

# Photo-thérapie dynamique - entre modélisation et expérimentation - la rencontre des physiciens, chimistes, biologistes, oncologues, ingénieurs ou quand la modélisation diffusionnelle trouve ses limites...

Photo-Dynamic Therapy - between modeling and experimentation - the convergence(s) of physicists, chemists, biologists, oncologists, engineers or when diffusional modeling finds its limits...

Céline Frochot<sup>1</sup>, Jean-Claude André<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LRGP-UMR 7274 CNRS-UL

**RÉSUMÉ.** La thérapie photo-dynamique (PDT) consiste à utiliser la lumière pour exciter électroniquement une molécule photo-activable (le photosensibilisateur, PS) préalablement injectée dans le corps humain. Cette molécule excitée va réagir avec l'oxygène présent dans les milieux biologique pour conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont détruire préférentiellement les cellules cancéreuses. Les recherches actuelles se concentrent sur le développement de PS plus sélectifs qui ciblent des récepteurs sur-exprimés sur les membranes des cellules cancéreuses par exemple. Une autre façon de cibler est l'utilisation de Photo-Molecular beacons (PMB). Ils sont classiquement composés d'un accepteur A et d'un donneur D, reliés par un lien sensible à un stimulus endogène. A l'état initial, l'accepteur et le donneur sont maintenus suffisamment proches pour permettre un transfert d'énergie de  $D^*$  vers A (D excité électroniquement) en empêchant la production de ROS. Sur ce principe, il est possible de cantonner l'effet PDT au voisinage immédiat des cellules malignes quand la distance D-A augmente. En effet, il est possible d'utiliser un lien sensible à des enzymes telles que certaines métalloprotéinases MMP surexprimées dans les zones tumorales. L'action des MMP entraîne la destruction du lien, libérant ainsi D qui, sous illumination, pourra produire des ROS.  $D^*$  est généralement fluorescent et il est possible de suivre son évolution temporelle par des spectroscopies d'émission moléculaires. Pour tenter de comprendre le mécanisme de réaction de  $D^*$  relié par un bras espaceur à A (DBA), la situation inverse est étudiée. Plusieurs modèles de couplage transport-réactivité ont été développés conduisant à des expressions de la constante de vitesse de réaction de la forme  $k(t) = a + b.t^{1/2}$  où  $t$  est le temps et  $a$  et  $b$  deux paramètres expérimentaux. Cependant, quand on examine le comportement de couples  $D^*BA$  synthétisés, il n'est pas possible de trouver les paramètres  $a$  et  $b$  reliés à des bases physiques. Différentes hypothèses sont proposées pour tenter de comprendre les différences entre modélisation et expériences. Une analyse des points de vue des autres disciplines convoquées dans cette voie de traitements de cancers est également proposée.

**ABSTRACT.** Photo-dynamic therapy (PDT) consists in using light to electronically excite a photoactivatable molecule (the photosensitizer, PS) previously injected into the human body. This excited molecule will react with oxygen present in the biological environment to lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) which will preferentially destroy cancer cells. Current research is focused on the development of more selective PS that target receptors over-expressed on cancer cell membranes for example. Another way to target is the use of Photo-Molecular beacons (PMB). They are classically composed of an A acceptor and a D donor, linked by a linkage sensitive to an endogenous stimulus. In the initial state, the acceptor and the donor are kept sufficiently close to allow an energy transfer from  $D^*$  to A (electronically excited D) by preventing the production of ROS. Based on this principle, it is possible to restrict the PDT effect to the immediate vicinity of malignant cells when the distance D-A increases. Indeed, it is possible to use a link sensitive to enzymes such as certain metalloproteinases MMP overexpressed in tumor areas. The action of the MMPs leads to the destruction of the link, thus releasing D which, under illumination, can produce ROS.  $D^*$  is usually fluorescent and it is possible to follow its temporal evolution by molecular emission spectroscopy. To try to understand the reaction mechanism of  $D^*$  linked by a spacer arm to A (DBA), the reverse situation is studied. Several models of transport-reactivity coupling have been developed leading to expressions for the reaction rate constant of the form  $k(t)$

$= a + b.t^{1/2}$  where  $t$  is time and  $a$  and  $b$  are two experimental parameters. However, when we examine the behavior of synthesized D\*BA couples, it is not possible to find the parameters  $a$  and  $b$  with a physical basis. Different hypotheses are proposed to try to understand the differences between modeling and experiments. An analysis of the points of view of the other disciplines involved in this approach to cancer treatment is also proposed.

**MOTS-CLÉS.** Modélisation, Transport-réactivité, Photo-physique, Sonde moléculaire, Procédé, Oncologie.

**KEYWORDS.** Modeling, Transport-reactivity, Photo-physics, Molecular probe, Process, Oncology.

## Introduction

Avec des systèmes moléculaires ou sub-moléculaires, il a été possible de développer des modèles de couplage transport-réactivité qui ont été validés expérimentalement par différentes spectroscopies, comme par exemple la fluorescence en excitations pulsée ou continue. La modélisation effectuée, s'appuyant sur les travaux de von Schmолuchowski (2016) au début du siècle dernier et sur une approche déterministe continue conduit à des constantes de vitesse réactionnelles entre deux molécules de la forme :

$$k(t) = a + b.t^{1/2}$$

où  $t$  est le temps et  $a$ ,  $b$  sont deux constantes dépendant de la réactivité entre les espèces réactives et de la diffusion moléculaire mutuelle (somme des coefficients de diffusion des deux espèces). Cette activité importante de la présente équipe a surtout été menée avant 1995 et a fait l'objet de nombreux travaux, citons par exemple, Dong et André, 1994 ; Reis e Souza et al, 1994 ; Duhamel et al, 1992 ; 1992a ; André, Bouchy et Donner, 1992 – voir également Walliser et al, 2015 ; Satpati et al, 2008 ; Achillas et Verros, 2010 ; Lee et Lee, 2020. Pour observer ce phénomène, on choisit un couple donneur D – accepteur A tel que, quand D est excité électroniquement par de la lumière (D\*), il interagit avec A qui lui fait perdre son énergie électronique. Le mécanisme (simplifié) est alors :

D → D\* (absorption de lumière et formation d'un état excité électronique)

D\* → D (relaxation naturelle et retour vers l'état fondamental avec une durée de vie  $\tau_0$ )

