

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Diffusion dans un hydrogel : Applications aux biocapteurs et optimisation de la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS)

par

Pierre-Olivier Gendron

Département de Chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en chimie

Mars, 2008

©, Pierre-Olivier Gendron, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Diffusion dans un hydrogel : Applications aux biocapteurs et optimisation de
la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS)

Présenté par :

Pierre-Olivier Gendron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Président-rapporteur	Prof. Julian X. Zhu
Directeur de recherche	Prof. Kevin Wilkinson
Membre du jury	Prof. Dean MacNeil

Mémoire accepté le

Résumé

L'évaluation quantitative des métaux traces et de leurs effets sur l'environnement représente encore aujourd'hui un défi de taille. Les effets biologiques des métaux traces dépendent beaucoup de la spéciation de ceux-ci. Comme il n'y a toujours pas de consensus général sur le(s) rôle(s) de la spéciation chimique des métaux, il est important d'identifier les espèces réellement biodisponibles.

L'objectif global de ce projet est de développer un biocapteur pouvant mesurer la fraction de cadmium biodisponible dans les eaux naturelles. L'élément de reconnaissance utilisé dans le biocapteur est une algue modifiée, *Chlamydomonas reinhardtii*, qui sera développé par d'autres membres du groupe de recherche. De même, le transducteur est encore en développement mais il sera composé de fibre optique. Un des éléments clés de ce mémoire est le choix de la matrice d'immobilisation qui doit répondre à certains critères physico-chimiques dans l'optique de l'utiliser dans un biocapteur. La caractérisation de la diffusion d'analyte à l'intérieur de cette matrice a été réalisée par cellule de diffusion, avec la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF) et avec la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (RFAP). Selon les résultats obtenus par les différentes techniques, la matrice choisie (agarose à faible point de gélification) s'avère un bon choix pour son utilisation éventuelle dans un biocapteur.

Les coefficients de diffusion de 4 fluorophores; Rhodamine123, Rhodamine6G, RhodamineB et Rhodamine110 ont été mesurés par résonance magnétique nucléaire à champs de gradient pulsé (RMN-CGP) et validés par SCF. Des nouveaux coefficients de diffusion pour ces quatre fluorophores sont proposés pour la calibration du volume confocal.

Mots clés

Cadmium, biocapteur, coefficient de diffusion, spectroscopie par corrélation de fluorescence, recouvrement de fluorescence, cellule de diffusion, champs de gradient pulsé.

Abstract

The quantitative evaluation of trace metals and their effects on the environment is an important issue. The biological effects of trace metals depend mainly on their speciation*. Since there is still no general consensus on the role(s) of chemical speciation on pollutant availability, it is essential to identify the species that truly interact with biological organisms.

The primary goal of this project is to develop a biosensor capable of measuring the bioavailable cadmium in natural waters. The transducer used in this work is a modified alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, which has been developed in this group. A key part of this work is the choice of an immobilisation matrix which needs to be characterised for its use in biosensors. In this study, the physicochemical characterisation of analyte diffusion through the gel matrix was accomplished with three different techniques: fluorescence correlation spectroscopy (FCS), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and by diffusion cells. Based upon these results, the low melt agarose gel appears to be a good choice for use in a biosensor.

Diffusion coefficient of four fluorophores: Rhodamine123, Rhodamine6G, RhodamineB and Rhodamine110 were measured by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance

(PFG-NMR) and validated by FCS. New values of diffusion coefficients are proposed for calibration of the FCS confocal volume.

Key words

Cadmium, biosensors, diffusion coefficient, fluorescence correlation spectroscopy, fluorescence recovery, cell diffusion, pulsed field gradient

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Liste des symboles	x
Listes des tableaux	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des figures	xiii
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	1
1.1 Introduction générale.	1
1.2 Théorie sur la diffusion.....	5
1.3 Revue de littérature des gels utilisés pour l’immobilisation de microorganismes....	8
1.4 Caractéristiques chimiques principales d'un gel d'agarose.	12
1.5 Objectifs.....	13
2. Diffusion coefficients of rhodamine derivatives as determined by Pulsed Field Gradient – Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy ...	15
2.1 Abstract.....	15
2.2 Introduction.....	16
2.3 Theory	17
2.4 Materials and Methods.....	20

2.5 Results and Discussion	22
2.6 Conclusion	35
2.7 Appendix.....	35
Chapitre 3: Diffusion dans le gel d'agarose	38
3.1 Introduction.....	38
3.2 Matériel et méthodes.....	38
3.3 Résultats.....	42
3.4 Discussion.....	48
4. Conclusion	53
5. Bibliographie.....	56

Liste des abréviations

BLM: Biotic Ligand Model

CSF: Corrélation par Spectroscopie de Fluorescence

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

FIAM: Free Ion Activity Model

FPG: Faible Point de Gélification

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

PFM-NMR: Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance

R6G: Rhodamine 6 G

RB: Rhodamine B

R123: Rhodamine 123

R110: Rhodamine 110

RMN-CGP: Résonance Magnétique Nucléaire à Champs de Gradient Pulsé

RFAP: Recouvrement de Fluorescence Après Photodécomposition

SAAF: Spectroscopie d'Absorption Atomique au Four Graphite

Liste des symboles

A : Surface

C : Concentration

D : Coefficient de diffusion

D_a : Coefficient d'auto-diffusion

D_{eau} : Coefficient de diffusion dans l'eau

D_{gel} : Coefficient de diffusion dans le gel

D_m : Coefficient diffusion mutuelle

G : Amplitude of gradient pulse

$G(t)$: Auto-correlation function

I_e : Épaisseur du gel

I : Intensity of the resonances of molecules in NMR experiments

$J_{d,s}$: Flux de diffusion sphérique

J_p : Flux de diffusion planaire

J : Flux de diffusion

k : constante de Boltzmann

L : Ligand

M : Trace metal

p : Paramètre de structure du volume confocal

P : Probabilité

r_0 : Rayon d'une sphère

T : Température

t : Temps

V : Volume

x : Position

γ : Gyro-magnetic ratio

δ : Duration of the magnetic pulse

η : Viscosité

τ : Temps de diffusion à l'intérieur du volume confocal

ω_z : Longitudinal radius of confocal volume

ω_{xy} : Transversal radius of confocal volume

ψ : Épaisseur de la couche de diffusion

Listes des tableaux

Tableau 1: Tableau résumant les propriétés physico-chimiques des gels d'agarose utilisés dans la littérature pour l'immobilisation de microorganismes.....	11
Tableau 2: Summary of diffusion coefficients determined from the literature for Rhodamine 6G.	27
Tableau 3: Summary of diffusion coefficients determined from the literature for Rhodamine B.	28
Tableau 4: Values of diffusion coefficients proposed for the rhodamine fluorophores.	34
Tableau 5: Programmation de la température du SAAFG utilisé pour l'analyse du coefficient de diffusion du cadmium.	41
Tableau 6: Comparaison des coefficients de diffusion pour le cadmium dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification et dans l'eau obtenus par cellule de diffusion/SAAFG.....	44
Tableau 7: Comparaison des coefficients de diffusion pour RB et R6G dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification et obtenus par cellule de diffusion/UV-visible.	46
Tableau 8: Comparaison des coefficients de diffusion pour RB et R6G dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification obtenus par SCF.....	47
Tableau 9: Comparaison de la technique des cellules de diffusion et SCF pour la détermination des coefficients de diffusion à l'intérieur du gel d'agarose à faible point de gélification.	49

Liste des figures

Figure 1 : Principaux processus physico-chimiques menant à la bioaccumulation de métaux traces chez des microorganismes (adapté de ⁵).	2
Figure 2 : Structure chimique de l'agarose.	12
Figure 3: Structures of rhodamine derivates.	17
Figure 4: Experimental diffusion coefficients determined by NMR as a function of those determined by FCS.	23
Figure 5: Theoretical diffusion coefficients of particle standards determined as a function of those determined by FCS.	24
Figure 6: Influence of the concentration on the diffusion coefficient of 4 rhodamine derivatives.	30
Figure 7: Influence of the ionic strength on the diffusion coefficient.	32
Figure 8: Influence of the pH on the diffusion coefficient.	33
Figure 10 : Détermination du flux de cadmium dans un gel d'agarose à faible point de gélification d'une épaisseur de 0.94 mm.	44
Figure 11 : Courbe de calibration en UV-visible pour la rhodamine 6G.	45
Figure 12 : Détermination du flux de dans un gel d'agarose à faible point de gélification d'une épaisseur de 0.94 mm.	46
Figure 13 : Courbe d'autocorrélation pour R6G.	47
Figure 14 : Courbe de recouvrement de fluorescence pour la Rhodamine 6g dans un gel d'agarose à faible point de gélification après la photodécomposition.	48
Figure 15 : Détermination du flux limitant pour un biocapteur utilisant <i>Chlamydomonas</i> immobilisé dans un gel d'agarose à faible point de gélification.	51

Remerciements

Je voudrais remercier tout le groupe de chimie biologique et analytique de l'Université de Montréal et plus particulièrement monsieur Kevin Wilkinson, mon directeur de recherche, pour l'encadrement, les excellents conseils, et pour m'avoir donné la chance de travailler pour lui. J'aimerais également remercier Thomas Davis, Colin Hutchins, Dana Simon et Rute Isabel Ferreira Domingos pour tous les trucs et conseils du métier. Finalement, je voudrais remercier mon père, ma mère et mes deux soeurs pour leur soutien tout au long de mon cheminement, mes amis pour m'avoir fait décrocher quand j'en avais besoin et ma copine Maude pour des milliers de bonnes raisons.

1. Introduction

1.1 Introduction générale.

L'évaluation quantitative des métaux traces et de leurs effets sur l'environnement représente encore aujourd'hui un défi de taille. En effet, les environmentalistes et les agences gouvernementales pour la protection de l'environnement s'entendent pour dire que les effets biologiques des métaux traces dépendent beaucoup de la spéciation de ceux-ci. La spéciation chimique est la distribution d'un élément parmi des espèces chimiques déterminées¹. Dans ce contexte, les métaux traces se trouvent sous plusieurs formes dans l'environnement. On peut les trouver sous formes d'ions hydratés, complexés avec des acides fulviques et humiques, ou absorbés sur des particules ou des colloïdes^{2, 3}. Comme il n'y a toujours pas de consensus général sur le(s) rôle(s) de la spéciation chimique des métaux, dans la plupart des pays, les agences gouvernementales persistent à employer la concentration totale ou dissoute en métaux pour fixer les limites acceptables de concentration de ses métaux dans les effluents et dans les eaux naturelles.

Dans ce contexte, quatre difficultés ont été identifiées comme étant celles qui limitaient le plus notre compréhension des effets des métaux traces et leurs effets sur les microorganismes et l'environnement en général⁴. La détermination de la spéciation chimique en solution, l'interaction chimique entre les différents métaux traces, l'absence de modèle pour expliquer les mécanismes d'interaction des métaux avec les interfaces biologiques et l'absence de connaissance à propos de l'état que peuvent prendre les

métaux une fois assimilés par les microorganismes. Encore aujourd'hui, ces difficultés persistent surtout pour l'obtention de données *in-situ*. Il est donc difficile d'établir des modèles quantitatifs sur la toxicité ou la bioaccumulation des métaux traces chez les organismes. Néanmoins, il existe un consensus des processus qui mènent à la bioaccumulation de métaux traces par les microorganismes (Figure 1).

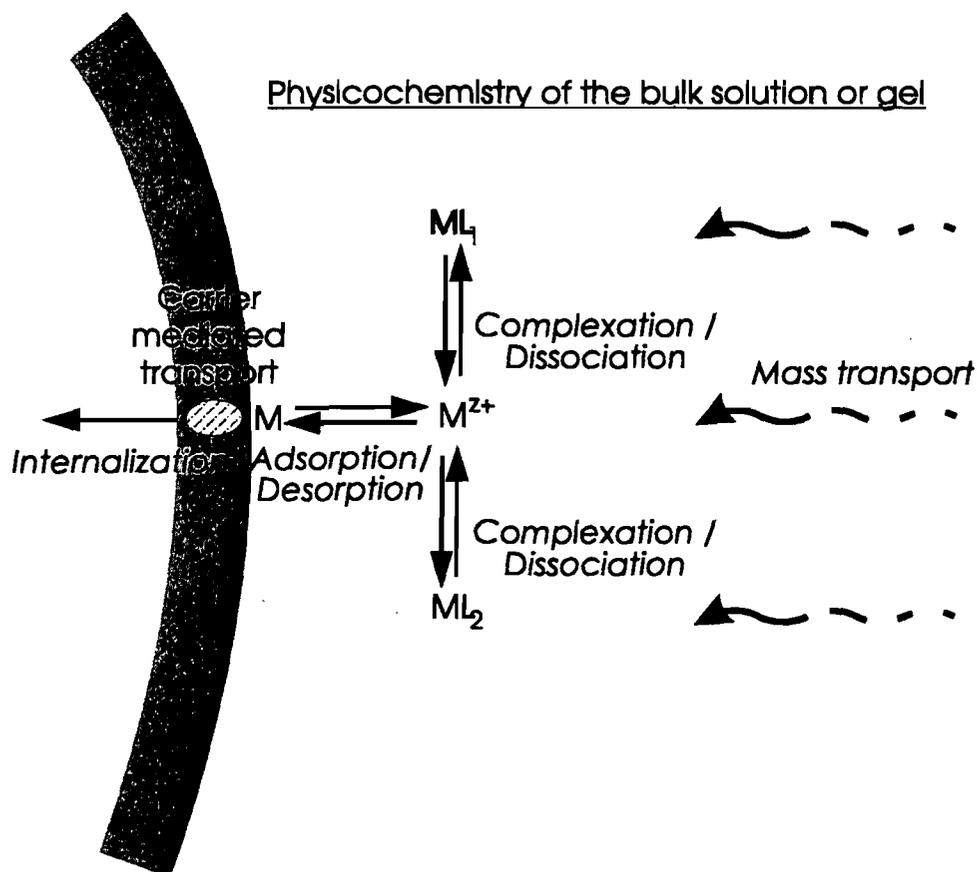


Figure 1 : Principaux processus physico-chimiques menant à la bioaccumulation de métaux traces chez des microorganismes (adapté de ⁵).

