et qui représente moins de 10 % de l'émission totale de fluorescence [12].

L'analyse de durée de vie de fluorescence peut aussi être une méthode simple pour vérifier si, lors de la mise en solution du matériau chargé, le colorant reste séquestré. Elle permet ainsi de caractériser de nouveaux pigments. Par exemple, l'acide carminique a été confiné dans des matrices de montmorillonite modifiées par des polymères. L'allongement de la durée de vie a permis dans ce cas de confirmer que le colorant était bien séquestré dans la matrice. Une mesure complémentaire d'anisotropie de fluorescence a également permis de démontrer cela. En effet, le temps de corrélation de l'acide carminique en solution a été mesuré à 0,3 ns, alors qu'il est supérieur à 50 ns quand il est séquestré dans l'argile [13].

Il est intéressant de séquestrer l'acide carminique ou l'alizarine dans des matériaux lamellaires pour plusieurs raisons. Ces colorants sont photosensibles et de ce fait, blanchissent avec le temps. Cela est aussi le cas pour un certain nombre de pigments rouges. Ainsi, les études présentées précédemment peuvent trouver des applications dans la formulation de pigments ou la compréhension de pigments utilisés dans des peintures anciennes. La technique de fluorescence résolue dans le temps vient compléter le large panel de caractérisations plus classiques dans le domaine telles que la diffraction des rayons X ou la résonance magnétique nucléaire. Il est évident que tous les composés lamellaires n'auront pas le même effet sur la stabilité des colorants puisque le type d'interaction va être le principal paramètre. Outre l'amélioration de leur stabilité, l'acide carminique ou l'alizarine sont aussi utilisés dans l'industrie textile. Des pays comme l'Inde, confrontés à ce type de pollution, développent une activité visant à utiliser des

matériaux lamellaires naturels comme séquestrant dans des procédés de dépollution, l'intérêt étant leur faible coût et leur abondance.

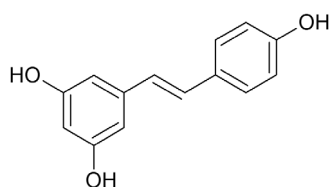
Devenir des colorants adsorbés

Les argiles ont été largement étudiées pour la séquestration des colorants dans le cadre d'applications dans le domaine de l'environnement. Afin d'optimiser l'adsorption des colorants, les argiles sont généralement modifiées [14-16]. Pour ce type d'étude, la fluorescence résolue dans le temps peut apporter un certain nombre de réponses. La première porte sur la modification de durée de vie induite par la séquestration du colorant. Par exemple, la fluorescéine, qui a une durée de vie de fluorescence unique (3,82 ns) en solution dans l'eau, devient plus complexe puisque le déclin requiert trois composantes (3,71 ns, 0,57 ns et 0,09 ns) quand elle est séquestrée dans une argile échangée avec un liquide ionique. En revanche, si l'argile est échangée avec du lithium, la durée de vie de fluorescence de la fluorescéine est similaire à celle en solution. L'une des interprétations est qu'en mettant l'argile contenant les colorants en suspension dans l'eau, ces derniers seraient relargués dans la solution [17]. Une étude similaire portant sur trois colorants (kiton red 620, sulforhodamine 640 et rhodamine 640) a été effectuée sur deux argiles (montmorillonite et saponite) échangées avec du sodium et du bromure de cétrimonium (CTAB). Dans l'eau, les trois colorants ont une durée de vie unique de 1,85 ns, 4 ns et 4,1 ns respectivement. Adsorbés aux matériaux, l'émission de fluorescence est plus complexe ; les déclins sont composés de trois durées de vie. Toutefois, il a été montré que dans la plupart des cas, une composante identique à la durée de vie en solution et très majoritaire est présente : ceci laisse penser que le colorant est majoritairement relargué dans l'eau. Dans cette étude, le cas du kiton red est le plus intéressant. La durée de vie de ce colorant est plus courte que celle de la sulforhodamine ; ceci est dû à la formation d'un dimère en solution. Après adsorption dans l'argile, une composante de l'ordre de 4 ns est observée, ce qui suggère que le kiton red est relargué dans l'eau sous forme de monomère [9]. Les études sur le devenir des colorants adsorbés dans les argiles sont encore rares. Toutefois, les résultats montrant que les colorants peuvent être relargués posent des questions sur l'utilisation même des matériaux argileux comme agent séquestrant.