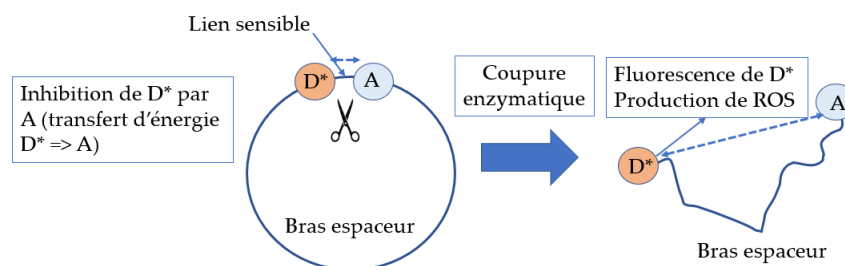
D\* + A → ... (perte de l'énergie électronique portée par D\* avec une constante de vitesse  $k(t)$  où  $t$  est le temps)

La décroissance instantanée de D\* est définie, pour une réaction où les A sont répartis dans l'espace par l'expression :

$$d(D^*)/dt = - [1/\tau_0 - k(t). (A)] \text{ où } (A) \text{ est la concentration de A}$$

La thérapie photo-dynamique (PDT) est aujourd'hui un traitement reconnu pour un certain nombre de maladies, dont plusieurs formes de cancer. Elle implique la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : oxygène singulet, ion-radical, etc. (cf. par exemple Thierry, 2003 ; Mohd-Gazzali et al, 2017 ; Rhew, Chae et Chang, 2022 ; Barberi-Heyob et al, 2007 ; El-Hussein et al, 2021), formation due au transfert d'énergie d'une molécule photo-activée (par exemple D\*) à l'oxygène environnant, présent dans les milieux biologiques. Afin de détruire exclusivement les cellules malades, il est intéressant de produire **localement** ces espèces en utilisant par exemple des photosensibilisateurs (PS) vectorisés qui vont aller s'accumuler spécifiquement dans les cellules malignes. A cet effet, deux propriétés de l'oxygène singulet sont importantes : leur durée de vie, et leur « diffusivité ». La durée de vie de l'oxygène singulet est de l'ordre de 10-100  $\mu$ s dans certains solvants organiques, de l'ordre de 2  $\mu$ s en milieu aqueux ; le rayon d'action est limité par la diffusion, soit une sphère de 10 nm à 20 nm environ centrée en son point de production (Wilson et Patterson, 2008). Une autre voie pourrait utiliser une molécule qui, au contact des cellules d'intérêt se transforme en un photosensibilisateur. Pour atteindre cet objectif, il est possible de synthétiser

une molécule sous forme de couronne avec deux chromophores proches, un donneur D et un accepteur A (aussi appelé inhibiteur, et quencher dans la littérature anglo-saxonne). Le principe est présenté dans la figure 1.



**Figure 1.** Des PMB permettant la formation d' $^1O_2$  spécifiquement dans la zone tumorale.

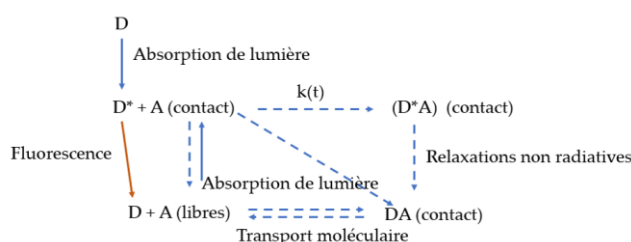
Quand cette molécule « couronne » est excitée par de la lumière, celle-ci est absorbée par D. Mais, à courte distance, l'énergie électronique portée par  $D^*$  passe sur A. Au voisinage des cellules d'intérêt, un processus enzymatique peut avoir lieu, « sectionnant » les liens entre D et A. En effet, il est possible d'utiliser un lien sensible à des enzymes telles que certaines métalloprotéinases MMP surexprimées dans les zones tumorales. L'action des MMP entraîne la destruction du lien, libérant ainsi D qui, sous illumination et après relaxation intramoléculaire conduisant à un éloignement de A relativement à D, pourra à nouveau produire des ROS. (Stallivieri, 2015).

$D^*$  isolé, a une durée de vie à l'état excité de quelques nanosecondes, l'ouverture va dépendre dans ce cadre temporel de la cohésion locale. Avant cette étape, pour tenter de modéliser cette cinétique d'ouverture avec un système réactif différent et plus complexe que ceux utilisés antérieurement (cf. supra), nous avons tenté de relier la cinétique réactionnelle entre A et D, reliés entre eux par un bras espaceur, en fonction de la viscosité (de la diffusion moléculaire). Ainsi, au lieu d'étudier la relaxation de la molécule couronne après coupure, on étudie le problème inverse. Les modèles cinétiques développés à partir de différentes hypothèses ont naturellement été confrontés à l'expérience. Il s'agit, au fond, de revenir aux vieilles propositions de Solow (1956) qui écrivait : « L'art d'une élaboration théorique réussie consiste à établir les hypothèses simplificatrices inévitables de manière à éviter une réactivité excessive des résultats définitifs ». Pour autant, ce travail de photo-physique avait pour finalité l'invention d'une voie de traitement originale s'appuyant sur la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu. Dans l'approche interdisciplinaire qui en aurait été la conséquence, il a paru intéressant d'examiner les probables points de vue des disciplines convoquées par le prolongement de ce travail initial.

## 1. Base de modélisation

### 1.1. Inhibitions statique et dynamique

La figure 2 illustre le phénomène de transfert d'énergie électronique où l'inhibiteur (ou quencher), noté A, peut créer un complexe dans l'état fondamental avec le fluorophore D, ou dans l'état excité (excimère ou exciplexe).



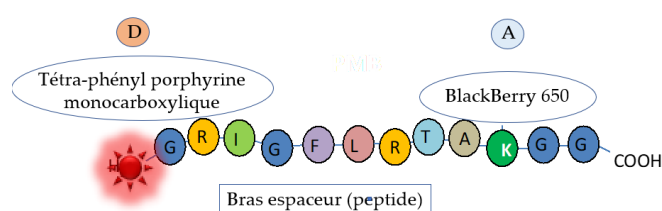
**Figure 2.** Interactions entre  $D^*$  et A ( $D^*$  pour D excité électroniquement)