En premier lieu, les métaux traces doivent être transportés (transfert de masse) vers le microorganisme. Dans une zone commençant dans le milieu extérieur jusqu'à la paroi cellulaire du microorganisme (la couche de diffusion, *ca.* 20-50 microns), ce transfert a lieu par diffusion. Les métaux traces ne sont pas nécessairement inactifs durant ce

transfert. En effet, un changement de pH, de potentiel de membrane, de concentration en métaux ou en ligands peut changer la spéciation des métaux traces. La labilité des complexes joue aussi un rôle très important. Pour que les métaux traces induisent un effet biologiques aux microorganismes, il faut de d'abord que ceux-ci réagissent avec un site actif de la paroi cellulaire (adsorption/désorption) et qu'ensuite ceux-ci traversent la paroi (internalisation). La grandeur de chacun des ces processus dépendra de la nature des métaux accumulés, le type et la grandeur du microorganisme ainsi que la physico-chimie de la couche de diffusion du microorganisme. Par exemple, des modèles comme le « Free-Ion Activity Model » FIAM⁶ et le « Biotic Ligand Model » BLM⁷⁻¹⁰ supposent que le processus limitant menant à la bioaccumulation est celui d'internalisation. Dans ce cas, le meilleur prédicateur de la toxicité des métaux traces sera effectivement la concentration de l'ion libre, $[M^{2+}]$ ou n'importe quelle espèce chimique à l'équilibre. Cependant, depuis quelques années, il est devenu évident que la supposition d'équilibre n'a pas pu être validée dans un grand nombre de cas pertinents à l'environnement naturel¹¹ (e.g. biofilms, organismes macroscopiques, etc.). Dans ces cas, les complexes labiles deviendraient "biodisponibles" aux organismes et les senseurs chimiques basés sur les principes d'équilibre (électrodes sélectives, membrane de perméation liquide, etc.) pourraient sous-estimer la toxicité des métaux¹¹. D'autres techniques telles que la voltamétrie, mesurent une fraction dynamique des métaux traces, mais ne reflètent pas nécessairement ce qui est "vu" par les organismes. Il est donc primordial de construire des outils analytiques capables de mesurer, *in situ*, la fraction de métal vraiment biodisponible avec le plus de sensibilité possible.

Comme les microorganismes interagissent directement avec la fraction de métal biodisponible (Figure 1), il serait intéressant de trouver un moyen de relier directement cette interaction à un signal analytique. Par exemple, la quantification d'un signal qui dépend de l'induction génomique de l'organisme pourrait être exploitée dans un biocapteur. Les biocapteurs sont des outils prometteurs qui sont déjà utilisés en parallèle avec des techniques chromatographiques, de spectroscopie de masse et de spectrophotométrie pour mesurer, par exemple, la concentration de pesticides¹², de contaminants environnementaux dans l'eau¹³, de nutriments dans le sang¹⁴ et dans la nourriture¹⁵. En plus d'être moins coûteux que ces appareils analytiques classiques, ils demandent une main d'œuvre moins qualifiée pour les utiliser. De plus, en ce qui concerne des évaluations environnementales, les biocapteurs sont faciles à transporter et se prêtent donc bien pour l'analyse de données sur le terrain.

Les biocapteurs sont composés de trois parties : un biorécepteur permettant la reconnaissance moléculaire de l'analyte (élément de reconnaissance), un transducteur et d'une matrice d'immobilisation qui contient l'élément de reconnaissance. La reconnaissance chimique de l'analyte se fait à partir de la sélectivité naturelle d'espèces biochimiques comme des enzymes, des anticorps et des acides nucléiques. Lorsqu'il y a présence des analytes d'intérêts, ces espèces biochimiques produisent un changement dans l'environnement local du transducteur. Celui-ci détecte ce changement en le transformant en un signal mesurable. Ce signal peut être optique, thermique ou électrique.

L'objectif global du projet est de développer un biocapteur qui nous permet d'évaluer la concentration de cadmium biodisponible dans les eaux naturelles. Pour ce projet,

l'élément de reconnaissance utilisé dans le biocapteur est une algue modifiée, *Chlamydomonas reinhardtii*, qui sera développé par d'autres membres du groupe de recherche. Quand cette algue est exposée à des concentrations entre 10^{-10} M et 10^{-6} M de cadmium, certains gènes se trouvent en plus grande expression¹⁶. De même, le transducteur est encore en développement mais il sera composé de fibre optique. Dans ce mémoire, nous sommes surtout concernés par le choix de la matrice d'immobilisation qui doit répondre à certains critères physico-chimiques dans l'optique de l'utiliser dans un biocapteur.

1.2 Théorie sur la diffusion

Il existe deux types majeurs de diffusion en chimie: l'auto-diffusion et la diffusion mutuelle. L'auto-diffusion est régie uniquement par le mouvement d'une espèce sous l'agitation thermique (mouvement Brownien), alors que la migration ou diffusion mutuelle est régie par des gradients de température ou de concentration en plus du mouvement brownien. La diffusion mutuelle se combine donc à l'auto-diffusion. La valeur de ces deux types de diffusion est souvent semblable pour des solutions très diluées. Les expériences réalisées avec une cellule de diffusion ou par la méthode RFAP (chapitre 4) mesurent la diffusion mutuelle (régit selon l'équation (1.1)) à cause de la présence d'un gradient de concentration. Les expériences réalisées par SCF (chapitre 3) mesurent l'autodiffusion (régit selon l'équation 1.2). La diffusion mutuelle désigne la tendance naturelle d'un système à rendre homogènes les concentrations des espèces chimiques en son sein. Le flux de diffusion (J) est régité par la loi de Fick :

$$J = -D_m \nabla C . \quad (1.1)$$

Où D_m est le coefficient de diffusion mutuelle en m^2/s et dépend fortement de la température, ∇C est le gradient de la concentration en mol par m^3 et le signe (-) indique que le flux va des endroits les plus concentrés vers les moins concentrés. L'auto diffusion est le processus par lequel la matière est transportée d'un endroit du système à un autre par collisions moléculaires aléatoires selon l'équation suivante :

$$P = (4\pi Dt)^{-\frac{3}{2}} \exp\left(\frac{(x-x_0)^2}{-4D_a t}\right), \quad (1.2)$$

où P est la probabilité la probabilité de trouver une molécule se trouvant initialement à x_0 à une position x à un temps t . D_a est le coefficient de d'auto-diffusion. Comme les valeurs D_a et de D_m sont semblables dans les conditions de ce travail on utilisera simplement D pour désigner le coefficient de diffusion expérimental.

L'hydrogel employé pour l'immobilisation de *Chlamydomonas* dans un biocapteur doit posséder certaines caractéristiques physico-chimiques faisant intervenir la diffusion. Premièrement, puisque dans les eaux naturelles l'internalisation biologique des métaux traces est souvent l'étape limitante⁵ (Figure 1) tel que les complexes labiles ne contribuent pas à la biodisponibilité. Il faut donc que le flux de diffusion des métaux à l'intérieur de l'hydrogel ne devienne pas limitant par rapport au flux d'internalisation de ces métaux à l'intérieur des microorganismes ce qui pourrait modifier la labilité des complexes. Puisque les flux d'internalisation ont déjà été mesurés pour *Chlamydomonas* en solution¹⁷, il est possible d'évaluer l'effet d'une fine couche d'hydrogel de quelques microns ou dizaines de microns sur le transport dans le capteur. Pour que le biocapteur soit efficace il faudra démontrer que la diffusion théorique des éléments chimiques à

l'intérieur de l'hydrogel est plus rapide que celle de ces mêmes éléments à l'intérieur de l'algue (flux d'internalisation). Pour ce faire, on utilise les deux équations suivantes :

$$J_p = D(C^* - C^0)\left(\frac{1}{\psi}\right), \quad (1.3)$$

$$J_{d,s} = D(C^* - C^0)\left(\frac{1}{\psi} + \frac{1}{r_0}\right), \quad (1.4)$$

où J est le flux de métal où l'indice d,s signifie diffusion sphérique et P signifie planaire. Pour le calcul du flux de métal vers l'intérieur d'un microorganisme, on suppose un modèle sphérique avec un certain rayon et donc on utilise l'équation (1.4) Pour le calcul du flux à l'intérieur d'un gel, on suppose que la diffusion est planaire et donc l'équation (1.3) est la plus appropriée, où C est la concentration du métal dans la solution ($*$) ou à la surface du microorganisme ou du gel (0), ψ est l'épaisseur de la couche de diffusion et r_0 le rayon de la sphère. On remarque que pour le gel il n'y a pas de diffusion sphérique et le terme r_0 de l'équation (1.4) disparaît. En comparant le flux de métal pour différentes épaisseurs de gel et les flux expérimentaux d'internalisation de ce même métal pour un microorganisme d'un certain rayon on pourra alors déterminer quelle est l'étape limitante. Deuxièmement, il faut que le gel soit biocompatible avec les algues afin que celles-ci puissent vivre normalement pendant un certain temps à l'intérieur de l'hydrogel. Troisièmement, il faut que la température de gélification soit inférieure à 37 °C afin d'éviter des dommages et des stress biologiques chez *Chlamydomonas*. Quatrièmement, pour ne pas trop ralentir la diffusion des cations, l'utilisation de gels neutres où il n'y a pas d'interactions électrostatiques entre le gel et le cation serait préférable. Les gels possédant une charge risque de se dénaturer¹⁸ sous conditions de faible force ionique qui

pourraient être rencontrées dans les eaux douces du Bouclier canadien. Par exemple, sous ces conditions, les charges présentes sur des gels d'alginate ne sont pas écrantés suffisamment pour que les molécules dans le gel soient à une distance adéquate pour former le réseau polymérique du gel. Le gel perd donc son intégrité et peut se dissoudre. De même, la complexation du métal par le gel¹⁹ pourrait ralentir la diffusion des cations à l'intérieur de celui-ci.

1.3 Revue de littérature des gels utilisés pour l'immobilisation de microorganismes.

Une technique d'immobilisation pour l'algue *Dunaliella salina* a été développée pour des mesures RMN²⁰. Dans cet article, les auteurs ont immobilisé l'algue dans des petites billes d'agarose selon la méthode de Nilsson et al²¹. La température d'immobilisation pour cette technique est de 37 °C. Ils ont observé que les cellules immobilisées dans les particules d'agarose avaient maintenu leurs fonctions vitales de photosynthèse sur des semaines. De plus, l'immobilisation de cette même algue avec un gel d'alginate de calcium avait été reportée. Cependant, Oren-Shimer *et al.*¹⁸ avaient remarqué des problèmes d'intégrité du gel à cause de sa forte charge.

Dans un autre article²², les auteurs ont immobilisé *Chlamydomonas sp* dans un gel d'agarose à faible point de gélification (Boehringer Mannheim, Germany) afin de mesurer la consommation d'oxygène des algues, car la mesure de consommation d'oxygène pour une seule cellule est impossible. Dans cet article, ils ont aussi observé que l'immobilisation dans l'agarose n'a pas endommagé les cellules car celles-ci continuaient à se diviser normalement pendant une semaine.

Shankar *et al.*²³ ont utilisé un gel d'agarose de type SeaPlaque pour l'immobilisation d'une levure pour la production d'éthanol selon la méthode élaborée par SivaRaman *et al.*²⁴. Dans cette technique, la température ne dépasse pas 40 °C une fois que les levures sont mélangées à l'agarose. Cette méthode peut aussi être utilisée pour les cellules sensibles à la chaleur comme la *Chlamydomonas*, donc en bas de 37° C.

Bagal et Karve²⁵ ont utilisé un mélange d'agarose et de gomme de guar pour immobiliser un enzyme. L'utilisation de ce mélange de biopolymère ne coûte pas cher, il n'y a pas d'absorption non spécifique sur la membrane par l'analyte et il possède une très bonne biocompatibilité. La porosité du biopolymère peut être ajustée en jouant avec les concentrations de chacun des composants. L'article n'indique pas la méthode détaillée du processus d'immobilisation ni la température à laquelle il faut chauffer pour la fabrication du gel.

Zvitov *et al.*²⁶ ont utilisé un mélange d'agarose et de glycérol pour immobiliser les bactéries *E. coli* et *S. marcescens* pour étudier la viabilité des bactéries sous l'influence d'un champ électrique. Leur but était d'utiliser un champ électrique pour stériliser les instruments médicaux qui sont souvent contaminés par des bactéries prises dans des biofilms. Les bactéries sont immobilisées dans des petites billes d'agarose de 4.3 mm de diamètre. Les bactéries sont ajoutées au mélange après que l'agarose soit refroidie à 35 °C. Bien que le glycérol n'ait pas d'effets néfastes sur les bactéries, aucune donnée n'a été présentée pour les algues.

Dans un article plus récent ²⁷, Mulchandani *et al*, ont immobilisé la bactérie *Escherichia coli* dans un gel d'agarose à faible point de gélification pour la fabrication d'un biocapteur pour mesurer des composés neurotoxiques d'organophosphates provenant de pesticides. Les bactéries sont incorporées à un gel d'agarose (1%) à une température de 37 ° C. La stabilité du biocapteur a été évaluée en mesurant la réponse du biocapteur à un pesticide. Après un mois et 75 utilisations du biocapteur, la stabilité de celui-ci a finalement commencé à diminuer. D'autres articles plus récents mentionnent l'utilisation de l'agarose comme méthode d'immobilisation soit pour des bactéries^{28, 29} soit pour de l'ADN³⁰. Les propriétés physicochimiques et l'utilisation principale du gel sont résumées dans le Tableau 1.

Pour finir, il faut mentionner quelques autres gels qui ont été employés dans des biocapteurs. Par exemple, il existe plusieurs articles qui utilisent l'alginate pour l'immobilisation de *Chlamydomonas*³¹⁻³³. Par exemple, Ping *et al.*³⁴ ont utilisé un mélange 0.15% d'alginate de sodium, 4 % de SiO₂ et 10% d'alcool polyvinyle mais ils n'ont pas fourni d'information détaillant comment l'algue a réagi dans un tel mélange ni à quelle température la gélification s'est faite. Ces gels fonctionnent bien pour l'immobilisation des algues et des bactéries³⁵⁻³⁷ mais ont une charge significative qui pourrait nuire au transport des cations. De plus, à faible force ionique le gel risque de se défaire suite à la perte d'ions de calcium. Les mêmes problèmes pourraient arriver avec des gels comme la pectine et le carrageen³⁸. De même, les gels de

polycarbamoylsulphonate (PCS) possèdent une meilleure stabilité que l'alginate, la pectine et le carrageen, mais ils sont aussi négativement chargés.

Tableau 1: Tableau résumant les propriétés physico-chimiques des gels d'agarose utilisés dans la littérature pour l'immobilisation de microorganismes.