Caractérisation des interactions protéines/matériaux

Comme nous l'avons mentionné en introduction, les techniques de fluorescence sont largement utilisées pour la caractérisation de processus biologiques impliquant notamment des protéines. Ces techniques sont également des méthodes de choix pour caractériser des interactions de type protéines/matériaux. Les protéines possèdent une fluorescence intrinsèque dès lors qu'elles contiennent des acides aminés tryptophanes (Trp). Ces derniers ont un processus de relaxation complexe ; une analyse des déclins de fluorescence avec trois à quatre composantes est généralement nécessaire. Ces durées de vie sont extrêmement sensibles à la modification de l'environnement de l'émetteur, comme par exemple dans le cas d'une modification, même minime, de la structure de la protéine, voire d'un sous-domaine. Une mesure simple de décalage de la bande de Stocke permet de faire la différence entre une protéine dite « molle », comme l'albumine de sérum

bovin, et une protéine dite « dure », comme le lysozyme [18]. Par exemple, le spectre d'émission du lysozyme adsorbé sur de la montmorillonite reste sensiblement identique à celui de sa solution, alors que pour l'albumine, il est décalé vers des longueurs d'onde plus courtes [19]. Ce comportement est attribué à une modification de la structure de la protéine. Il est associé à un changement de la durée moyenne de fluorescence qui passe de 5,8 ns dans l'eau à 3,7 ns en présence de montmorillonite [20]. La durée de vie de fluorescence permet aussi de comprendre des processus d'interaction entre ligands et protéines lors du processus d'adsorption. Par exemple, le



Resvératrol

Figure 7 - Formule chimique du resvératrol.

resvératrol (figure 7), un polyphénol communément présent dans le vin, est un ligand qui vient se loger dans la poche de l'albumine. L'interaction entre le polyphénol et le tryptophane en position 212 (trp212) de l'albumine de sérum bovin (BSA) se traduit par un phénomène de transfert de fluorescence. L'analyse par durée de vie de fluorescence a permis de montrer que le processus d'interaction entre la BSA et le resvératrol était plus rapide que l'adsorption de la protéine sur l'argile [20].

Le lysozyme est une enzyme connue pour garder sa structure et son activité une fois adsorbée sur un matériau. Il est intéressant de noter que pour cette protéine, 92 % de sa fluorescence provient de deux tryptophanes impliqués dans la structure du site enzymatique. Il a été montré que la durée de vie de fluorescence de la protéine était légèrement modifiée après adsorption sur des hydroxydes doubles lamellaires ; ceci s'accompagne également d'une petite perte d'activité antibactérienne. Ainsi, la protéine subit une petite modification de structure lors de son adsorption [21]. Cette modification structurale peut être également caractérisée par anisotropie de fluorescence. L'analyse de la dépolarisation de la fluorescence du lysozyme en solution requiert deux temps de corrélation (figure 8). Le premier, de 4 ns, peut être associé au mouvement global de la protéine, celui de 0,15 ns, au mouvement local des tryptophanes sur la chaîne peptidique. En présence d'hydroxydes doubles lamellaires, la composante longue est estimée à plus de 40 ns ; ceci confirme bien le processus d'adsorption de la protéine. En revanche, la composante courte peut rester identique si la chaîne contenant le tryptophane n'est pas bloquée, ou disparaître dans le cas inverse. Ainsi, en couplant l'étude d'anisotropie avec des techniques de diffusion des rayons X, l'orientation du lysozyme dans différents matériaux lamellaires (argile et hydroxyde double lamellaire) a pu être élucidée [22]. L'intérêt d'avoir une information sur la localisation et l'orientation du lysozyme est de pouvoir interpréter les modifications d'activité antibactérienne souvent observées. En effet, cette dernière peut avoir comme origine une modification significative de la structure ou de l'inaccessibilité du site enzymatique.