S'il n'y a pas de complexe dans l'état fondamental, l'intensité de la fluorescence en excitation continue croît, alors que la durée de vie reste stable quand la concentration en inhibiteur augmente. La situation devient plus compliquée quand c'est le colorant D lui-même qui produit des complexes. Quand sa concentration augmente, l'intensité de fluorescence mesurée augmente (absorption facilitée), puis passe par un maximum et décroît (effet de peau possible lié à l'instrument, effet qui peut être corrigé). Comment observer alors facilement cette auto-inhibition (évolution des spectres d'absorption avec la concentration, étalonnage de l'instrument, etc.) ? En résolution temporelle, la durée de vie doit rester stationnaire, mais si les deux phénomènes « dynamique et statique » existent simultanément, des mesures et expérimentations complémentaires seront nécessaires. En excitation pulsée il convient, après une excitation de Dirac, de suivre la décroissance temporelle qui est de la forme :

$$d(D^*)/dt = (D^*_{t=0}) \cdot \text{Exp}[-t/\tau_0 - (A) \cdot f(a + bt^{1/2})dt]$$

où  $\tau_0$  est la durée de vie naturelle de  $D^*$  (indépendante de A). Cette expression, pour tenir compte de la forme temporelle de l'excitation par la lumière, avec une méthode de déconvolution ou de reconvolution itérative permet d'atteindre les valeurs de a et de b. Avec la technique de comptage de « photon unique » (single photon counting), on réalise deux types d'histogrammes : d'une part, de la puissance instantanée de l'excitation ( $E(t)$ ) ; d'autre part de l'émission lumineuse (fluorescence) de  $D^*$ . Ce dernier est la convolution de  $E(t)$  avec la décroissance de  $D^*$  qui aurait été obtenue si l'excitation avait été un Dirac. Pour atteindre cet objectif, des travaux déjà anciens, mais robustes peuvent avantageusement être utilisés (cf. André et al, 1979 ; 1982 ; O'Connor, Ware et André, 1979 – voir également Ababou et Bombarda, 2001 ; Isenberg, 1983).

Les « Molecular beacons », pour autant qu'ils soient fixés à l'aide de bras espaceurs suffisamment mobiles, vont pouvoir créer des complexes (concentration locale élevée) qui pourront être détruits par voie enzymatique (cf. par exemple Shekdar et al, 2021; Tyagi et Kramer, 1996 ; Tapp et al, 2000 ; Okamoto, 2011 ; Stallivieri et al, 2018). Un exemple de ce type de molécule linéaire D-bras espaceur-A (DBA) extrait de Stallivieri et al, (2018) est présenté figure 3. La tétraphénylporphyrine fonctionnalisée avec un groupement carboxylique (D) sert de donneur et le colorant alimentaire naturel « BlackBerry 650 » d'accepteur A (ou *quencher*). Le peptide GRIGFLRTAK sert de bras espaceur. C'est sur des systèmes moléculaires de ce type que les modélisations ont été effectuées.

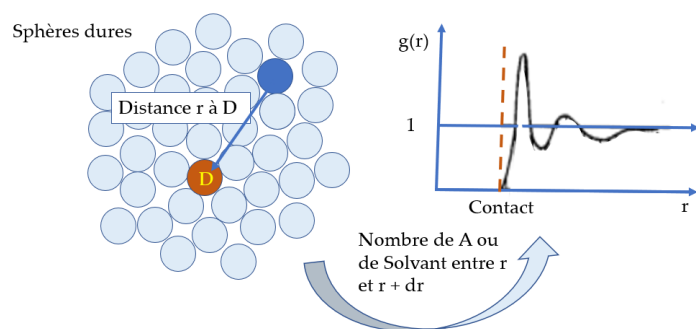


**Figure 3.** Exemple de PMB (Stallivieri 2018)

## 1.2. Fonction de distribution radiale

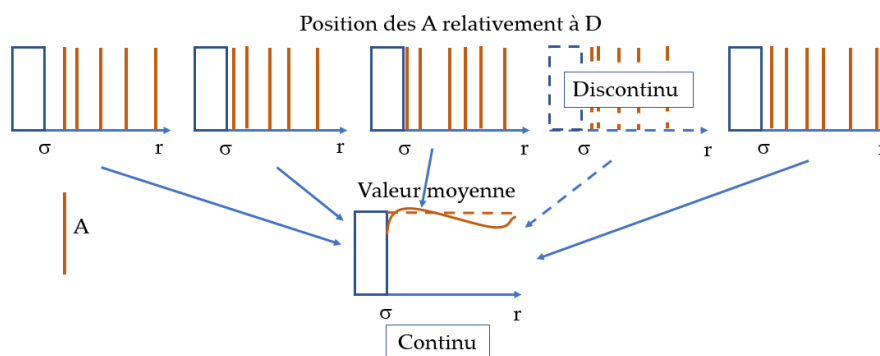
Pour définir numériquement la constante réactionnelle, on transforme une distribution aléatoire discrète de D et de A en une distribution continue en appliquant un principe de superposition de tous les couples D et A, en plaçant tous les D à l'origine et en supposant que les éléments D et A sont sphériques. On passe ainsi d'un système où les inhibiteurs sont placés dans un espace sphérique de manière aléatoire (mais en équilibre thermodynamique avec le milieu) à un système continu. Si un potentiel attractif ou répulsif existe entre D et A, la valeur moyenne n'est pas constante. Il en est de même au voisinage immédiat de D : la fonction de distribution de paires D-A appelée  $g(r)$  présente des maxima successifs correspondant aux couches de premiers, seconds voisins... La largeur des pics renseigne sur la dispersion des distances entre espèces voisines. En général, cette largeur

augmente avec la distance (IST, 2004 ; He, Rice et Xu, 2016 ; Kats et Muratov, 2018 ; Ornstein et Zernicke, 1914/2018). Au-delà des distances de troisièmes ou quatrièmes voisins, la structure en pics disparaît : il n'y a pas d'ordre à longue distance et  $g(r)$  devient égal à 1 comme dans les gaz (cf. figure 4).



**Figure 4.** Construction de la fonction de distribution radiale

L'idée qui consiste à superposer toutes les molécules excitées  $D^*$  (densité de présence) permet de travailler sur des équations plus facilement manipulables mathématiquement. Dans ces conditions, on choisit le centre de gravité des  $D^*$  comme origine de l'espace (considéré en première approximation comme sphérique, ce qui pourrait être critiquable compte-tenu des formes de D et de A) et on ne garde qu'une variable d'espace, la distance entre les centres de gravité de D/ $D^*$  et de A. Dans ce cas, la constante de vitesse apparente est définie par la consommation locale de l'inhibiteur A représenté sur la figure 5 ( $\sigma$  est la distance qui définit le « contact »).