Type de gel	Température de gélification	de Charge du gel	Espèces immobilisées	Références
Agarose FPG (sigma)	Moins de 37	Très faible	<i>Dunaliella salina</i>	Bental <i>et al</i> ²⁰
Agarose FPG (Boehringer Mannheim)	Moins de 37°C	Très faible	<i>Chlamydomonas sp</i>	Messerli <i>et al</i> ²²
Agarose Sea Plaque	Moins de 40 °C	Très faible	levure	Shankar <i>et al</i> ²³
Agarose et gomme de guar	Non spécifié	Très faible	enzyme	Bagal et Karve ²⁵
Agarose et glycerol	Moins de 37° C	Tres faible	<i>E. coli</i> et <i>S. marcescens</i>	Zvitov <i>et al</i> ²⁶
Agarose FPG	Moins de 37 °C	Très faible	<i>Escherichia coli</i>	Mulchandai <i>et al</i> ²⁷
Agarose	Moins de 37 °C	Très faible	<i>Bacillus subtilis</i>	Tammevesk <i>et al</i> ²⁸
Agarose FPG Type (IX-A, Sigma)	17°C	Non spécifié	sulfate-reducing bacteria	Edenborn <i>et al</i> ²⁹
Agarose et casein	Moins de 30 °C	Non spécifié	adenosine deaminase (ADA)	Dessouki <i>et al</i> ³⁰

Enfin, Mahan *et al.*³⁹ ont utilisé un gel de silice pour immobiliser des algues. Dans ce cas, le processus de gélification nécessite de mélanger l'algue et la silice à une

température de 105 °C qui ne serait sûrement pas approprié pour une algue verte. De plus, la silice possède une charge négative à un pH neutre.

En résumé, il semble que les gels utilisés pour des biocapteurs, autres que l'agarose, ne satisfont pas les critères recherchés. Le gel d'agarose semble donc être le meilleur choix comme matrice d'immobilisation. L'agarose à faible point de gélification a été utilisée avec succès pour l'immobilisation d'algues et de microorganismes, i.e. deux des trois critères qui ont été décrits précédemment. Il reste donc à vérifier expérimentalement l'effet du gel sur la diffusion des cations afin de valider l'utilisation potentielle de l'agarose à faible point de gélification comme matrice d'immobilisation dans un biocapteur.

1.4 Caractéristiques chimiques principales d'un gel d'agarose.

L'agarose est un polymère linéaire composé de deux unités le-(1→3)-β-D-galactopyranose- et le (1→4)-3,6-anhydro-α-L-galactopyranose :

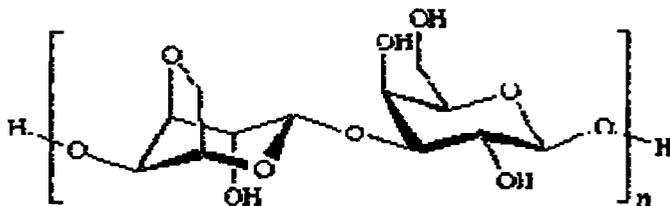


Figure 2 : Structure chimique de l'agarose.

L'agarose possède une structure en double hélice⁴⁰ qui est stabilisée par des ponts hydrogènes provenant des molécules d'eau situées à l'intérieur de la cavité de l'hélice et

les groupements hydroxyles des chaînes latérales du polymère. C'est pour cette raison que le gel doit être préservé dans l'eau pour qu'il conserve son intégrité.

L'agar est un mélange d'agarose et de d'agaropectine qui est isolé de la paroi cellulaire d'une algue rouge *Gracilaria*. L'agaropectine est lui un mélange hétérogène de molécules plus petites, qui s'accrochent à la chaîne d'agarose dans des proportions plus faibles. Leurs structures sont semblables, mais celles-ci peuvent contenir des groupements sulfates, méthyles et d'acide pyruvique. L'agarose à faible point de gélification est de l'agar auquel on a enlevé l'agaropectine, mais comme l'agarose ne peut être pur à 100% celui-ci aura toujours une charge négative en milieu aqueux provenant des groupements d'acide pyruvique ($pK_a=2.39$) de l'agaropectine résiduelles. De plus, plus l'agarose est pur, plus son point de gélification sera bas.

1.5 Objectifs

Dans ce projet, la diffusion d'analyte à l'intérieur du gel d'agarose à faible point de gélification nous intéresse plus particulièrement. Différentes méthodes seront utilisées pour y parvenir comme par cellules de diffusion couplées à des mesures de concentrations par spectroscopie U.V. ou de Spectroscopie d'Absorption Atomique avec Four Graphite (SAAFAG); la Spectroscopie par Corrélation de Fluorescence (SCF) ainsi que par la technique de Récupération de Fluorescence Après Photoblanchiment (RFAP). Dans cette optique, le chapitre 2 sera consacré à l'optimisation de la technique SCF. Le chapitre 3 sera consacré aux mesures de diffusion d'analyte à l'intérieur du gel d'agarose par ces différentes techniques.

Comme il est difficile d'évaluer la biodisponibilité des métaux *in-situ* l'objectif final du projet est de développer un biocapteur pour mesurer les risques écotoxicologiques dus à la présence de métaux dans l'environnement. Par contre, pour arriver à cette finalité, la vérification de sous objectifs est nécessaire et fait l'objet de ce mémoire. Les objectifs spécifiques de ce travail sont donc :

- De caractériser la diffusion du cadmium à l'intérieur du gel d'agarose à faible point de gélification par cellule de diffusion.
- De caractériser la diffusion de fluorophores à l'intérieur de ce même gel par cellule de diffusion et avec la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF).
- D'optimiser la technique de spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF).
- De comparer les coefficients de diffusion du Cadmium et des fluorophores obtenus par les différentes techniques (Cellules de diffusion/SAAFG, Cellules de diffusion/UV et SCF).
- D'utiliser la technique RFAP pour la mesure de coefficient de diffusion de R6G et RB dans le gel d'agarose.
- De vérifier que l'utilisation du gel d'agarose à faible point de gélification comme matrice d'immobilisation n'ajoute pas un processus limitant à la bioaccumulation du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii*.

2. Diffusion coefficients of rhodamine derivatives as determined by Pulsed Field Gradient – Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy*

2.1 Abstract

Rhodamine derivatives are popular fluorophores that are used in a number of fluorescent based techniques, including fluorescence correlation spectroscopy (FCS), due to their excellent photostability. Indeed, in FCS, both rhodamine 6G (R6G) and rhodamine 110 (R110) have been used to calibrate the instrument confocal volume. In spite of the need for precise values of the diffusion coefficients for these standards, literature values are scarce and vary over an order of magnitude. In this paper, the diffusion coefficients of four rhodamine fluorophores (rhodamine 6G (R6G), rhodamine B (RB), rhodamine 123 (R123), rhodamine 110 (R110)) were determined by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance (PFG-NMR) spectrometry and then validated by comparison with fluorescence correlation spectroscopy. With the objective of validating the FCS calibration, diffusion coefficients of several dextrans and a polystyrene nanoparticle were also determined and compared with literature or theoretical values based upon the Stoke-Einstein equation. The work presented here leads us to conclude that the diffusion coefficients for R6G and R110 have generally been underestimated in the literature.

*Gendron, P.O., Avaltroni, F., Wilkinson, K.J. in press: *J. Fluorescence*

We propose revised values of $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for R110 and $4.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for R6G. Using the revised D value for R110 to calibrate the FCS instrument, diffusion coefficients were then systematically determined for different conditions of pH, ionic strength and concentration. To correct for differences due to solvent effects (D_2O vs. H_2O), an isotopic correction factor, $D_{\text{D}_2\text{O}}/D_{\text{H}_2\text{O}}$ of 1.23, was determined from both FCS and from the solvent auto-diffusion coefficients obtained from NMR.

2.2 Introduction

Due to their photostability, their large extinction coefficients and high fluorescence quantum yield⁴¹, rhodamine derivatives are widely used for diffusion measurements or as labels in environmental⁴²⁻⁴⁶ biochemical⁴⁷⁻⁵¹ and interfacial studies⁵². Among other uses, they are employed to calibrate fluorescence correlation spectroscopy (FCS), a technique now widely employed to determine molecular sizes and to characterize translational (Brownian) diffusion^{19, 53} in complex media. Nonetheless, despite their use as calibration standards, their translational diffusion coefficients in water have not been precisely characterized, due in part to the inherent difficulty in measuring D precisely and to the fact that values of the diffusion coefficients will depend upon concentration, ionic strength and pH due to dimerization⁵⁴⁻⁵⁶ and/or aggregation effects. Indeed, literature values of D , where available, vary by nearly an order of magnitude (Tables 1-2).

Since large errors in the diffusion coefficients will introduce systematic errors of similar magnitude on the final FCS measurements, the aim of the present work was to determine accurate and precise values of translational diffusion coefficients for several rhodamine

derivatives (Figure 3) (Rhodamine 6G (R6G), Rhodamine B (RB), Rhodamine 123 (R123), Rhodamine 110 (R110)) under relevant conditions of pH, ionic strength and concentration. In FCS, values of $2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (R6G)⁵⁷ and $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (R110)⁵⁸ are commonly employed to calibrate the instrument (these references have been cited in the FCS theory). Therefore, one objective was to verify the accuracy of these values. The study was performed initially using pulsed field gradient nuclear magnetic resonance (PFG-NMR)⁵⁹ then validated using FCS^{57, 60}.

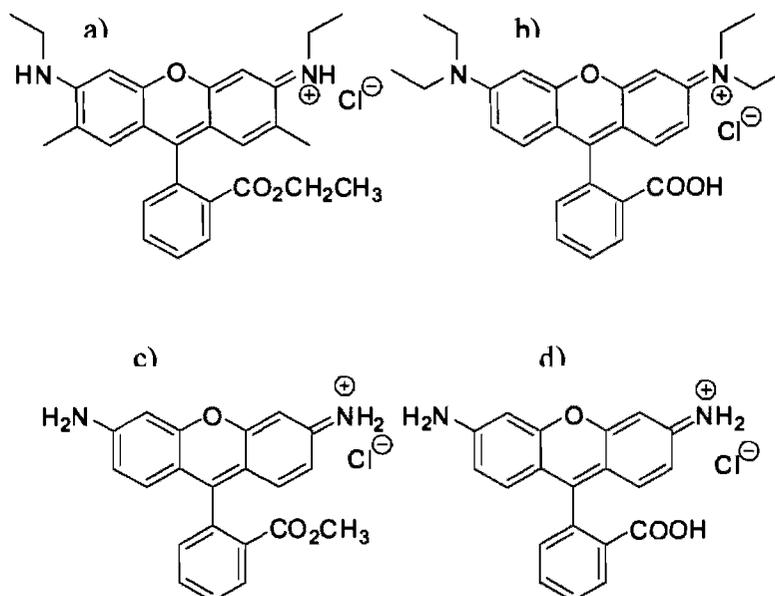


Figure 3: Structures of rhodamine derivatives.

(a) Rhodamine 6G, (b) Rhodamine B, (c) Rhodamine 123 and (d) Rhodamine 110.

2.3 Theory

In FCS, translational diffusion coefficients are determined by measuring diffusion times of a fluorescent probe inside a carefully calibrated small (confocal) volume (typically $\sim 0.2 \mu\text{m}^3$). Variations of the fluorescence intensity inside the confocal volume are attributed to the translational diffusion of a small number of fluorophores. For a 1-

component system, in the absence of phosphorescence, diffusion times are determined from an auto-correlation function, $G(t)$:

$$G(t) = a + \frac{1}{n} \left(1 + \frac{t}{\tau}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{p^2 \tau}\right)^{-0.5}, \quad (2.1)$$

where a is the limiting value of $G(t)$ for $t \rightarrow \infty$ (usually $a = 1$), n is the average number of fluorescent particles diffusing in the confocal volume, τ is the diffusion time of the fluorescent species inside the confocal volume, p is the structure parameter (which is the ratio of the transversal ω_{xy} to the longitudinal ω_z radius of the confocal volume $p = \omega_z/\omega_{xy}$). Diffusion coefficients of the unknown molecules or particles are calculated from their diffusion times following calibration of the dimensions of the confocal volume, generally using R6G ($D=2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) or R110 ($D=3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

In a PFG-NMR experiment, magnetic pulsed-field gradients with a stimulated echo sequence, as describe by Stejskal *et al*⁶¹, are applied to the sample in addition to the instrument's static magnetic field. The gradient pulse labels the nuclear spin based upon the molecule's position in solution. After diffusing a short distance through solution, a decoding gradient pulse is applied. The intensity, I , of the resonances of the molecule in the NMR spectrum will be attenuated in proportion to the magnetic gradient pulse amplitude G (T/m) and the diffusion coefficient D :

$$I = I_0 \exp \left[-D(G\delta\gamma)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right], \quad (2.2)$$

where I_0 is the signal intensity or integral in the absence of the gradient pulse, δ is the duration of the pulse, γ is the gyro-magnetic ratio of the nucleus under investigation and

Δ is the diffusion delay time. This equation holds only for simple PFG-NMR experiments and is slightly modified for more sophisticated pulse sequences⁶². The optimization of PFG-NMR experiments to achieve precise measurements of the diffusion coefficient has been addressed by Antalek⁶³.

For hard spheres, diffusion coefficients can be determined from their radius using the Stokes-Einstein equation:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (2.3)$$

where k is Boltzmann's constant, T is the temperature, η is the viscosity and r the hydrated radius of the particle.

Since NMR experiments are more easily performed in D_2O , it is necessary to correct for the isotopic effect on the translational auto-diffusion coefficients. The dependency of the diffusion coefficient on temperature, T , is strong and different for the two isotopes and can be taken into account using the following equation⁶⁴:

$$\frac{D_{H_2O}}{D_{D_2O}} = 0.9194 \frac{\left(\frac{T - 209.443}{209.443}\right)^{2.191}}{\left(\frac{T - 222.54}{222.54}\right)^{2.011}}. \quad (2.4)$$

The above constants are auto-diffusion coefficients that reflect the friction of the solvent on itself. Assuming that rhodamine-rhodamine interactions are negligible due to the high

dilution used in the experiments (for FCS, concentrations are $< 10^{-8}$ M), a solvent friction similar to that of the water should be determined:

$$\frac{D_{H_2O}}{D_{D_2O}} \approx \frac{D(\text{rhodamine})_{H_2O}}{D(\text{rhodamine})_{D_2O}} = \frac{\tau(\text{rhodamine})_{D_2O}}{\tau(\text{rhodamine})_{H_2O}}. \quad (2.5)$$

Since diffusion times, τ , can be measured directly within a given confocal volume, no mathematical assumptions are required in order to determine the isotopic effects of solvent deuteration on the diffusion coefficients (Eq 2.5) by FCS.

2.4 Materials and Methods

Compounds R6G, R110 (laser grade, 99%) and three dextrans labeled with tetramethylrhodamine (molar masses of 10000, 40000 and 70000) were purchased from Molecular Probes. R123 (>99%) and RB (>99%) were obtained from Sigma-Aldrich while the polystyrene nanoparticles (57 nm diameter, green dragon label) were purchased from Bangs Laboratory. Solutions of the four fluorophores (R6G, R123, R110, RB) were prepared in Milli-Q water or in D₂O (Sigma Aldrich) at final concentrations of $\leq 10^{-7}$ M (FCS) or 0.016, 0.08, 0.4 and 2.0 mM (NMR experiments). For experiments examining pH (pD) or ionic strength effects using NMR, KOD or DCl was used to adjust the pD (2.9, 7.3, 10.3) and KCl was added to adjust I (2, 10 and 100 mM). Due to the limited solubility of some of the fluorophores, some experiments were performed in aqueous solutions of MeOH or MeOD that were purchased from Sigma-Aldrich. Water was Milli-Q grade ($R > 18$ M Ω cm, total organic carbon concentrations < 2 μ g C L⁻¹). High purity potassium chloride, potassium hydroxyde and nitric acid were employed for pH and ionic strength adjustments.