Les mesures de fluorescence dynamique réalisées en mode confocal permettent des études d'adsorption de protéine sur des surfaces ou au sein de matériaux. La configuration confocale permet une localisation précise du volume excité/observé de l'ordre du micron. Ces mesures nécessitent le marquage des protéines par un fluorophore [23]. La technique de spectroscopie de fluorescence en mode confocal a permis de résoudre une question fondamentale dans le domaine de la détection des protéines par la technique du nanopore unique.

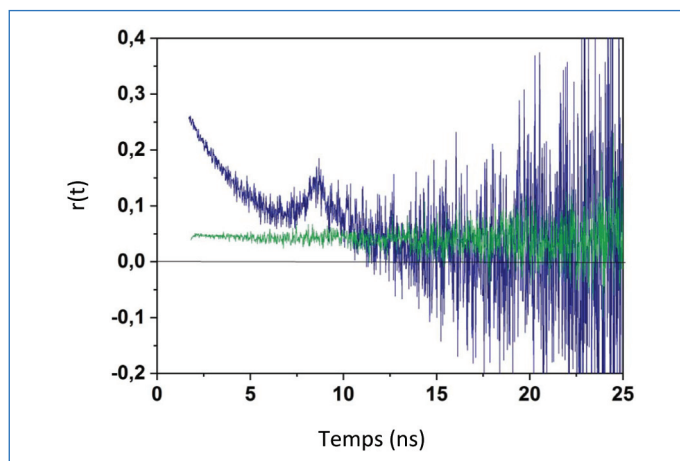


Figure 8 - Fonction d'anisotropie de fluorescence de lysozyme libre en solution dans l'eau (courbe bleue) et adsorbée sur des hydroxydes doubles lamellaires (courbe verte).

Cette dernière méthode, basée sur le principe du compteur Coulter, consiste à enregistrer les fluctuations de courants induits par le passage d'une protéine (ou autre macromolécule) à travers un nanopore percé dans un film mince de nitrure de silicium [24]. Dans la littérature, plusieurs groupes ont reporté qu'il existait un biais entre les prédictions théoriques sur le calcul du temps de résidence des protéines dans le nanopore et le taux de capture mesuré expérimentalement. Il a pu être démontré que ce biais expérimental était dû aux interactions entre protéines et matériaux [25]. En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre l'affinité des protéines et la surface de nitrure de silicium traitée avec une solution piranha et la fréquence des fluctuations de courant observée expérimentalement.

La fluorescence intrinsèque des protéines due aux tryptophanes est utile comme sonde locale de la modification de l'environnement ou encore de la mobilité des chaînes. Toutefois, afin de pouvoir rendre compte le plus parfaitement possible de la mobilité de la protéine, il est préférable que le fluorophore soit immobilisé au sein de celle-ci. Dans cette situation, l'anisotropie de fluorescence se limite à un seul temps de corrélation. Ceci peut être réalisé en utilisant le complexe avidine-biotine ; le fluorophore est attaché à la biotine avec un contrôle du nombre d'atomes qui les relie [23]. L'utilisation de ce complexe pour des études réalisées en mode confocal permet l'enregistrement de cinétiques d'adsorption. Ces mesures peuvent être réalisées en tous points d'une membrane poreuse, en surface comme à l'intérieur du matériau. Les enregistrements réalisés dans la solution, au voisinage immédiat de la membrane, permettent de mettre en évidence la zone de déplétion qui se forme au cours du processus d'adsorption. Les mesures de durée de vie peuvent rendre compte des interactions entre protéines et matériaux, et les mesures d'anisotropie, de la mobilité au sein ou au voisinage du matériau [26]. La méthode de spectroscopie de fluorescence en mode confocal permet également d'avoir accès à une mesure rapide et précise de la concentration interfaciale [27]. Il existe de nombreux champs d'application qui requièrent de caractériser la cinétique d'adsorption des protéines sur des surfaces. Par exemple, les revêtements anti-bio-adhérents sont communément utilisés pour consommables de laboratoire tels que les plaques à puits, les tubes ou encore les membranes de filtration quelle que soit l'échelle. Ainsi, le suivi cinétique permet de caractériser les performances des revêtements [28-29]. À l'inverse, il existe des applications qui visent