**Figure 5.** Principe de superposition

### 1.3. Un exemple simple : Réaction instantanée contact et espace réactionnel infini et tridimensionnel

Dans la représentation de la figure 4,  $g(r)$  étant supposé égal à l'unité, au contact de D avec A, la densité de présence d'un A est nulle en dessous de  $r_0$  (correspondant à la somme des rayons de D et de A) dès que la réaction démarre. Si on désigne par  $\phi(r)$  le rapport  $D(t)/D(t=0)$ , alors l'on doit résoudre, à partir des modèles classiques des couplages transport-réactivité (cf. Philibert, 1985 par exemple) l'équation suivante :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D_{DA} \left( \frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} \right) \text{ avec } \phi_{r_0} = 0 \text{ et } \phi_{\infty} = 1$$

Il est possible d'adimensionnaliser cette équation en posant  $\rho = r/r_0$  et  $\tau = D_{DA}.t/\sigma^2$  où  $\sigma_0$  est  $r_0$

$$\frac{\partial \phi}{\partial \tau} = \left( \frac{\partial^2 \phi}{\partial \rho^2} + \frac{2}{\rho} \frac{\partial \phi}{\partial \rho} \right)$$



En passant dans l'espace de Laplace, cette équation a une solution analytique, ce qui conduit à la valeur du flux de matière à  $\rho = 1$  (contact) qui est :

$$\Phi = 1 + 1/(\pi\tau)^{1/2} \text{ où une constante de vitesse réactionnelle peut être définie :}$$

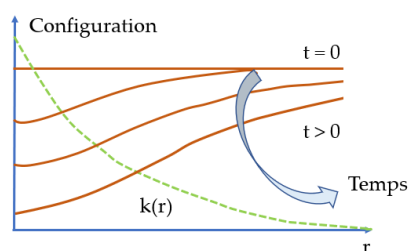
$$k(t) = 4.N_a.\pi.\sigma^2.D_{DA}. (1 + \sigma/(\pi.D_{DA}.t)^{1/2})$$

où  $N_a$  est le nombre d'Avogadro

Par exemple, pour que le terme  $\sigma/(\pi.D_{DA}.t)^{1/2}$  vaille sensiblement 1, avec, pour un solvant classique, un coefficient de diffusion de l'ordre de  $10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$  avec  $\sigma = 0.5 \text{ nm}$ , il faut que  $t$  soit proche de  $t = 0,1 \text{ nanoseconde}$ , ce qui impose des méthodes de spectroscopie d'émission de fluorescence (pour suivre  $D^*$ ) résolues dans le temps. Comme, avec cet instrument, l'excitation pulsée n'est pas un Dirac, le signal obtenu est une convolution de ce signal par le déclin temporel de  $D^*$ , ce qui impose d'utiliser des traitements du signal de type déconvolution ou de reconvolution itérative (Sherman et Craig, 2018). Cependant, comme il s'agit expérimentalement de définir des décroissances temporelles (représentation logarithmique avec bruit gaussien), l'importance du second terme de la dernière équation est déjà difficile à trouver dans le signal et, par suite à le quantifier (cf. par exemple Reis e Souza et al, 1994 ; Duhamel et al, 1992 ; 1992a ; André, Bouchy et Donner, 1992). Alors, pour des situations expérimentales et de modélisations plus complexes, il ne sera pratiquement pas possible d'aller « chercher » dans le signal autre chose que les termes  $a + b.t^{1/2}$  présentés dans l'introduction.

#### 1.4. Cas général de situations de molécules linéaires D-bras espaceur-A (DBA)

Les modes d'inhibition entre  $D^*$  et A peuvent être variables (cf. cas précédent) ce qui impose que  $D^*$  et A soient au contact (mécanisme de Dexter). Mais il peut s'agir de transferts d'énergie à longue distance de type Foerster où la constante chimique de réaction dépend de  $r$  (expressions de la forme  $(R_0/r)^6$ ).  $R_0$  est appelé distance de Foerster ; elle est typiquement comprise entre 2 nm et 8 nm quand ce type d'inhibition de D intervient (cf. par exemple Chemistry Libretexts, 2021 ; Valeur 2004 ; 2017). L'inhibition est alors produite à des distances faibles, proches du contact. La figure 6 illustre qualitativement les phénomènes en cause.



**Figure 6.** Visualisation approximative de l'évolution temporelle de la configuration quand D et A sont fixes, soit  $D_{DA} = 0$

$k(r)$  représente la constante de vitesse réactionnelle fonction d'un seul paramètre d'espace, la distance entre les deux entités. La constante apparente de vitesse exprimée en  $\text{mole}^{-1}.\text{l}.\text{s}^{-1}$  est calculée par intégration sur tout l'espace réactionnel, entre la distance de collision  $\sigma$  et l'infini de :

$$k(t) = 4. \pi. N_a. \int \Phi(r,t). k(r).r^2.dr$$

où  $N_a$  est le nombre d'Avogadro et  $k(r)$  la cinétique réactionnelle fonction de la distance entre D et A,  $\Phi(r,t)$  la configuration.

Au moment où l'on excite électroniquement D, les espèces A sont en équilibre thermique avec le milieu. Si ces entités (supposées sphériques) sont indiscernables avec le solvant (en dehors de leur

réactivité),  $\Phi(r,0)$  est défini, en l'absence de potentiel entre D et A, à partir des modèles de Ornstein et Zernicke (pour des sphères dures). Ces auteurs (IST, 2004 ; He, Rice et Xu, 2016 ; Kats et Muratov, 2018 ; Ornstein et Zernicke, 1914/2018) définissent une fonction dite de distribution radiale ou  $g(r)$  correspondant à ce qui est représenté sur la figure 4 où l'on calcule le nombre de particules entre  $r$  et  $r + dr$  que l'on divise par le volume correspondant (cf. un exemple de calcul de  $g(r)$  pour des sphères dures.  $g(r)$  tendra vers l'unité pour les distances très supérieures à  $\sigma$ , alors que nombre de réactions photochimiques de  $D^*$  et de A se produisent au contact ou au voisinage immédiat de  $D^*$  et de A. L'approximation « concentration moyenne » est certainement discutable dans ces conditions proches de la réalité.

Par ailleurs, le système se complexifie quand la taille moyenne des D et des A augmente relativement au solvant. Les aspects coopérativité du solvant sont souvent évoqués pour interpréter les phénomènes de transport à l'échelle moléculaire (cf. Wu et Nitsche, 1995 ; Satoh, 2015). Cependant, ils sortent du cadre du présent travail pour différentes raisons : absence de données scientifiques accessibles à tout photophysicien « ordinaire », méconnaissance des zones de réaction entre  $D^*$  et A, non sphéricité du solvant, etc. Cependant, cette connaissance peut être très importante pour des réactions intramoléculaires où le solvant doit probablement intervenir dans certaines situations liées au rapprochement des deux réactifs attachés par une chaîne (le bras espaceur).