FCS

Two FCS devices were employed in this study. The first (Geneva) was a Confocor Axiovert 135TV on a Carl Zeiss platform while the second was a system that was mounted on a Leica TCS SP5 laser scanning microscope (Montreal). Excitation of the rhodamine derivatives was performed using an Ar ion laser at 488 or 514 nm. Fluorescence intensity fluctuations were quantified with an avalanche photodiode detector. Three experiments, each with 10 replicate measurements, were performed for each experimental condition. Due to the temperature dependence of the diffusion coefficients, temperature was carefully measured and controlled (22.5 °C). On the Confocor instrument, data were acquired with a control program from Carl Zeiss Jena GmbH (version 1.2.1) and interpreted using FCS Access Fit Software (version 1.0.12, Evotec BioSystems GmbH). The Leica SP5 used ISS Vista FCS software (version 3.6_37). The FCS confocal volume was calibrated using 5 known concentrations of R110 with an assumed initial diffusion coefficient of $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ or with R6G ($D=2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). FCS was also used to determine the isotope effect ($\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$) on the diffusion coefficients of the rhodamine derivatives. In that case, diffusion times were measured in D_2O or H_2O without calibration of the confocal volume.

PFG-NMR

Nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were performed on a Bruker Avance 400 and 600 MHz instrument. In order to compare diffusion coefficients acquired by NMR with those obtained using FCS, the temperature of the NMR measurements was

matched to that of the FCS measurements (22.5 °C). Finally, in order to ascertain that the measurements were reproducible, 3 to 12 different peaks (see Figure 1A in appendix for NMR spectrum) were used for D determinations, depending on concentration and signal quality. Under these conditions, 7168 scans were required to acquire data with an acceptable signal to noise ratio for the least concentrated solutions (16 μM) of R6G and RB while 256 scans were performed for the other conditions. Eight to sixteen different gradient strengths from 0.01 to 2 T m^{-1} were used for each PFG-NMR experiment to fit for the diffusion coefficients (see Figure 2A in appendix). Errors of D determined by NMR should be lower than 10 % for the least concentrated samples (16 μM).

2.5 Results and Discussion

Determination of water isotopic effect on D

NMR diffusion measurements of fluorophores are greatly facilitated by performing the measurements in D_2O . For comparison with values obtained in H_2O , it is necessary to quantify the isotopic effect. As expected, diffusion times of the rhodamine derivatives obtained in D_2O were significantly slower than those obtained in H_2O , corresponding to smaller D values in D_2O . Indeed, for R6G, R123 and RB, the ratio of the diffusion coefficients was 1.23 at 22.5°C, which compares well with values obtained previously by experimentation⁶⁵ (1.26) or by simulation⁶⁶ (1.20).

Determination of D for R110 and R6G

Two fluorophores are commonly used as diffusion coefficient standards in FCS: R6G ($D=2.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) and R110 ($D=3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Following correction for the isotopic

effect, a D value of $4.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was determined by NMR for R110. Nonetheless, due to the fluorophore's limited solubility and the small number of non aromatic protons (fewer signals), the uncertainty on the value was quite large, *ca.* 21%. For R6G, a value of $(4.0 \pm 0.3) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was determined by NMR for R6G. Both D values were significantly higher than the generally accepted literature values but were less precise. Therefore two complementary strategies were employed to reduce uncertainty and increase accuracy of the D values: (i) *for model fluorophores*, diffusion coefficients determined by FCS (using standard calibrations of the confocal volume) were compared to values determined by NMR and (ii) *for model size standards*, D values determined by FCS were compared to theoretical values calculated from the Stokes Einstein equation.

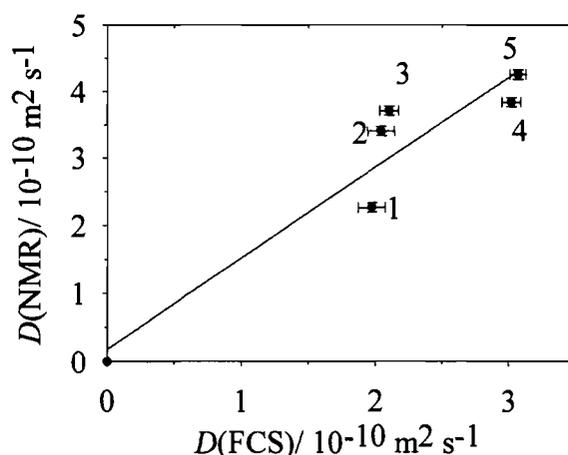


Figure 4: Experimental diffusion coefficients determined by NMR as a function of those determined by FCS.

(Assuming a value of $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ during the calibration of the confocal volume with R110). Several fluorophores/conditions were examined: 1) R6G in 50% MeOH, 50% H_2O ; 2) R110 in 5% MeOD, 95% D_2O ; 3) R110 in 10% MeOD, 90% D_2O 4) R6G in H_2O 5) RB in H_2O .

Based upon a calibration using R110, diffusion coefficients were obtained for a number of standard solutions using NMR and FCS (Figure 4): When plotted together, FCS values

were on average 41% lower than values obtained by NMR after correction for the D_2O isotopic effect. For example, in addition to the larger D values that were observed above for R110 and R6G, a value of $4.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was obtained by NMR for RB.

Literature values of the diffusion coefficients of three dextran standards ⁶⁷ and that of a polystyrene particle standard determined from the Stokes Einstein equation (Eq. 2.3) were plotted (Figure 5) against values of D obtained from FCS. By calibrating the FCS with a D value of R110 = $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, FCS determinations were once again significantly smaller than theoretical values for the particles (slope = 1.33, $R^2 = 0.913$). The value of the slope suggests that D for R110 should be on the order of $4.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

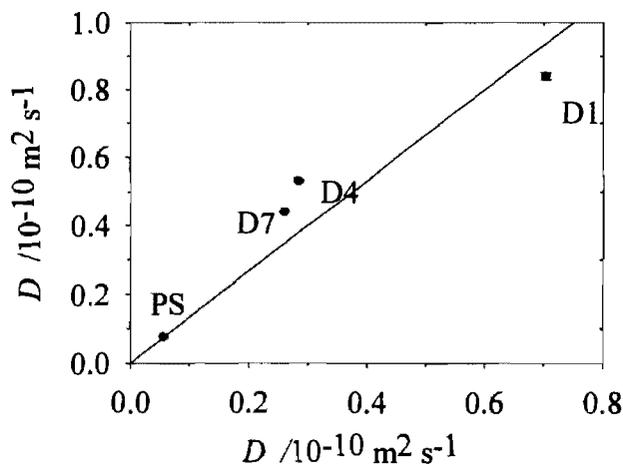


Figure 5: Theoretical diffusion coefficients of particle standards determined as a function of those determined by FCS.

(Assuming a value of $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ during the calibration of the confocal volume with R110). Several particle standards were examined: 10000 molar mass dextran (D1); 40000 molar mass dextran (D4), 70000 molar mass dextran (D7) and a polystyrene particle standard (PS) with a radius of 57 nm error bars are smaller than their symbols.

Based upon the above data, all FCS experiments were recalibrated using an intermediate D value of $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for R110. Using the new calibration, revised slopes of 1.01 were obtained for Figure 3 ($R^2=0.90$) and 1.01 for Figure 4 ($R^2=0.999$). The above experiments also imply a significantly higher value of D for R6G of $3.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (also see below).

Critical evaluation of the revised D values

Both the NMR results and the FCS measurement of the standard compounds indicated a significant underestimation of the generally accepted values of the diffusion coefficients for R110 and R6G. Nonetheless, other D values are available in the literature for R6G (and RB) that are more in line with the values determined here (Tables 2,3). For example, our values are consistent with those determined previously in aqueous solutions by capillary/ microchannel electrophoresis and voltammetry: $(4.0-4.6) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for R6G (Table 2), and $4.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for RB (Table 3). In fact, most of the lower values of D in the literature were previously determined by FCS. Some of the uncertainty on the literature values may result from a lack of a control over temperature or fluorophore concentration or to the absence of a correction for the isotope effect for experiments performed in D_2O .

It is nonetheless necessary to be critical of the results provided here. It is notable that few fluorescent compounds are currently available with precisely known values of their diffusion coefficients. Furthermore, orthogonal methods are rarely used to confirm D values. For the FCS evaluations of the particle standards, diffusion coefficients were

outside the calibration range of the rhodamine derivatives. With respect to diffusion coefficient determinations made using NMR, the measurements are much more accurate when performed at fairly high concentrations in D_2O . The correction for the isotopic effect adds some uncertainty to values required in H_2O . More importantly, some of the compounds that were examined have a tendency to dimerize or aggregate at high concentrations^{54, 55} which could result in an apparent decrease in D . The effect of fluorophore concentration was examined in detail in the next section.

Table 2: Summary of diffusion coefficients determined from the literature for Rhodamine 6G.

Conditions	D ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Technique	Ref
Water	2.8 ± 0.3	FCS	57
Water, 20 °C	3	FCS	68
Water / D ₂ O	$2.9 \pm 0.7^*$	NMR	69
Water	4.0	-	70
0.2 M KCl, pH 7.0	$D_{\text{Ox}} = 4.0$ $D_{\text{Red}} = 4.2$	Voltammetry Ox and Red species not specified	71
20 mM Boric acid, 100 mM Tris, 25°C	4.59	E-Field method	72
20 mM Boric acid, 100 mM Tris, 25°C	4.14 ± 0.01	capillary/microchannel electrophoresis	72
50:50 water/methanol	2.71 ± 0.09 2.684 ± 0.005 2.69 ± 0.02 2.88 ± 0.17	capillary/microchannel electrophoresis, various detection techniques	72
50:50 water/methanol	2.7 ± 0.1	capillary/microchannel electrophoresis	73
Various combinations of water and alcohol	2.9 ± 0.3 (ethanol) 2.5 ± 0.3 (60:40 H ₂ O/methanol) 2.5 ± 0.2 (50:50 H ₂ O/methanol) 2.8 ± 0.3 (40: 60 H ₂ O/methanol) 3.4 ± 0.4 (20: 80 H ₂ O/methanol) 4.5 ± 0.6 (5: 95 H ₂ O/methanol)	Patterned FCS	74

* Values were not corrected for isotopic effect. Corrected values would be ca. $3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

Table 3: Summary of diffusion coefficients determined from the literature for Rhodamine B.

Conditions	D ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Technique	Ref
20 mM Boric acid, 100 mM Tris, 25°C	4.27 ± 0.04	capillary/microchannel electrophoresis	⁷²
0.05 M H ₂ SO ₄ , 9.6 10 ⁻⁴ M Rhodamine B	3.2 ± 0.2	Rotating disk voltammetry	⁷⁵
Water, 21.5°C	3.6	Time-lapse microscopy	⁴⁷

Effect of concentration on D

For R110, it was not possible to perform NMR experiments in the same concentration range as R6G and RB due to its limited solubility and the scarcity of non-aromatic protons. Indeed, only a single peak could be used to determine the diffusion coefficient for R110 after 48 hours of instrument time and a nominal concentration of 0.05 mM. Due to the sensitivity differences of the NMR and FCS techniques, the examined concentration ranges did not overlap. For both R6G (Figure 6a) and RB (Figure 6b), diffusion coefficients decreased significantly (ANOVA, $p < 0.05$) as a function of the fluorophore concentration for concentrations down to 16 μM . Such results are consistent with the work of Dare-Doyen *et al* who have shown that in the mM to μM range, R6G has a strong tendency to dimerize in water. No such decrease was observed for R110 nor R123, although this was mainly due to our inability to perform systematic NMR experiments at the higher concentrations necessary for NMR. For all of the fluorophores that were examined, no apparent aggregation was observed for concentrations below 100 nM (Figure 6). Note that some controversy exists in the literature on the importance of the R6G dimers. Sariri *et al* have shown that the monomer: dimer abundance was invariant with concentration, while Daré-Doyen *et al* showed with molecular modeling studies that the dimerization was thermodynamically favorable. In the PFG-NMR

experiments, the reduction of D with increasing concentration indicated that dimerization/aggregation was indeed favored at the higher fluorophore concentrations, suggesting that the thermodynamic explanation is the most appropriate here. The concentration effect observed here might also partially explain why such a large variation of diffusion coefficients has been observed in the literature for these compounds: each technique has its own analytical window. It would appear that the rhodamine monomers are stable only at the lowest concentrations in aqueous solution. Given the important role of concentration on the dimerization or aggregation of these partially charged fluorophores, ionic strength and pH effects were also examined.

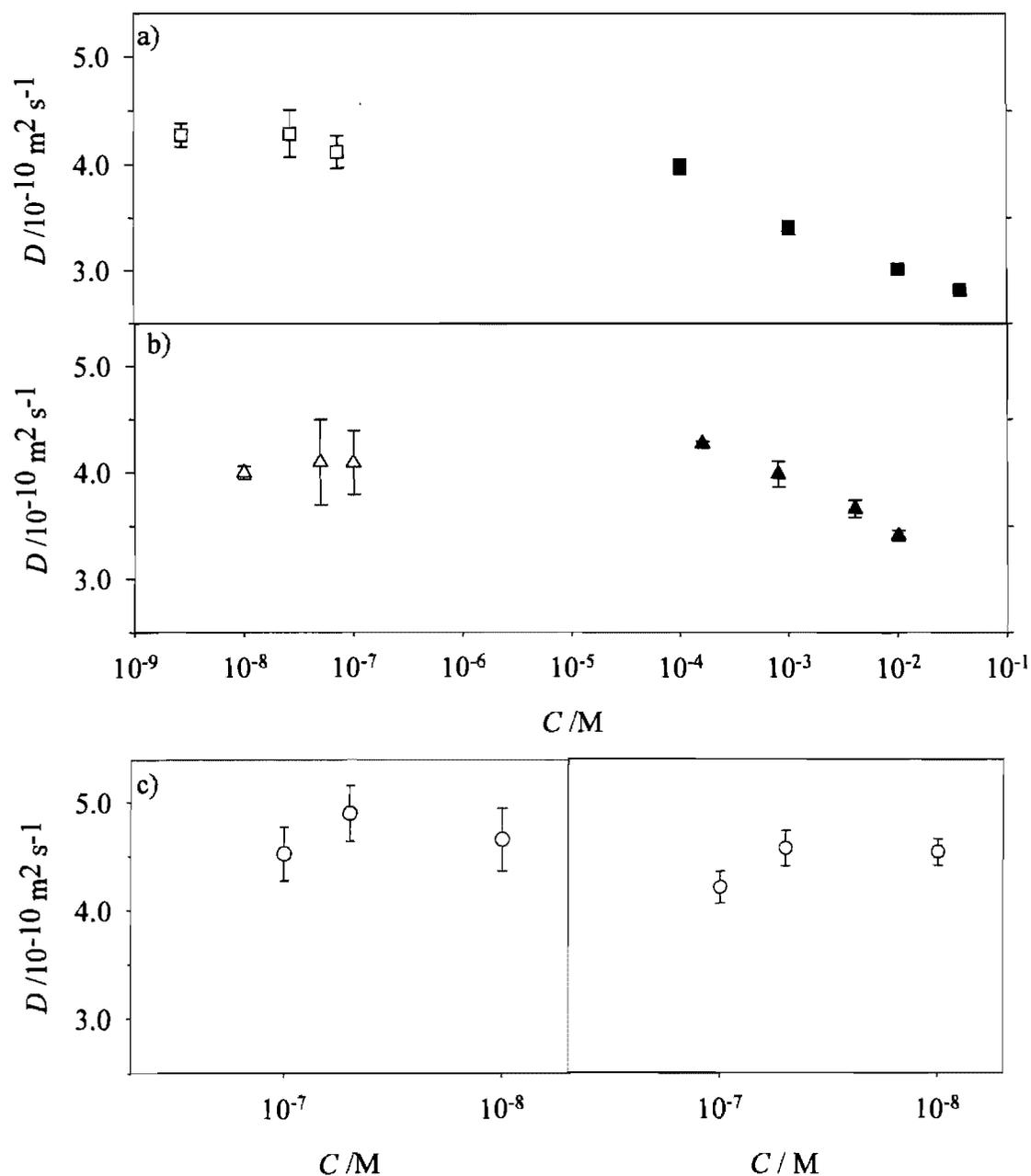


Figure 6: Influence of the concentration on the diffusion coefficient of 4 rhodamine derivatives.