à optimiser le greffage de protéines sur des surfaces. Cela est par exemple le cas pour la fixation de protéines pour des biocapteurs, ou encore pour obtenir des matériaux catalytiques par enzymes supportées. L'accès à des mesures quantitatives permet de connaître les concentrations interfaciales de protéines, ce qui est indispensable pour l'optimisation des procédés de fabrication ou l'étalonnage des biocapteurs.

Et demain ?

En résumé, les techniques de fluorescence résolue dans le temps sont une véritable boîte à outils performante pour la caractérisation des interactions colorants/matériaux. Elles permettent à la fois d'obtenir des informations sur la localisation et l'orientation des molécules dans le matériau. Dans ce domaine, un sujet particulièrement intéressant serait de corréliser les propriétés photophysiques et celles de relaxométrie afin de comprendre l'impact de la complexation des colorants sur leur couleur et leur stabilité. Pour les interactions protéines/matériaux, la fluorescence résolue dans le temps est aussi un outil puissant dès lors que les tryptophanes peuvent être utilisés comme sonde locale afin de résoudre les questions en lien avec les relations structure/propriétés. Enfin, les études effectuées en mode confocal permettent de réaliser le suivi des cinétiques d'adsorption à la fois sur la surface mais aussi dans la solution proche de l'interface.

[1] Valeur B., Berberan-Santos M.N., *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, **2012**.

[2] Biancalana M., Koide S., Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1804, p. 1405.

[3] Piston D.W., Kremers G.-J., Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly, *Trends Biochem. Sci.*, **2007**, 32, p. 407.

[4] Hess S.T., Huang S., Heikal A.A., Webb W.W., Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review, *Biochemistry*, **2002**, 41, p. 697.

[5] Bouaziz Z., Soussan L., Janot J.-M., Jaber M., Ben Haj Amara A., Balme S., Dual role of layered double hydroxide nanocomposites on antibacterial activity and degradation of tetracycline and oxytetracycline, *Chemosphere*, **2018**, 206, p. 175.

[6] Doussineau T., Smāiħi M., Balme S., Janot J.-M., Fluorescent hydroxyflavone-zeolite nanoparticles: ship-in-a-bottle synthesis and photophysical properties, *ChemPhysChem*, **2006**, 7, p. 583.

[7] Martínez V. et al., Characterization of rhodamine 6G aggregates intercalated in solid thin films of laponite clay. 1. Absorption spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, p. 20030.

[8] Martínez V., López Arbeloa F., Bañuelos Prieto J., López Arbeloa I., Characterization of rhodamine 6G aggregates intercalated in solid thin films of laponite clay. 2. Fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, p. 7443.

[9] Tangaraj V., Janot J.-M., Jaber M., Bechelany M., Balme S., Adsorption and photophysical properties of fluorescent dyes over montmorillonite and saponite modified by surfactant, *Chemosphere*, **2017**, 184, p. 1355

[10] Thangaraj V. et al., Fluorescence quenching of sulforhodamine dye over graphene oxide and boron nitride nanosheets, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2016**, 2016, p. 2125.