**Remarque :** L'espace réactionnel est limité par une sphère de rayon correspondant à l'étirement maximum de DBA. Par ailleurs, entre la distance de collision entre  $D^*$  et A et cette distance, il y a toujours un  $D^*$  pour un A : si on épuise les couples  $D^*/A$  proches, on augmente la probabilité de trouver des couples de ce type aux plus grandes distances.

## 2. La « boîte à outils » du photo-physicien modélisateur

Les lignes qui suivent rappellent les éléments à prendre en considération dans le développement d'une étude photophysique d'étude d'interactions moléculaires sur la base de processus d'inhibition.

### 2.1. Base de modélisation

Différentes hypothèses réductionnistes vont être traitées pour examiner leurs conséquences cinétiques sur le système complexe étudié.

#### 2.1.1. Réactions limitées par la diffusion moléculaire

De nombreuses réactions entre une molécule excitée électroniquement et un inhibiteur (supposés sphériques) sont si rapides que c'est le transport physique, c'est-à-dire la diffusion à l'échelle moléculaire (diffusion mutuelle : somme des deux coefficients de diffusion de chaque entité) qui contrôle le processus. La vitesse apparente  $k(t)$  est une fonction du temps  $t$  exprimée dans ce cas limite et pour un espace infini par :

$$k(t) = 4.N_a.\pi.\sigma^2.D. (1 + \sigma/(\pi.D.t)^{1/2})$$

De nombreux travaux ont été publiés depuis plus de 60 ans sur ce sujet pour des réactions intermoléculaires avec des effets de solvant liés essentiellement à la viscosité du milieu (le solvant dans ces modèles est considéré comme un continuum ou, plus rarement comme constitué de sphères dures). Si l'espace n'est plus sphérique et infini, on retrouve pour des membranes (2D) des formes voisines pour  $k(t)$ . Il en est de même pour des réactions partiellement limitées par la diffusion (constante de vitesse chimique proche de  $k(t)$ ) ou des réactions entre espèces chargées. On est alors amené à résoudre, dans le cas simplissime où il n'y a pas de potentiel entre  $D/D^*$  et A, le système sphérique d'une réaction purement limitée par la diffusion, défini par :

$$\partial\phi/\partial t = D_{DA}.(\partial^2\phi/\partial r^2 + 2. \partial\phi/\partial r/r)$$

où  $\phi$  est la fonction de distribution radiale des accepteurs A relativement au donneur excité électroniquement, placés à la distance  $r$  (la concentration moyenne locale relativement à la concentration moyenne),  $D_{DA}$  est le coefficient de diffusion mutuelle entre ces deux entités (supposé ici indépendant de  $r$ ), avec comme conditions aux limites :

$$\phi(\sigma) = 0 \text{ (à } \sigma_0)$$

En présence d'un potentiel qui peut être différent avant et après excitation électronique, il convient de résoudre l'équation complexe suivante :

$$\partial\phi/\partial t = D_{DA}(\partial^2\phi/\partial r^2 + 2 \cdot \partial\phi/\partial r/r) - \text{div}(1/k_B T \cdot \text{grad}(\psi) \cdot \phi)$$

où  $\psi$  est le potentiel reliant  $D/D^*$  et A et  $k_B$  la constante de Boltzman (cf. Zhou, 1993).

### 2.1.2. Présence d'un potentiel entre D et A

Dans ce qui précède, l'hypothèse diffusionnelle ne tient pas compte du potentiel attractif ou répulsif entre D et A, ni entre  $D^*$  et A. Comme il s'agit de réactions par contact (ou presque) entre deux entités, le changement de la répartition spatiale des A relativement à  $D/D^*$  doit se traduire par des évolutions temporelles de la densité de présence des A autour des  $D^*$  et à des expressions  $k(t)$  plus complexes que celles présentées ci-dessus (cf. supra). Par absence d'information scientifique sur  $\psi(r)$ , il ne peut être question ici de tenir compte de potentiels précis liés aux liaisons moléculaires pour définir un potentiel global d'interaction entre  $D/D^*$  et A, tout en tenant compte par ailleurs des interactions avec le solvant... Ceci relève d'une autre aventure (qui est encore à écrire) que celle présentée dans ce travail...

### 2.1.3. Paramètre d'ordre du solvant

Si le solvant ne peut être considéré comme un continuum parce qu'il est constitué par exemple de chaînes longues relativement à la taille de D et/ou de A, l'existence de ces chaînes peut se traduire par une orientation non aléatoire des molécules (ou macromolécules) de solvant les unes par rapport aux autres (ce qui est traduit par la notion de paramètre d'ordre  $S$ , celui-ci valant 0 pour une répartition aléatoire et 1 pour un système organisé), (cf. Ayee, Bunker et De Groot, 2020 ; Stanley, 1971 ; Krotov et al, 2014; Rouwhorst et al, 2020).

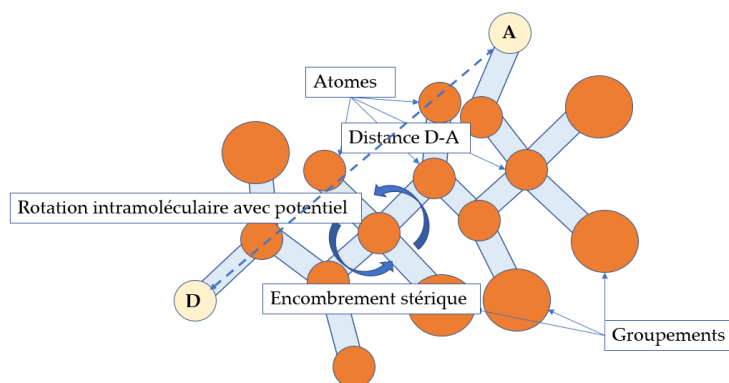
### 2.1.4. Paramètre d'ordre de D et/ou de A

Dans ce qui précède, on a fait l'hypothèse, soit que toute la surface de  $D^*$  est réactive vis-à-vis de A, soit que la vitesse de rotation moléculaire mutuelle des réactifs est grande vis-à-vis des processus de transport diffusionnels. Si D et/ou A sont des groupements rigides, il est possible de complexifier les modèles pour tenir compte de l'anisotropie réactionnelle ; s'ils sont non rigides, à la connaissance des auteurs, des modèles *ab-initio* peuvent être proposés, mais avec une complexité telle qu'il ne serait pratiquement pas possible de relier modélisation et expérience. En particulier, dans le cas d'inhibition par transfert d'énergie de type Foerster, les orientations relatives des D et A sont importantes (Valeur, 2004). Dans ces conditions, il faudrait prendre en considération, à la fois, le transport diffusionnel et la rotation brownienne des deux espèces...