As determined by FCS (white symbols) and NMR (full symbols). Figures correspond to: a) R6G, b) RB, c) R123, d) R110. NMR experiments were performed in D_2O at pH 6.5 at an ionic strength of 2 mM, FCS experiments were performed in H_2O at pH 5.8 at the same ionic strength.

Effect of ionic strength and pH on D

For charged molecules, increased ionic strength is expected to result in increased charge screening leading to decreased electrostatic repulsion and increased aggregation (smaller D). For ionic strengths varying between 10^{-4} M and 10^{-2} M (10^{-1} M for R6G, Figure 7a), no significant changes in the diffusion coefficient were observed for any of the 4 fluorophores (Figure 7, ANOVA, $p > 0.05$). Observed variations were within the analytical precision of the two techniques that were used. For R6G, the large observed difference in the results obtained by FCS and NMR were attributed to the very different concentrations that were employed for the analysis (FCS: $0.1 \mu\text{M}$; NMR: 2 mM).

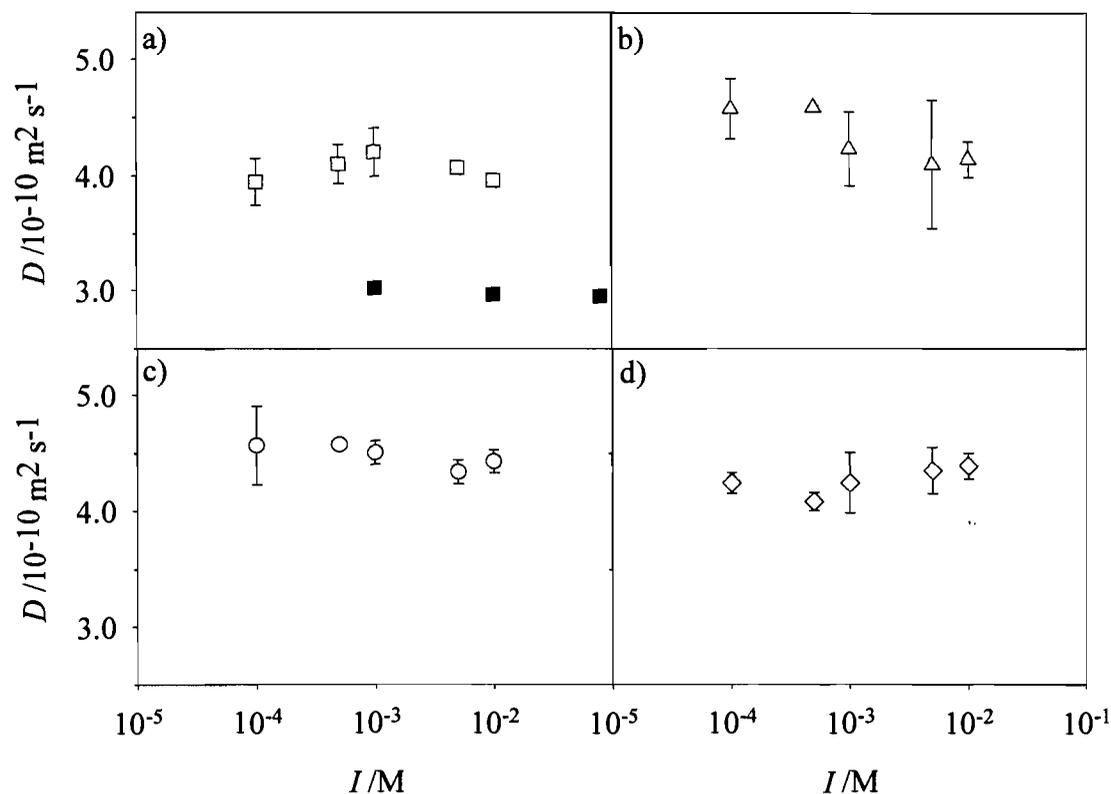


Figure 7: Influence of the ionic strength on the diffusion coefficient.

(a) R6G, (b) RB, (c) R123 and (d) R110 as determined by FCS (white symbols) and NMR (full symbols). FCS experiments were performed using 100 nM of each fluorophore, pH=6.35 whereas 2 mM of fluorophore was used in the NMR experiments (pH= 5.35).

Given the protonable functional groups in all of the fluorophores, changes in pH could be expected to vary the intermolecular electrostatic repulsion resulting in potentially large increases in aggregation. For the conditions that were examined here (Figure 8), a significant role of pH was observed only at very high pH values corresponding to the deprotonation of the amine protons on the R6G, RB and R110. No significant changes were observed for any of the fluorophores below pH 9.5. Furthermore, for the higher concentrations of the NMR experiments, no changes in D were observed for R6G. Nonetheless, it should be noted that due to solubility concerns, pH was not manipulated

over the same range as for the FCS experiments. As above, the NMR determined diffusion coefficients were significantly lower than those determined by FCS.

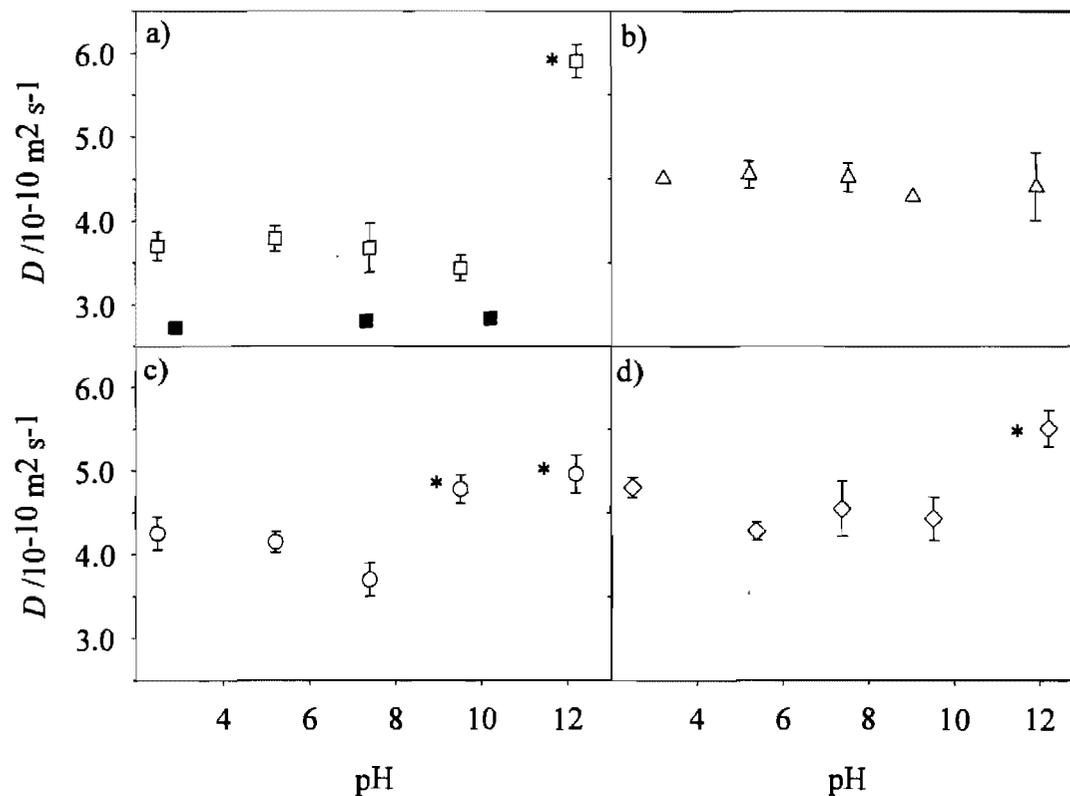


Figure 8: Influence of the pH on the diffusion coefficient.

(a) R6G, (b) RB, (c) R123 (d) R110 as determined by FCS (white symbols) and NMR (full symbols). FCS experiments were performed using 100 nM of each fluorophore, $I=1\text{mM}$ while 2 mM of fluorophore was used in the NMR experiment ($I=2\text{mM}$). The stars indicate significant differences between values (One-way Anova, $p < 0.001$).

Comparison of the 4 fluorophores

Due to the relative invariability of D with pH, I and concentration, diffusion coefficients that are valid for a broad range of experimental conditions (pH 2-9.5, $I < 10^{-1} \text{ M}$, fluorophore concentration $< 10 \mu\text{M}$) can be provided (Table 4). In both D_2O and H_2O , diffusion coefficients decreased in the order $\text{R110} < \text{R123} < \text{RB} < \text{R6G}$. Most of the effect can be attributed to differences in the molar masses: R110 (366 g/mol) and R123 (380

g/mol) have smaller molar masses than R6G and RB (480 g/mol). The observed differences are, for the most part, consistent with a scaling of D with $M_w^{1/3}$. The small difference between the values of D for R6G and RB can be explained by two potential effects: (i) hydrogen bonding should increase in the order RB < R6G with a resulting in an increase in diffusion time, corresponding to a decrease in the diffusion coefficient for R6G with respect to RB; (ii) increased photodecomposition might lead to shorter diffusion times (if photodecomposition occurs for times that are of similar or shorter times to diffusion across the confocal volume). The second explanation is unlikely here since, under the conditions of the experiments, R6G and RB had very similar triplet fractions. In fact, of the 4 fluorophores that were evaluated, only R110 had a systematically smaller triplet fraction for laser excitation at 488 or 514 nm. Indeed, the smaller value of measured triplet fraction for R110, suggests that the R110 might be the most appropriate calibration standard for FCS and that a value of $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (as compared to $3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ used previously) would be the most reasonable value of D .

Table 4: Values of diffusion coefficients proposed for the rhodamine fluorophores.

Values are given for moderate pH values (2-9.5), ionic strengths < 0.1 M and concentrations < 10 μM . Triplet fraction for all fluorophores were obtained under same conditions pH of 7.39, ionic strength of 1 mM and concentration of 50 nM and the closest as possible to their maximum absorption wavelength.

	Rhodamine 6G	Rhodamine B	Rhodamine 123	Rhodamine 110
$D \cdot 10^{10} [\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$	4.0 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.3
Triplet fraction*	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1

2.6 Conclusion

Translational diffusion coefficients have been determined for 4 rhodamine derivatives: R6G, RB, R123 and R110, of which two are commonly used as calibration standards for fluorescence correlation spectroscopy. A diffusion coefficient of $4.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was found for R6G and $4.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ was determined for R110. These values are higher than the values that are frequently employed to calibrate the FCS technique but in good agreement with several other analytical techniques (capillary/microchannel electrophoresis, E-Field method electrophoresis or voltammetry). The combination of PFG-NMR and FCS proved to be a powerful characterization tool to probe diffusion coefficients in aqueous solutions. Nonetheless, the isotopic effect ($\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$) had to be taken into consideration since it was measured to be quite strong ($D_{\text{D}_2\text{O}}/D_{\text{H}_2\text{O}} = 1.2$), in agreement with previous studies.

2.7 Appendix

Figure A1 : NMR spectrum of Rhodamine 6G.