[11] Fournier F., de Viguerie L., Balme S., Janot J.-M., Walter P., Jaber M., Physico-chemical characterization of lake pigments based on montmorillonite and carminic acid, *Appl. Clay Sci.*, **2016**, 130, p. 12.

[12] Trigueiro P. et al., When anthraquinone dyes meet pillared montmorillonite: stability or fading upon exposure to light?, *Dyes and Pigments*, **2018**, 159, p. 384.

[13] Guillermin D. et al., New pigments based on carminic acid and smectites: a molecular investigation, *Dyes and Pigments*, **2019**, 160, p. 971.

[14] Espantaleón A.G., Nieto J.A., Fernández M., Marsal A., Use of activated clays in the removal of dyes and surfactants from tannery waste waters, *Appl. Clay Sci.*, **2003**, 24, p. 105.

[15] Kausar A. et al., Dyes adsorption using clay and modified clay: a review, *J. Mol. Liq.*, **2018**, 256, p. 395.

[16] Yagub M.T., Sen T.K., Afroze S., Ang H.M., Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2014**, 209, p. 172.

[17] Belbel A. et al., Preparation and characterization of homoionic montmorillonite modified with ionic liquid: application in dye adsorption, *Colloids Surf. A*, **2018**, 558, p. 219.

[18] Coglitore D., Janot J.-M., Balme S., Protein at liquid solid interfaces: toward a new paradigm to change the approach to design hybrid protein/solid-state materials, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2019**, 270, p. 278.

[19] Lepoitevin M. et al., BSA and lysozyme adsorption on homoionic montmorillonite: influence of the interlayer cation, *Appl. Clay Sci.*, **2014**, 95, p. 396.

[20] Trigueiro P. et al., Going through the wine fining: intimate dialogue between organics and clays, *Colloids Surf. B*, **2018**, 166, p. 79.

[21] Bouaziz Z. et al., Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide, *Colloids Surf. B*, **2017**, 157, p. 10.

[22] Balme S. et al., Structure, orientation and stability of lysozyme confined in layered materials, *Soft Matter*, **2013**, 9, p. 3188.

[23] Balme S., Janot J.-M., Déjardin P., Seta P., Highly efficient fluorescent label unquenched by protein interaction to probe the avidin rotational motion, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2006**, 184, p. 204.

[24] Lepoitevin M., Ma T., Bechelany M., Janot J.-M., Balme S., Functionalization of single solid state nanopores to mimic biological ion channels: a review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2017**, 250, p. 195.

[25] Balme S. et al., Influence of adsorption on proteins and amyloid detection by silicon nitride nanopore, *Langmuir*, **2016**, 32, p. 8916.

[26] Balme S., Janot J.-M., Déjardin P., Vasina E.N., Seta P., Potentialities of confocal fluorescence for investigating protein adsorption on mica and in ultrafiltration membranes, *J. Membr. Sci.*, **2006**, 284, p. 198.

[27] Sodzel D. et al., Continuous sensing of hydrogen peroxide and glucose via quenching of the UV and visible luminescence of ZnO nanoparticles, *Microchim. Acta*, **2015**, 182, p. 1819.

[28] Ferez L. et al., Interface of covalently bonded phospholipids with a phosphorylcholine head: characterization, protein nonadsorption, and further functionalization, *Langmuir*, **2011**, 27, p. 11536.

[29] Tauk L., Thami T., Ferez L., Kocer A., Janot J.-M., Déjardin P., Thin phosphatidylcholine films as background surfaces with further possibilities of functionalization for biomedical applications, *Colloids Surf. B*, **2013**, 101, p. 189.

Jean-Marc JANOT, chargé de recherche au CNRS, et **Sébastien BALME**, maître de conférences à l'Université de Montpellier, Équipe Interfaces bio-inspirées, Institut européen des membranes, UMR 5635, Université de Montpellier-ENSCM-CNRS.

*Courriels : jmjanot@univ-montp2.fr ; sebastien.balme@umontpellier.fr