### 2.1.5. Espace accessible à la réaction

Si maintenant l'espace réactionnel est borné comme cela se passe pour des réactions intramoléculaires, et en faisant l'hypothèse d'un transport libre à l'intérieur de cet espace,  $k_a(t)$  garde sensiblement la même allure avec un terme instationnaire en  $(t)^{1/2}$ . Cependant, dans le cas où D et A sont reliés entre eux comme dans le cas des molecular beacons, la flexibilité des chaînes ou bras espaceurs qui relient le donneur à l'accepteur est liée à des rotations autour des liaisons limitant l'espace accessible (avec des impossibilités de contact entre D et A), rotations non libres avec des énergies d'activation pour les autoriser (cf. figure 7).





**Figure 7.** Illustration des effets de la rotation intramoléculaire sur les interactions entre D et A

### 2.1.6. Interactions $D^*$ et A

Sont évoqués dans ce paragraphe différents modes d'interactions entre  $D^*$  et A. Les mécanismes réactionnels sont connus par l'étude des interactions libres entre  $D^*$  et A (cf. par exemple : Valeur, 2004 ; Delaire et al, 2016 ; Ramamurthy, 2019).

#### Excimères et exciplexes

Deux entités ( $D^*$  et D pour un excimère,  $D^*$  et A pour un exciplexe) tendent à former un complexe qui n'est stable que dans l'état excité électronique. Si l'écart énergétique entre le monomère et le complexe est grand, on se situe dans le cas d'une réaction intermoléculaire classique. Cependant, si cet écart est de l'ordre de quelques  $k_B.T$  (T, température absolue), l'excimère (ou l'exciplexe) peut, avant de retomber dans l'état fondamental, régénérer le monomère de départ. Non seulement, la cinétique de ce type de réaction devient complexe, mais également quand il y a dissociation, la fonction de distribution radiale de  $D^*$  (ou A) autour de  $D^*$  (comme celle de D) n'est pas uniforme, conduisant à un possible effet cage sensible aux phénomènes de transport à l'échelle moléculaire.

#### pK d'états excités

On se retrouve dans des situations où c'est une molécule neutre D qui est excitée, mais qui se trouve ionisée dans l'état excité (cas exemplaire du  $\beta$ -naphthol). Le pH, la force ionique et la constante diélectrique du milieu peuvent jouer un rôle important sur ces transformations moléculaires avec des conséquences cinétiques qu'il faut maîtriser.

#### Transferts radiatifs

Il peut y avoir recouvrement entre le spectre d'absorption de D et celui de sa fluorescence. Une partie de la lumière réémise peut être réabsorbée, puis à nouveau être l'objet du processus de fluorescence. Pour des molécules isolées, non réactives avec des substrats, ce phénomène ne se traduit pas par une modification de la durée de vie  $\tau_0$ . En revanche, si des réactions avec des cinétiques, fonction du temps, peuvent exister (du type diffusionnel en translation ou même en rotation), la « remise à zéro » liée au transfert radiatif peut conduire expérimentalement à des effets exaltés (qu'il faudrait maîtriser).

#### Influence de la température

La température affecte la durée de vie des états excités électroniques. Une situation de fluorescence retardée dite de type E (pour éosine) peut ainsi exister. La proximité énergétique entre le singulet et le triplet de cette molécule fait que des molécules à l'état triplet peuvent repeupler le singulet (avec une énergie d'activation associée). Il existe alors deux durées de vie, l'une courte (singulet), l'autre plus longue (fluorescence via le triplet). En présence de réaction, ces deux composantes sont affectées différemment par la température.

## Anisotropie de fluorescence

En lumière polarisée, l'absorption de lumière peut dépendre de l'orientation du chromophore. Il peut en être de même de l'émission de fluorescence pour autant que le chromophore ne puisse pas tourner. Si l'on n'y prête garde d'un point de vue expérimental, on va mesurer la décroissance recherchée associée à la dépolérisation temporelle du chromophore. Le suivi temporel d'une anisotropie de fluorescence est expérimentalement possible quand il s'agit d'une molécule libre, mais la réalisation d'un modèle cinétique adapté à ce couplage translationnel-rotationnel est possible, mais plus que délicate à exploiter expérimentalement.

## Lumière diffusée

Celle-ci peut avoir différentes origines et se traduire par des émissions orientées (même longueur d'onde pour la diffusion Rayleigh, voire Tyndall), Raman (réémission liée au solvant à des longueurs d'onde plus élevées que celle d'excitation électronique). Il s'agit, pour une étude photo-physique de phénomènes parasites dont il faut tenir compte et qu'il convient d'éliminer au maximum.

## Transferts d'énergie électronique

En dehors des aspects radiatifs dont il a déjà été fait mention, deux types de transferts sont classiquement possibles : par « collision » dite de Dexter, par résonance dite de Foerster. Pour ce qui concerne, le transfert par échange (Dexter), on se situe dans des conditions cinétiques classiques avec souvent des constantes de vitesse apparentes élevées fonction du temps (diffusion). Pour ce qui concerne les transferts par résonance, la situation est plus complexe. Il y a déjà des conditions d'orientation des deux espèces en interaction et des effets de leur distance moyenne qui interviennent dans la cinétique de transfert. La constante de vitesse de réaction entre donneur et accepteur est exprimée, dans les cas simples, par la relation suivante où  $\tau_0$  est la durée de vie du donneur  $D^*$  (en l'absence de l'accepteur) :

$$K(r) = (1/\tau_0) (R_0/r)^6$$

De manière évidente dans un milieu fluide, il y aura possibilité de repeuplement par diffusion brownienne des distributions à courtes distances, ce qui ne peut être le cas de milieux rigides. Dans un espace de symétrie sphérique, il faut résoudre (en faisant l'hypothèse que la diffusion rotationnelle est si rapide qu'on peut négliger les effets d'orientation des dipôles pendant le transfert d'énergie) :

$$\partial\phi/\partial t = D_{DA}(\partial^2\phi/\partial r^2 + 2. \partial\phi/\partial r/r) - KT. \phi$$

Où  $\phi$  est la fonction de distribution radiale des accepteurs relativement au donneur excité électroniquement, placés à la distance  $r$ ,  $D_{DA}$  est le coefficient de diffusion mutuelle entre ces deux entités. De manière évidente, l'espace accessible à la réaction et tout ce qui a déjà été exprimé sur les effets d'environnement (potentiels, orientation, etc.) jouent un rôle sur la définition de  $\phi$  et donc de la constante de vitesse moyenne définie par :

$$\langle k(t) \rangle = \int 4.\pi. r^2. KT. \phi. Dr$$

## 2.2. Questions posées au photo-physicien modélisateur

Les différents éléments ci-dessus, abordés ici de manière réductrice posent un certain nombre de questions, listées ci-après :