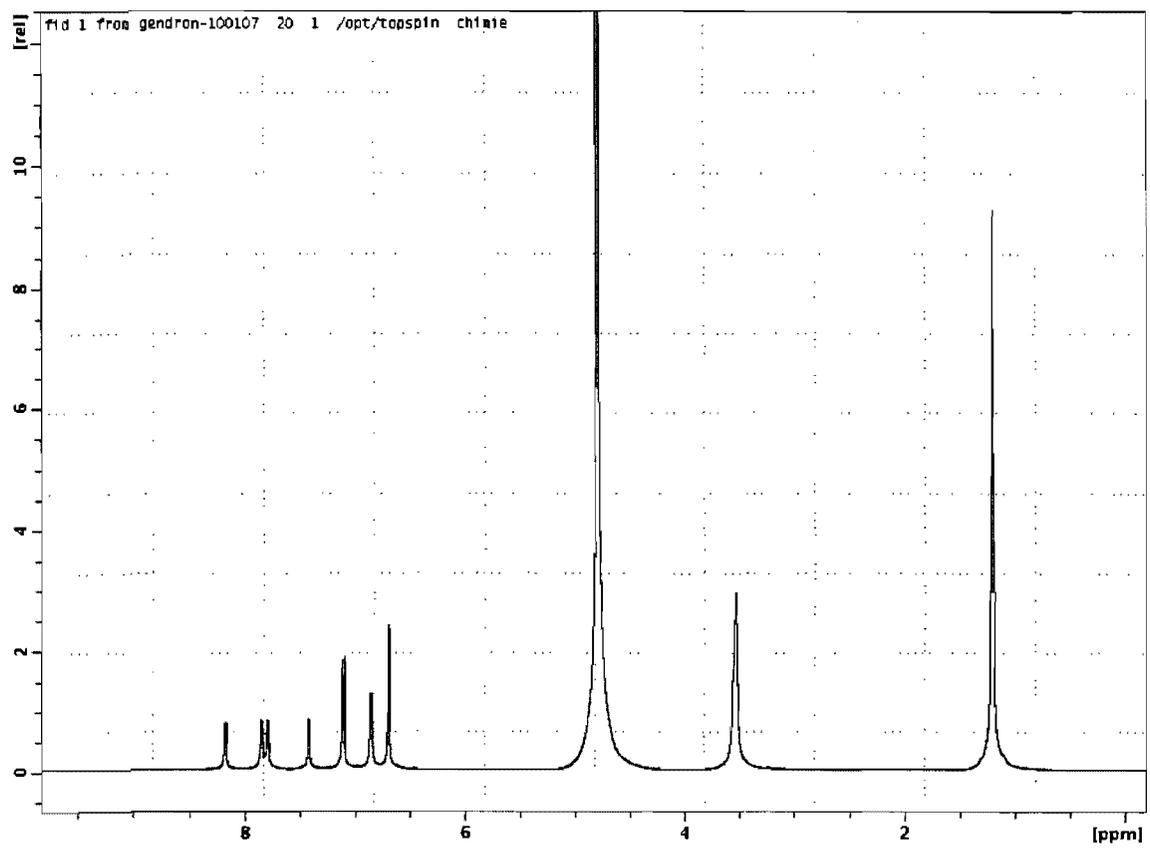


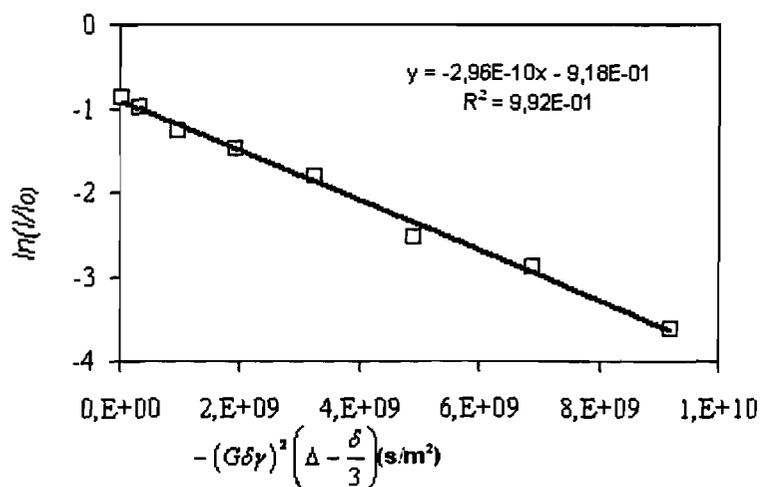
Figure A2: Diffusion coefficient fit for R6G at 0.08 M in D₂O where the slope of $\ln(I/I_0)$

vs. $-(G\delta\gamma)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right)$ gives the diffusion coefficient under these conditions.

γ (s⁻¹T⁻¹) δ (s) Δ (s) I_0
 2.68E+08 0.001 0.0667 0.0117731

$$\ln \frac{I}{I_0} = -D(G\delta\gamma)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right)$$

G (T/m)	axe x	/exp	ln(I/I ₀)
0,07	23269854	4,97E-03	0,86179426
0,259	318564301	4,37E-03	0,99105454
0,448	953133219	3,29E-03	1,27614652
0,637	1926976608	2,70E-03	1,47330679
0,826	3240094468	1,93E-03	1,80881581
1,015	4892486799	9,17E-04	2,55246535
1,204	6884153601	6,53E-04	2,89276168
1,393	9215094874	3,17E-04	3,61530216



Chapitre 3: Diffusion dans le gel d'agarose

3.1 Introduction

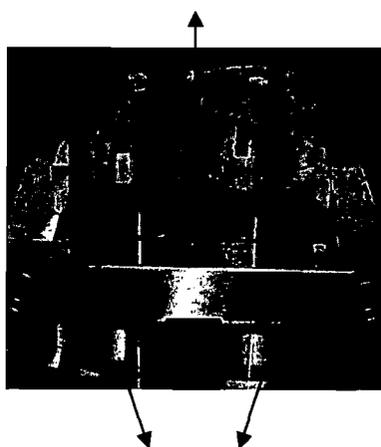
Que ce soit dans des systèmes environnementaux ou biologiques, la biodisponibilité des métaux traces, des nutriments ou des médicaments peut être régie ou limitée par des phénomènes de diffusion (Figure 1). Il est donc primordial de connaître autant les propriétés de réactivité chimique de ces mêmes métaux traces, nutriments et médicaments que de connaître leurs propriétés physicochimiques comme, par exemple, leurs coefficients de diffusion. Dans cette partie du travail, quatre méthodes (cellules de diffusion/SAAFG, cellules de diffusion/UV-visible, SCF et RFAP) ont été utilisées pour évaluer le coefficient de diffusion de différents analytes dans le gel d'agarose à faible point de gélification. Comme la diffusion du cadmium dans le gel ne peut être mesurée directement par les techniques de SCF et RFAP, différents fluorophores ont été employés comme modèles. Les rapports $D_{\text{eau}}/D_{\text{gel}}$ ont été ensuite comparés entre eux avec les différentes méthodes. L'objectif de ce chapitre est donc d'évaluer les coefficients de diffusion dans le gel et de valider la méthode de cellule de diffusion à l'aide des ratios $D_{\text{eau}}/D_{\text{gel}}$ obtenus avec les différentes techniques.

3.2 Matériel et méthodes

Pour réaliser l'expérience de diffusion il faut d'abord fabriquer le gel à une concentration de 2% (m/m). Pour ce faire, 4 g d'agarose (Bio-Rad®) à faible point de gélification, sont d'abord dissout dans 20 ml d'eau déionisée à 80°C que l'on place dans un tube Ependorff

de 50 ml. On place le tube dans un bain d'eau thermostaté à 90 °C jusqu'à ce que la solution soit transparente ce qui représente environ 15 minutes. Par la suite, on laisse reposer la solution hors du bain thermostaté afin que les bulles d'air disparaissent de la solution. Cette dernière étape est très importante car elle diminue le risque d'obtenir des fuites dans le gel lors des expériences de diffusion. On verse ensuite la solution sur une plaque de verre préalablement chauffé à 80°C. La plaque de verre est délimitée par 3 pièces de plastique de même dimension qui servent à donner une épaisseur uniforme au gel. Quand la solution est bien dispersée sur la première plaque de verre, on en applique une deuxième, aussi préalablement chauffée à 80°C, sur les morceaux de plastique. On place ensuite le tout dans une étuve chauffée à 50°C. On éteint ensuite l'étuve de façon à ce que le gel se solidifie le plus lentement possible, ce qui assure une distribution plus homogène de la taille des pores du gel d'agarose. Une fois le gel fabriqué, il est utilisé dans une cellule de diffusion (Figure 9). On peut donc à l'aide de celle-ci trouver les coefficients de diffusion des métaux traces à travers la matrice d'immobilisation.

Gel inséré entre les deux compartiments



Agitateurs

Figure 9 : Montage d'une cellule de diffusion.

Les gels sont découpés à l'aide d'un gabarit qui correspond à la fenêtre de la cellule de diffusion afin que le montage soit le plus étanche possible. Pour les expériences de SCF et RFAP le gel est versé directement dans des cuvettes conçues pour ce type d'analyse. Le gel, d'une épaisseur de 0.94 mm mesuré à l'aide d'un vernier, est inséré entre deux compartiments de polypropylène muni d'agitateur magnétique (Figure 9). Celui de gauche est rempli avec 100 ml d'une solution de 1 mM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ et 100 mM de NaNO_3 (Sigma-Aldrich) et celui de droite est rempli avec une solution de 100 mM de NaNO_3 afin d'avoir approximativement la même force ionique de chaque côté de la cellule de diffusion, car la force ionique provenant de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ est négligeable par rapport à celle provenant du nitrate de sodium. Le pH est préalablement ajusté pour chaque solution à 5.5. Une fois que les compartiments sont remplis, ils sont placés sur une plaque agitatrice à une vitesse de 400 rotations par minute et des échantillons de 50 μL sont prélevés en triplicata à chaque dix minute durant une période d'au moins 40 minutes. Ils sont ensuite dilués à 500 μl , acidifiés et analysés par absorption atomique au four graphite.

Pour l'analyse des échantillons un SAAFG de modèle AA240Z GTA120 (Varian) a été utilisé. La programmation de température de la fournaise est donnée dans le Tableau 5. Une lampe SpectrAA (Varian) pour le cadmium a été utilisée à une longueur d'onde 228.8 nm et avec un courant de 4 mA. Les fours graphites de partitions (Varian) ont été utilisés. À cause de la présence d'une grande force ionique (0.1 M), le signal provenant de l'analyte (Cd^{2+}) était initialement superposé à celui de la matrice (NaNO_3). L'ajout

d'un modificateur de matrice au palladium (Sigma-Aldrich), 2% acide nitrique, 2% acide citrique a été utilisé afin d'empêcher cette superposition des pics.

Tableau 5: Programmation de la température du SAAFG utilisé pour l'analyse du coefficient de diffusion du cadmium.

Température (°C)	Temps (sec)	Débit d'argon (l/minute)
85	5.0	0.3
95	40	0.3
120	10	0.3
450	5.0	0.3
450	10	0.3
450	2.0	0.3
2000	0.8	0
2000	2.0	0
2000	2.0	0.3

Pour la mesure des concentrations de la R6G et RB, un spectrophotomètre UV-vis de marque HACH DR 2800 a été utilisé. La procédure pour le montage des cellules de diffusion est la même que pour celui du cadmium. La concentration initiale de R6G dans un des compartiments était de 100 μM pour deux expériences et de 50 μM pour une troisième. Pour RB, la concentration était de 50 μM pour trois expériences identiques.

Pour la partie SCF et RFAP le gel a été versé directement dans les cuvettes et les solutions de 100 ηM de R6G et RB ont été ajoutées au gel 24 heures avant leurs analyses, celles-ci ainsi que la calibration du volume confocal ont été effectuées selon la section 2.4. La technique RFAP consiste à irradier à une certaine longueur d'onde une région d'intérêt contenant des fluorophores. Au début de l'analyse, qui se nomme la période de pré-photodécomposition, la fluorescence d'un analyte qui se trouve dans la région d'intérêt est mesurée. Ensuite, la puissance du laser est augmentée de manière à ce

que les fluorophores ne puissent plus émettre de lumière par un phénomène de décomposition. Cette période d'analyse s'appelle période de photodécomposition. Finalement, pour la période de post-photodécomposition, on irradie la région d'intérêt avec la même puissance que pour la période pré-photodécomposition. Au temps initial de cette période la fluorescence mesurée est beaucoup plus faible qu'à la période de pré-photodécomposition car la plupart des fluorophores à l'intérieur du volume d'intérêt ont été photodécomposés. L'intensité de la fluorescence augmente au fur et à mesure que les fluorophores qui se trouvent à l'extérieur de la région d'intérêt migrent dans le volume d'intérêt par diffusion. En mesurant le retour de fluorescence dans cette région d'intérêt à travers le temps on peut dériver le coefficient de diffusion de l'analyte. Pour les expériences RFAP, avant et après la période photodécomposition, le laser Ar à 496 nm et 514 nm sont utilisés simultanément avec une intensité de 5% tandis que pendant la période de photodécomposition ces mêmes lasers sont utilisés à une puissance de 100%.

3.3 Résultats

Mesure de D de Cd^{2+} par cellule de diffusion couplée à la SAAFG

Dans ces expériences, il existe un gradient de concentration de l'analyte d'intérêt (*e.g.* métaux traces) entre les compartiments de la cellule de diffusion séparés par un gel d'agarose, on mesure donc la diffusion mutuelle que l'on peut déterminer à l'aide de ces deux équations qui sont des variantes de la loi de Fick équation (1.1):

$$J = \frac{V}{A} \frac{dC}{dt}, \quad (3.1)$$

$$J = D \frac{dC}{dx} \cong D \frac{\Delta C}{l_e} \quad (3.2)$$

où J est le flux de diffusion d'un élément ($\text{mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) à travers le gel d'agarose à faible point de gélification, V est le volume (cm^3) d'un compartiment de la cellule de diffusion, A est la surface (cm^2) du gel ou le cadmium peut diffuser d'un côté à l'autre, l_e est l'épaisseur du gel (cm) dC/dt est le changement de concentration en fonction du temps dans un des compartiments de la cellule de diffusion et $\Delta C = C_d - C_g$ est la différence de concentration (mol cm^{-3}) entre les compartiments. Le flux de métal correspond à la pente de la droite $C=f(t)$ duquel on dérive ensuite le coefficient de diffusion, D .

Dans les premières expériences, les coefficients de diffusion obtenus étaient beaucoup trop élevés (Figure 10a) que ce qu'on aurait pu prédire théoriquement, ce qui laissait supposer qu'il y avait une fuite dans le montage ou une fissure dans le gel d'agarose. Pour vérifier l'intégrité du gel, une solution de bleu dextran a donc été ajoutée durant 24 heures dans un compartiment de la cellule de diffusion. Comme le rayon hydraté de cette macromolécule est supérieur au rayon des pores du gel d'agarose, il traverse donc d'un compartiment à l'autre uniquement s'il y a une fissure dans le gel. Dans le cas échéant, le compartiment de départ devrait demeurer de couleur bleue ce qui signifie que le gel peut être utilisé pour faire l'expérience avec le cadmium. Les expériences, une fois l'intégrité du gel vérifiée, ont été faites en triplicata (Figure 10b) et les résultats des coefficients de diffusion sont présentés dans le Tableau 6.

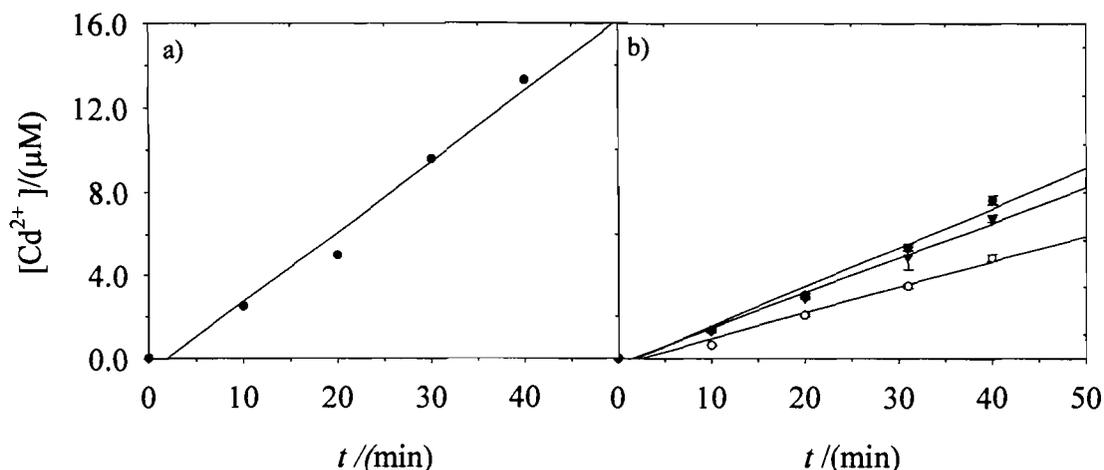


Figure 10 : Détermination du flux de cadmium dans un gel d'agarose à faible point de gélification d'une épaisseur de 0.94 mm.

a) sans vérification b) avec vérification de l'intégrité du gel en triplicata.