- Nature du mécanisme mis en cause ;
- Unicité de ce mécanisme ;
- Qualité du modèle cinétique interprétatif (sa robustesse ?) ;

- Possibilité de croiser différentes expériences pour valider le modèle cinétique retenu ;
- Trouver des conditions pour éliminer des situations polluantes (polarisation de fluorescence, température non fixe, présence d'impuretés comme l'oxygène dissous, etc.) ;
- Faire attention à ne faire varier qu'un paramètre à la fois, mais ce n'est pas toujours possible (par exemple la force ionique a un effet sur la constante diélectrique, la présence de sels peut modifier la viscosité, etc.) ;
- Ne pas croire que des mesures en milieu dilué peuvent être facilement extrapolables à des milieux spatialement bornés (par exemple nanoparticules) ;
- Etc.

On reviendra plus loin sur ces considérations qui sont un des piliers de la confiance que l'on peut (doit) avoir sur des résultats et leur interprétation pour expliquer des phénomènes photo-physiques.

### Remarque d'expérimentaliste

Comme il s'agit en résolution temporelle, utilisant la technique de photons uniques, de signaux qui ressemblent à des déclin exponentiels, on a coutume de représenter le signal sous forme semi-logarithmique, alors que l'essentiel de l'information se trouve aux temps courts (cf. remarques précédentes). Or, c'est également aux temps courts que l'on peut observer des décalages temporels (excitation à  $\lambda_e$  différente de  $\lambda_f$  ; polarisation de fluorescence). Ce constat signifie qu'en dehors de déclin mono-exponentiels pour lesquels n'importe quelle technique sérieuse conduit à des durées de vie valides (dont la modulation de phase), il convient de bien calibrer son instrument : un bon traitement du signal passe par un appareil maîtrisé (et non de se contenter d'une boîte noire avec un traitement du signal intégré à l'instrument !).

Ceci étant, le photo-physicien doit éviter des situations où le signal est, dès le départ, trop complexe pour permettre un traitement robuste. C'est un des moyens permettant aux autres disciplines de s'appuyer sur des piliers valides pour aller jusqu'à l'application. Ce constat signifie que le choix des couples A et D doit tenir compte à la fois de la photo-physique et de la cible applicative.

### 3. Simulation de réactions intramoléculaires

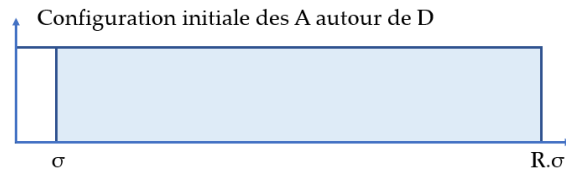
Dans ce contexte de compromis, on considère un système réactif de type DBA où D et A sont susceptibles d'être l'objet d'un transfert d'énergie dit à longue distance (Foerster) ; ils sont reliés entre eux par une chaîne hydrocarbonée longue (quelques dizaines de liaisons carbone-carbone ; cf. figure 3) pour qu'on puisse faire l'hypothèse qu'une rotation « libre » est permise autour des liaisons (du fait d'un grand nombre de degrés de liberté autorisé par le nombre de liaisons). En fait, c'est une hypothèse dont la robustesse devra être testée... Deuxième hypothèse, l'inexistence d'un potentiel entre D et A et entre D\* et A, ces deux entités étant supposées sphériques et à rotation libre et rapide pour n'avoir pas à tenir compte de transferts d'énergie liés aux dipôles respectifs de D\* et de A... Le solvant, comme cela est généralement admis est supposé continu (ce qui ne pourra pas être aussi facilement accepté si le milieu est biologique avec un paramètre d'ordre différent de zéro). On fait l'hypothèse que le transport par diffusion s'exprime, dans un premier temps, par un coefficient de diffusion  $\mathcal{D}_{DA}$  stable dans tout l'espace accessible à la réaction...

Sur cette base, plusieurs modèles cinétiques peuvent être proposés. Ils seront exploités pour réaliser des convolutions de signaux propres (exempts de problèmes de polarisation de fluorescence, de lumière parasites, etc.) pour examiner si l'on peut retrouver les paramètres d'influence choisis dans les déconvolutions ou re-convolutions, ou si le combat est vain...

### 3.1. Modélisation cinétique

#### 3.1.1. Base des calculs numériques

La figure 8 correspond à la configuration des A relativement à D (ou à D\*) la plus simple : probabilité égale à 0 entre 0 et  $\sigma$  (distance de collision), puis à 1 entre  $\sigma$  et  $R.\sigma$  (distance maximale, correspondant à l'étirement maximal des chaînes).



**Figure 8.** Configuration des A autour de D au moment de l'excitation électronique dans un espace infini

La constante de vitesse de transfert à longue distance a été définie par :  $K_0 = (R_0/r)^6/\tau_0$ . L'équation (simplifiée) de transport dans un espace de symétrie sphérique s'exprime alors par :

$$\partial\phi/\partial\tau = \partial^2\phi/\partial\rho^2 + 2/\rho.\partial\phi/\partial\rho - K_0.\phi/\rho^6$$

Avec  $\phi = \langle \text{concentration locale des A} \rangle / \langle \text{concentration moyenne des A} \rangle$  ; à  $t = 0$ ,  $\phi = 1$  sur l'intervalle  $[\sigma, R.\sigma]$ ,  $\rho = r/\sigma$ ,  $\tau = D_{DA}.t/\sigma^2$  où  $D_{DA}$  est le coefficient de diffusion mutuel des D et des A (en faisant l'hypothèse discutable que  $D_{DA}$  soit indépendant de l'espace et du temps lié à la réaction). Ces transformations permettent d'adimensionnaliser le couplage transport réactivité. Alors en dehors de R, le paramétrage du système se définit à partir de K :

$$K = (R_0/\sigma)^6.\sigma^2/(\tau_0.D_{DA}).$$

Deux conditions limites sont nécessaires pour définir complètement le système, la première exprime le fait que, quel que soit le temps t (ou  $\tau$ ), le nombre de A autour de D\* reste stable, la seconde que la tangente pour le contact entre D et A ( $\phi = 1$ ) est nulle :  $(\partial\phi/\partial\rho)_1 = 0$ . Il ne peut en effet y avoir de flux au contact entre D\* et A. Même en passant dans l'espace de Laplace, ce système d'équations n'a pas de solution analytique simple. Force est donc de calculer la cinétique à partir de la résolution numérique de ce système d'équations réduites, puisque, connaissant R, le seul paramètre à introduire dans le modèle est K.