Tableau 6: Comparaison des coefficients de diffusion pour le cadmium dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification et dans l'eau obtenus par cellule de diffusion/SAAFG.

	D de Cd^{2+} dans le gel d'agarose $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
1 ^{er} essai	2.7
2 ^e essai	3.5
3 ^e essai	3.6
moyenne	3.3
Écart-type	0.4

Mesure de D de R6G et RB par cellule de diffusion couplée à l'UV-visible

Pour cette partie, les cellules de diffusion ont été utilisées, cependant la spectroscopie UV-visible (ou la fluorescence) est plus appropriée pour mesurer la concentration des échantillons de fluorophores. La courbe de calibration pour la Rhodamine 6G est présentée à la Figure 11. Comme pour l'expérience avec le cadmium, il faut vérifier l'intégrité des gels avec le bleu dextran avant (ou après) de les utiliser. Pour les deux

fluorophores les expériences ont été faites en triplicata (Figure 12) et les résultats sont présentés dans le Tableau 7.

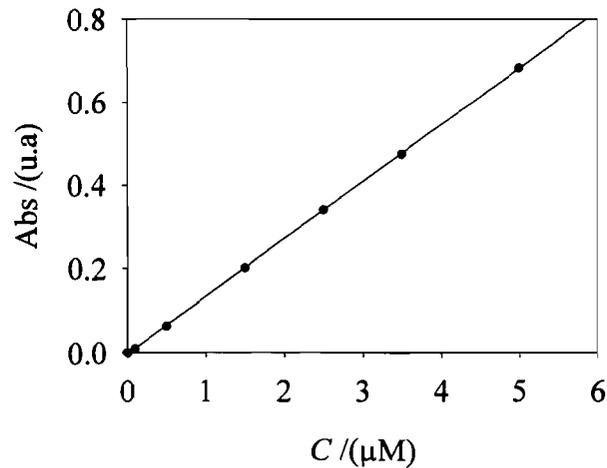


Figure 11 : Courbe de calibration en UV-visible pour la rhodamine 6G.
 $R^2 = 0.999$.

Pour la rhodamine 6G, il n'y a que deux courbes sur la Figure 12 a) car la troisième expérience n'a pas été effectuée avec la même concentration initiale. Néanmoins, les trois courbes ont donné des coefficients de diffusion semblables (Tableau 7).

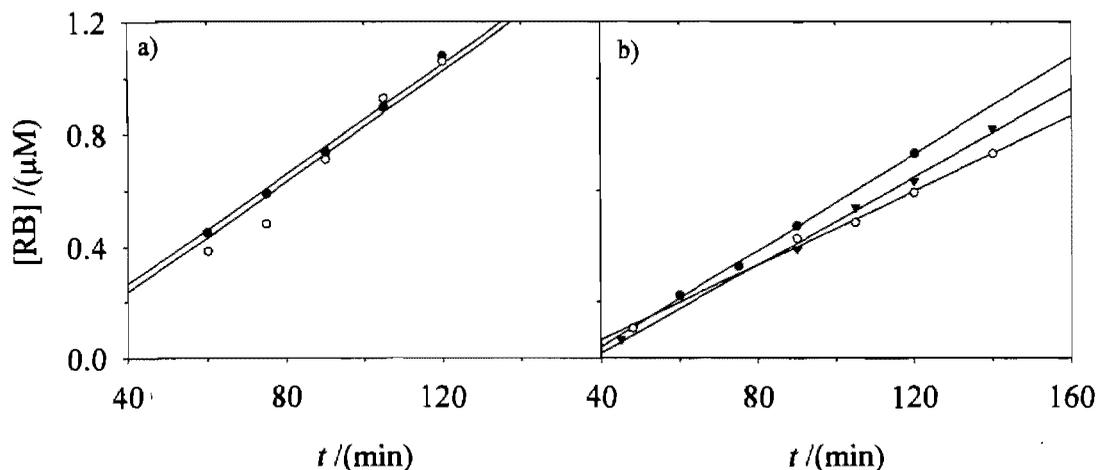


Figure 12 : Détermination du flux de dans un gel d'agarose à faible point de gélification d'une épaisseur de 0.94 mm.

a) R6G b) RB

Tableau 7: Comparaison des coefficients de diffusion pour RB et R6G dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification et obtenus par cellule de diffusion/UV-visible.

	D de R6G dans le gel d'agarose $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	D de RB dans le gel d'agarose $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
1 ^{er} essai	3.2	2.1
2 ^e essai	2.5	2.4
3 ^e essai	2.7	2.0
moyenne	2.8	2.2
Écart-type	0.4	0.2

Mesure de D de R6G et RB par SCF

Pour cette partie, on utilise une méthode spectroscopique microscopique et on mesure donc l'autodiffusion. Les résultats pour les deux mêmes fluorophores sont présentés dans le Tableau 8 ainsi que les courbes d'autocorrélation d'où l'on tire les coefficients de diffusion (R6G: Figure 13). En SCF, les coefficients de diffusion sont tirés au point d'inflexion des courbes d'autocorrélation. Sur la Figure 13, on voit que le point

d'inflexion pour la courbe d'autocorrélation de R6G dans le gel (cercle vide) est décalé vers des temps plus grands que celle pour R6G dans l'eau (cercle noir) ce qui indique que la diffusion de R6G est bel et bien plus lente dans le gel que dans l'eau. Le déplacement de la courbe vers des temps plus longs indique une diminution du coefficient de diffusion.

Tableau 8: Comparaison des coefficients de diffusion pour RB et R6G dans un hydrogel d'agarose à faible point de gélification obtenus par SCF.

	D de R6G dans le gel d'agarose $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	D de RB dans le gel d'agarose $/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
1 ^{er} essai	2.4	2.0
2 ^e essai	2.5	2.1
3 ^e essai	2.5	2.8
moyenne	2.5	2.3
Écart-type	0.1	0.4

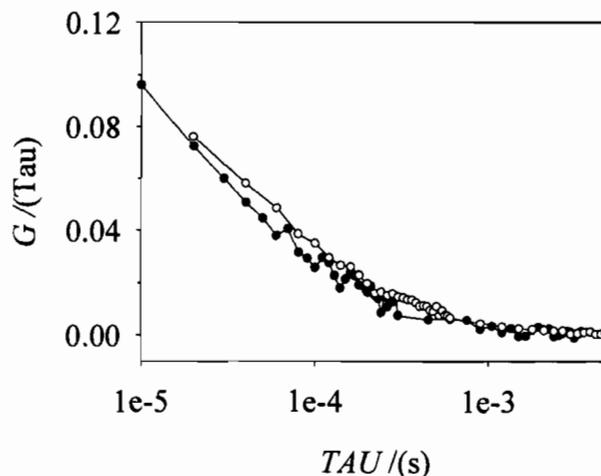


Figure 13 : Courbe d'autocorrélation pour R6G.

Dans l'eau (●) et dans le gel (○). Les points sont reliés simplement pour mieux les distinguer; il ne s'agit pas d'une opération mathématique.

La mesure de coefficient de diffusion dans un gel d'agarose pour R6G et RB par la technique RFAP fut impossible. La diffusion dans le gel est environ deux fois moins vite à l'intérieur du gel que dans l'eau, ce qui est encore trop rapide pour l'analyse par RFAP. La différence entre l'intensité relative de fluorescence avant la photodécomposition «Pre-Bleach» et celle après la photodécomposition « postbleach» n'est que de 0.04 unité (Figure 14) ce qui est trop petit pour obtenir des résultats quantitatifs. Normalement cette différence doit être d'environ 40 unités pour obtenir des résultats quantitatifs et reproductibles.

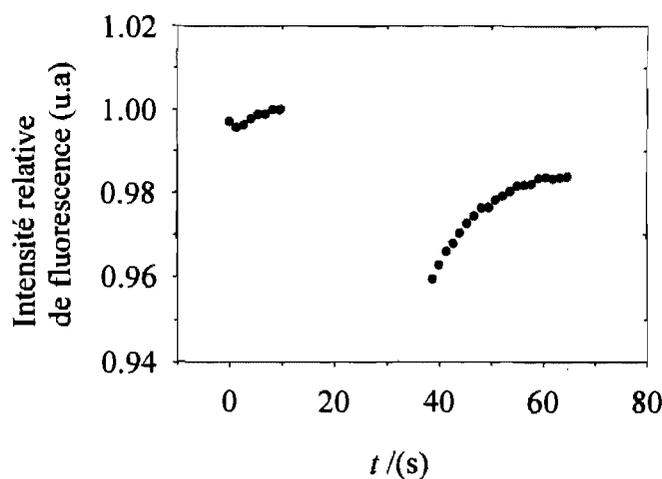


Figure 14: Courbe de recouvrement de fluorescence pour la Rhodamine 6g dans un gel d'agarose à faible point de gélification après la photodécomposition.

3.4 Discussion

Le coefficient de diffusion de Cd^{2+} ($3.3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) obtenu par cellules de diffusion/SAAFG dans le gel d'agarose à faible point de gélification est similaire à celui obtenu dans la littérature⁷⁶ ($3.46 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) pour un gel d'agarose a faible point de

gélification. Ce résultat a été obtenu par la méthode de cellules de diffusion couplée à la technique de voltammétrie cathodique à balayage à vague carré. Bien que la concentration (1.5%) et le type gel utilisé dans cet article soient différents, la technique de cellule de diffusion semble être appropriée pour mesurer les coefficients de diffusion d'analytes dans les gels d'agarose. L'autre technique (SCF) a été utilisée en parallèle pour confirmer le choix de la méthode des cellules de diffusion. Les métaux ne sont pas généralement fluorescents, alors il est donc difficile d'utiliser la spectroscopie par corrélation de fluorescence pour évaluer son coefficient de diffusion. Par contre, le rapport $D_{\text{eau}}/D_{\text{gel}}$ de fluorophores (R6G et RB) devrait nous renseigner sur les propriétés de diffusion dans le gel et permettre une estimation du ralentissement attendu pour des analytes tels le Cd^{2+} . De cette façon on est en mesure de comparer les deux techniques. Les coefficients de diffusion de (R6G et RB) ont été évalués par cellules de diffusion/UV-visible afin d'avoir une 2^e série de données pour comparer les deux méthodes. Les résultats pour chaque technique et analyte sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Comparaison de la technique des cellules de diffusion et SCF pour la détermination des coefficients de diffusion à l'intérieur du gel d'agarose à faible point de gélification.

	Cd^{2+} (cellule de diffusion)	R6G (SCF)	RB (SCF)	R6G (cellule de diffusion)	RB (cellule de diffusion)
$D_{\text{gel}}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	3.3±0.4	2.5±0.1	2.3±0.4	2.8±0.4	2.2±0.2
$D_{\text{eau}}/10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	6.9	4.0	4.2	-	-
$D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$	0.48±0.06	0.63±0.03	0.55±0.09	0.7±0.1	0.52±0.05

Dans ce tableau, on observe que les coefficients de diffusion pour chaque analyte à l'intérieur de l'hydrogel sont réduits environ d'un facteur 2 par rapport à celui dans l'eau, ce qui est normal car le réseau polymérique ralentit les analytes lors de sa migration. Dans ce cas, on suppose que la diffusion est due uniquement au gradient de concentration

et qu'il n'y a pas de complexation/décomplexation de l'analyte avec les charges négatives présentes sur le gel, car on suppose que celles-ci sont complètement écrantées par la force ionique de 100 mmol. Pour la rhodamine B, le rapport $D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$ déterminé par la cellule de diffusion et SCF se situe dans la fourchette d'incertitude de ce même rapport pour le cadmium. Par contre, pour la rhodamine 6G, le rapport $D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$ obtenu par SCF est un peu plus élevé que la celui pour le cadmium mais il est du même ordre de grandeur. Par contre, pour la valeur obtenue par cellule de diffusion, la valeur du rapport $D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$ ne se situe pas dans la fourchette d'incertitude de la valeur du rapport $D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$ pour le cadmium. Une fuite dans le système est peut-être la cause de cet écart car la valeur du 1^{er} essai (Tableau 7) semble trop élevée. Si on ne tient pas compte de cette valeur on obtient un rapport $D_{\text{gel}}/D_{\text{eau}}$ qui se rapproche de celui du cadmium.

Même s'il existe un écart considérable entre les valeurs obtenues R6G et Cd^{2+} on peut affirmer que la méthode des cellules de diffusion est appropriée pour évaluer les coefficients de diffusion dans un gel d'agarose avec suffisamment de précision pour déterminer si l'utilisation du gel d'agarose à faible point de gélification comme matrice d'immobilisation n'ajoute pas un processus limitant à la bioaccumulation du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii*, ce qui est l'étape clé de ce projet. Cette information est primordiale car si on utilise ce gel dans un biocapteur, on doit s'assurer que la concentration et la spéciation du cadmium à l'intérieur de celui-ci est toujours la même que celle à l'extérieure. Donc, en tout temps la réponse du biocapteur devrait être représentative de la concentration du milieu avoisinant dans lequel il est exposé.

En utilisant l'équation (1.3) on peut transformer le coefficient de diffusion pour le Cd^{2+} dans le gel en flux de diffusion. Les résultats sont présentés pour différentes épaisseurs dans la Figure 15. On suppose que le coefficient de diffusion ne devrait pas changer avec la concentration du Cd^{2+} , ni avec l'épaisseur du gel. À ce moment, on peut comparer le flux de cadmium à l'intérieur du gel à celui du flux d'internalisation à l'intérieur de l'algue (tiré de ¹⁷).

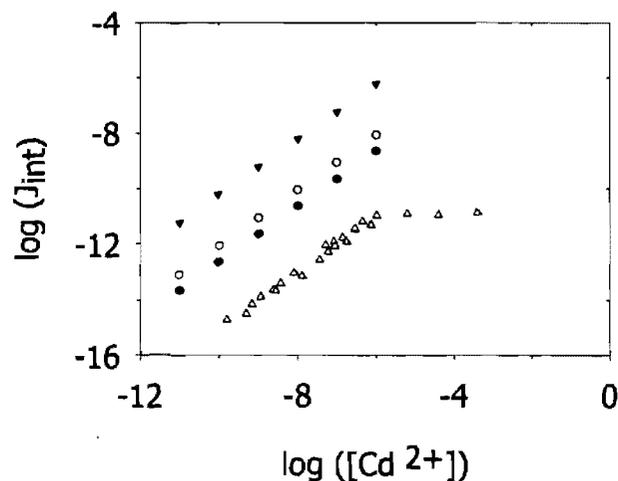


Figure 15: Détermination du flux limitant pour un biocapteur utilisant *Chlamydomonas* immobilisé dans un gel d'agarose à faible point de gélification. Cd^{2+} dans: ▼ eau, ○ un gel de 0.95mm, ● un gel de 0.25mm, △ pour *Chlamydomonas reinhardtii* avec un rayon de 5 μm .

On voit que si on fixe la concentration de Cd^{2+} , le flux d'internalisation pour l'algue est toujours plus petit que celui du flux de diffusion maximum dans le gel et ce, peu importe l'épaisseur du celui-ci. Donc, pour une concentration donnée, il y aura toujours plus de capacité pour le cadmium à pénétrer rapidement à l'intérieur du gel qu'à l'intérieur de l'algue, ce qui démontre que l'étape limitante est bel et bien l'internalisation. De plus, ce graphique suppose que le cadmium doit traverser toute l'épaisseur du gel avant d'atteindre l'algue alors qu'en réalité les algues ne sont pas toutes immobilisées à une

extrémité du gel mais à différentes épaisseurs. Donc, ce graphique sous-estime les flux de cadmium pour les différentes épaisseurs, ce qui nous assure d'une autre façon que ce flux n'est pas limitant.

4. Conclusion

Dans cette étude, une revue de littérature a été entreprise pour choisir une matrice d'immobilisation pour *Chlamydomonas reinhardtii*. Le choix de cette matrice est le gel d'agarose à faible point de gélification. Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser la diffusion d'analyte dans cette matrice et de les comparer entre elles. La méthode par cellule de diffusion couplée à la SAAFG a été utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion du cadmium à l'intérieur du gel. Les cellules de diffusion ont aussi été utilisées pour déterminer les coefficients de diffusion de fluorophores (R6G et RB) à l'intérieur du gel et finalement, la SCF a été utilisée pour déterminer les coefficients de diffusion de ces deux mêmes fluorophores dans le gel et dans l'eau et valider la méthode par cellules de diffusion. Pour les deux méthodes, l'incertitude pour la mesure des coefficients de diffusion aurait pu être diminuée en faisant les expériences cinq fois au lieu de trois. Cependant, il est difficile d'utiliser le même gel dans les expériences avec les cellules de diffusions et par SCF car ceux-ci sont très fragiles. Les expériences faites en triplicata sont faites avec différentes parties de gel et amènent une bonne part de variation des résultats. Les valeurs du coefficient de diffusion du cadmium dans le gel ont permis de vérifier si l'utilisation du gel d'agarose à faible point de gélification comme matrice d'immobilisation n'ajoutait pas un processus limitant à la bioaccumulation du cadmium par *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, le processus limitant demeure l'internalisation du métal par l'algue. Le développement d'un biocapteur pour mesurer les risques écotoxicologiques dus à la présence de métaux dans l'environnement peut être poursuivi avec l'utilisation d'un gel d'agarose à faible point de

gélification comme matrice d'immobilisation pour *Chlamydomonas reinhardtii*. De plus, d'autres expériences seront à réaliser pour la continuité du projet. Il faudrait refaire les mêmes expériences de diffusion du cadmium, mais en immobilisant l'algue à l'intérieur du gel d'agarose à faible point de gélification. Le coefficient de diffusion du cadmium ainsi trouvé devrait être le même que celui du cadmium dans le même gel mais sans les algues immobilisées. Ceci permettrait de valider le coefficient de diffusion de cadmium à l'intérieur du gel obtenu dans ce mémoire. Sinon, il faudrait évaluer ce qui provoque cette différence. Il faudrait aussi faire des expériences de viabilité des algues à l'intérieur du gel. Par ailleurs, l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* devra être génétiquement modifiée pour produire un signal lumineux proportionnel à la concentration de cadmium biodisponible au quelle elle est exposée. Plusieurs membres du groupe de recherche sont présentement en train de développer cette algue. Lorsque cette étape sera terminée il faudra donc couplé le gel d'agarose contenant *Chlamydomonas reinhardtii* avec une de la fibre optique à fin de récolter notre signal analytique. À ce moment, la fabrication du biocapteur sera complète et celui-ci pourra être testé sur le terrain afin d'évaluer sa fonctionnalité et son efficacité.

Durant l'étude de diffusion dans l'hydrogel, la méthode de spectroscopie par fluorescence (SCF) a été optimisée et validée par la technique (RMN-CGP). Pour les expériences de RMN, la variation des résultats avec le temps n'a pas été évalué, *i.e.* les expériences ont été fait plus d'une fois mais dans la même journée et avec la même calibration. Il aurait été intéressant de refaire ces expériences à différentes journées afin d'évaluer cette variation. Des nouveaux coefficients de diffusion pour quatre fluorophores couramment

utilisés (R6G, RB, R123 et R110) ont été proposés pour une plage de pH et de force ionique. On suggère donc au futur utilisateur de SCF d'utiliser ces nouvelles valeurs de coefficient de diffusion pour la calibration du volume confocal. Finalement, la technique RFAP n'a pu être utilisée pour la mesure du coefficient de diffusion dans le gel d'agarose pour R6G et RB à cause d'une diffusion trop rapide de ceux-ci dans le gel. Cette méthode n'est donc pas recommandée pour la caractérisation d'analytes qui ont des coefficients de diffusion plus grands que $1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

5. Bibliographie

- (1) Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.-G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R. *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 1453-1470.
- (2) Stumm, W.; Morgan, J. J. *Aquatic Chemistry. An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters. 2nd Ed*, 1981.
- (3) Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach*, 1988.
- (4) Jackson, G. A.; Morgan, J. J. *Limnology and Oceanography* **1978**, *23*, 268-282.
- (5) Wilikinson, K. J.; Buffle, J. In *Physicochemical kinetics and Transport at Biointerfaces*, 2004; Vol. 9, pp 445.
- (6) Campbell, P. G. C.; In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems.*; Sons, J. W., Ed.: Chichester, 1995; Vol. Vol. 3, pp 45-102.
- (7) Playle, R. C. *Science of the Total Environment* **1998**, *219*, 147-163.
- (8) Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, V. P.; Vigneault, B. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* **2002**, *133C*, 189-206.
- (9) Richards, J. G.; Playle, R. C. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* **1998**, *119C*, 185-197.
- (10) Wood, C. M.; Playle, R. C.; Hogstrand, C. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, 71-83.
- (11) Pinheiro, J. P.; van Leeuwen, H. P. *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, 894-900.
- (12) Suwansa-ard, S.; Kanatharana, P.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C.; Wongkittisuksa, B.; Thavarungkul, P. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 445-454.
- (13) Nunes, G. S.; Barcelo, D.; Grabaric, B. S.; Diaz-Cruz, J. M.; Ribeiro, M. L. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *399*, 37-49.
- (14) Tkac, J.; Sturdik, E.; Gemeiner, P. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **2000**, *125*, 1285-1289.
- (15) Schoemaker, M.; Feldbrogge, R.; Gruindig, B.; Spener, F. *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, *12*, 1089-1099.
- (16) Simon, D. F.; Descombes, P.; Zerges, W.; Wilkinson, K. J. (*In Press*) *Aquatic Toxicology* **2008**.
- (17) Kola, H.; Wilkinson, K. J. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, 3040-3047.
- (18) Oren-Shamir, M.; Avron, M.; Degani, H. *FEBS Letters* **1988**, *233*, 124-128.
- (19) Fatin-Rouge, N.; Milon, A.; Buffle, J.; Goulet, R. R.; Tessier, A. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 12126-12137.
- (20) Bental, M.; Pick, U.; Avron, M.; Degani, H. *Eur. J. Biochem* **1990**, *288*, 111 - 116
- (21) Nilsson; K. Birnbaum; S. Flygare; S. Linse; L. Schroder; U. Jeppsson; U. Larsson; P. Mosbach; K. Brodelius *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology* **1983**, *17*, 319-326.
- (22) Messerli, M.; A. Amaral-Zettler, L.; Zettler, E.; Jung, S.-K.; Smith, P. J. S.; Sogin, M. L. *The Journal of Experimental Biology* **2005**, *208*, 2569-2579.

- (23) Shankar, V.; Kotwal, S. M.; Rao, B. S. *Biotechnology Letters* **1985**, *7*, 615-618.
- (24) SivaRaman, H.; Seetarama Rao B. S.; Pundle, A. V.; SivaRaman, C. *Biotechnol. Letts.* **1982**, *4*, 354-359.
- (25) Dipali Bagal; Karve, M. S. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *555*, 316-322.
- (26) Zvitov, R.; Zohar-Perez, C.; Nussinovitch, A. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 3781-3784.
- (27) Mulchandani, A.; Kaneva, I.; Chen, W. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 5042-5046.
- (28) Tammeveski, K.; Kikas, T.; Tenno, T.; Niinisto, L. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1998**, *B47*, 21-29.
- (29) Edenborn, H. M.; Brickett, L. A. *Journal of Microbiological Methods* **2001**, *46*, 51-62.
- (30) Dessouki, A. M.; Atia, K. S. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 432-437.
- (31) Garbayo; E. Forja; A. Salguero; M. Cuaresma; Vega, J. M.; Vlchez, C. *Biotechnology Letters* **2005**, *27*, 265-267.
- (32) Ines Garbayo, R. L., Javier Vigara, Carlos Vilchez *Bioresource technology* **2002**, *81*, 207-215.
- (33) Chovelon, J.-M.; Ionescu, R. E.; Abu-Rabeah, K.; Cosnier, S.; Durrieu, C. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1041-1046.
- (34) He, P.; Wu, X.-h.; Xu, Z.-q.; Yang, Q.-y. *Yangzhou Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban* **2005**, *26*, 91-94.
- (35) Mahadevaswamy, M.; Mishra, I. M.; Prasad, B.; Mall, I. D. *Environmental Biotechnology* **2004**, 85-92.
- (36) Song, H.; He, Z. *Huanjing Wuran Zhili Jishu Yu Shebei* **2005**, *6*, 37-40.
- (37) Wang, L.; Liao, L.; *Weishengwuxue Zazhi* **2005**, *25*, 50-53.
- (38) Reid, A. A.; Vuilleumard, J. C.; Britten, M.; Y. Arcand; E. Farnworth; Champagne, C. P. *Journal of Microencapsulation* **2005**, *22*, 603-619.
- (39) Mahan, C.; Holcombe, J. A. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 1933-1939.
- (40) Corongiu, G.; Fornili, S. L.; Clementi, E. *International Journal of Quantum Chemistry, Quantum Biology Symposium* **1983**, *10*, 277-291.
- (41) Krichevsky, O.; Bonnet, G. *Reports on Progress in Physics* **2002**, *65*, 251-297.
- (42) Leng, X.; Starchev, K.; Buffle, J. *Biopolymers* **2001**, *59*, 290-299.
- (43) Meunier, F.; Wilkinson, K. J. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 857-864.
- (44) Leng, X.; Startchev, K.; Buffle, J. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *251*, 64-72.
- (45) Avena, M. J.; Wilkinson, K. J. *Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 5100-5105.
- (46) Fatin-Rouge, N.; Buffle, J. *In IUPAC Series on "Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems"*, Wilkinson, K. J.; Lead, J. R., Eds. *In press*. **2003**.
- (47) Rani, S. A.; Pitts, B.; Stewart, P. S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 728-732.
- (48) Stroh, M.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W.; Saltzman, W. M. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 581-588.

- (49) Roumi, M.; Kwong, E.; Deghenghi, R.; Locatelli, V.; Marleau, S.; Du Souich, P.; Beliveau, R.; Ong, H. *Peptides (New York, NY, United States)* **2001**, *22*, 1129-1138.
- (50) Dos Santos Silva, A. L.; Joekes, I. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **2005**, *40*, 19-24.
- (51) Stroh, M.; Saltzman, W. M. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, San Francisco, CA, United States, Nov. 16-21, 2003* **2003**, 103-111.
- (52) Mukhopadhyay, A.; Zhao, J.; Bae, S. C.; Granick, S. *Physical Review Letters* **2002**, *89*, 136103/136101-136103/136104.
- (53) Thompson, N. L. *Topics in Fluorescence Spectroscopy* **1991**, *1*, 337.
- (54) Dare-Doyen, S.; Doizi, D.; Guilbaud, P.; Djedaieni-Pilard, F.; Perly, B.; Millie, P. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 13803-13812.
- (55) Ilich, P.; Mishra, P. K.; Macura, S.; Burghardt, T. P. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1996**, *52A*, 1323-1330.
- (56) Sariri, R.; Zakerhamidi, M. S.; Baharpaima, K.; Ghanadzadeh, A. *Journal of Molecular Liquids* **2004**, *115*, 55-61.
- (57) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers FIELD Full Journal Title: Biopolymers* **1974**, *13*, 29-61.
- (58) Mueller, J. D.; Gratton, E. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 2711-2719.
- (59) Price, K. E.; Lucas, L. H.; Larive, C. K. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 1405-1407.
- (60) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Physical Review Letters* **1972**, *29*, 705.
- (61) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *Journal of Chemical Physics* **1965**, *42*, 288-292.
- (62) Price, W. S. *Concepts in Magnetic Resonance* **1997**, *9*, 299-336.
- (63) Antalek, B. *Concepts in Magnetic Resonance* **2002**, *14*, 225-258.
- (64) Hardy, E. H.; Zygar, A.; Zeidler, M. D.; Holz, M.; Sacher, F. D. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 3174-3181.
- (65) Svishev, I. M.; Kusalik, P. G. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 728-733.
- (66) Hernandez de la Pena, L.; Kusalik, P. G. *Journal of Chemical Physics* **2004**, *121*, 5992-6002.
- (67) Pluen, A.; Netti, P. A.; Jain, R. K.; Berk, D. A. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 542-552.
- (68) Rigler, R.; Grasselli, P.; Ehrenberg, M. *Physica Scripta* **1979**, *19*, 486-490.
- (69) Gell, C.; Brockwell, D. J.; Beddard, G. S.; Radford, S. E.; Kalverda, A. P.; Smith, D. A. *Single Molecules* **2001**, *2*, 177-181.
- (70) Jones, M. C.; Nassimbene, R. D.; Wolfe, J. D. *Engineering Science* **1996**, *51*, 1009.
- (71) Yu, J.-S.; Zhou, T.-Y. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *504*, 89-95.
- (72) Culbertson, C. T.; Jacobson, S. C.; Michael Ramsey, J. *Talanta* **2002**, *56*, 365-373.
- (73) Fister, J. C., III; Jacobson, S. C.; Davis, L. M.; Ramsey, J. M. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 431-437.
- (74) Hansen, R. L.; Zhu, X. R.; Harris, J. M. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 1281-1287.

- (75) Austin, J. M.; Harrison, I. R.; Quickenden, T. I. *Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90*, 1839-1843.
- (76) Tercier, M. L.; Buffle, J. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 3670-3678.