Ce qui est recherché dans ce système d'équations complexes, c'est la constante de vitesse apparente ; elle est exprimée par l'intégrale de  $\sigma$  à  $R.\sigma$  (1 à R en adimensionnel) de :

$$\langle K_{\text{apparent}} \rangle (\tau) = \int 4.\pi.\rho^2. K.\phi/\rho^6 d\rho$$

Ou

$$X = \langle K_{\text{apparent}} \rangle (\tau) / \langle K_{\text{apparent}} \rangle (0) = \int \phi/\rho^4.d\rho / \int d\rho/\rho^4 = 3/(1-1/R^3). \int \phi/\rho^4.d\rho$$

Ce rapport n'est donc sensible qu'à la valeur de K (pour un R donné).

Les méthodes numériques classiques d'intégration d'un tel système amènent à choisir un pas de distance  $d\rho$  (par exemple 0,01) et un pas de temps  $d\tau$  tel que  $d\tau$  soit inférieur à  $d\rho^2/2$  (par exemple  $10^{-5}$ ) pour éviter des divergences. Si i est l'indice du paramètre d'espace, j celui du temps, alors, la distance est définie par  $1 + (i-1).d\rho$  de  $i = 1$  à  $N = 1 + (R - 1)/d\rho$  et le temps par  $\tau = (j - 1).d\tau$  (pour j démarrant à 1).

Pour  $j = j+1$ ,  $i > 1$  et  $i < N$  :

$$\varphi(i, j+1) = \varphi(i, j) + (d\tau / dp^2) \cdot (\varphi(i+1, j) - 2 \cdot (\varphi(i, j) + \varphi(i-1, j)) + 2 \cdot dp / (1 + (i-1) \cdot dp) \cdot (\varphi(i+1, j) - (\varphi(i, j)) - K \cdot d\tau \cdot \varphi(i, j) / (1 + (i-1) \cdot dp))^6)$$

Pour  $i = 0$ ,  $\varphi(1, j+1) = \varphi(1, j)$

Pour  $i = N$ , les entités A qui n'ont pas réagi autour d'un  $D^*$  restent toujours les mêmes. Elles gardent la valeur  $4 \cdot \pi \int \rho^2 \cdot dp$  (compte tenu des hypothèses). Alors, cette contrainte se traduit par :

$$4 \cdot \pi \int \rho^2 \cdot \varphi \cdot dp = 4/3 \pi \cdot (R^3 - 1)$$

Conduisant à (par somme sur les  $i$  de 1 à  $N$ ) :

$S_i = \varphi(N, j+1) = \varphi(N, j) + \varphi(N-2, j) - \varphi(N-1, j)$ , correspondant à un raccordement par point et tangente pour  $i = N$  :

$$\lambda \cdot \Sigma(1 + (i-1) \cdot dp)^2 \cdot \varphi(i, j+1) \cdot Dp = (R^3 - 1)/3$$

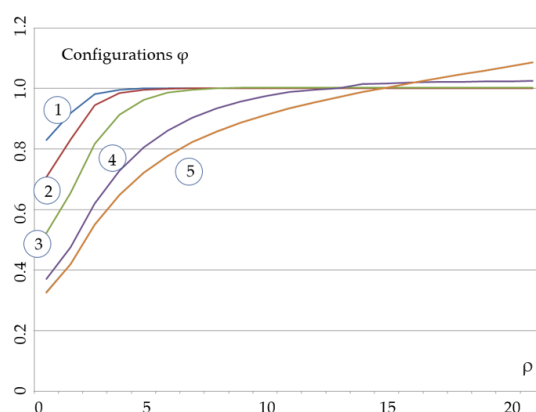
ce qui permet de boucler le système avec ses conditions aux limites.

Ainsi de proche en proche, il est possible de calculer les évolutions temporelles de  $\varphi$  et par intégration ultérieure, la valeur de la constante de vitesse adimensionnelle  $\chi$ . Il est ensuite possible de revenir dans l'espace des temps (sortir de l'adimensionnel) pour définir les évolutions temporelles de  $D^*$ , excité par une excitation de Dirac. Ce sont ces différentes étapes qui font l'objet de présentation dans la suite de ce document.

Premier exemple : on se place dans des conditions où il doit y avoir couplage transport – réactivité en choisissant :

$$\sigma = 0,5 \text{ nm} ; D = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1} ; R_0 = 1 \text{ nm} ; \tau_0 = 10 \text{ ns}$$

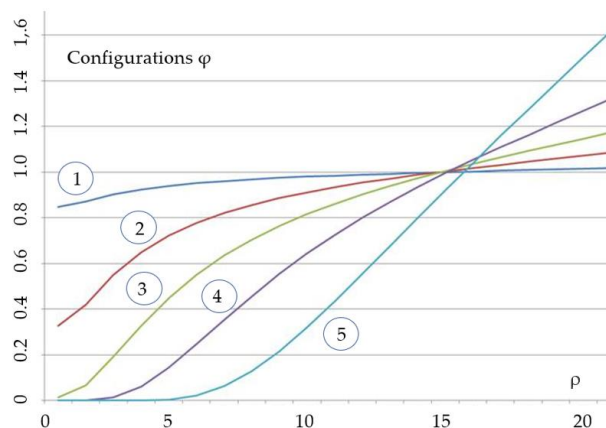
alors  $K = 1,6$  (nombre sans dimension) et  $R = 10$  (également sans dimension). Si l'on fait varier la viscosité (en faisant l'hypothèse que le produit  $\eta \cdot D_{DA}$  est une constante), le passage d'une diffusion de type classique dans l'eau ou l'éthanol à celle d'un fluide visqueux de viscosité 100 centipoises fait passer  $D_{DA}$  à  $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  et  $K$  à 160... Or, dans les calculs numériques, il conviendra de choisir un pas de calcul tel que  $K \cdot d\tau$  soit très inférieur à l'unité pour éviter des incréments trop élevés susceptibles de faire diverger l'intégration... Si par exemple,  $d\tau$  est  $10^{-3}$  (sans dimension), il convient de choisir une valeur de  $dp$  inférieure à 0,03 (pour respecter la contrainte  $d\tau / dp^2 < 0.5$ ... Pour éviter de changer de pas, on partira de la valeur de  $K$  la plus grande avec ses contraintes. La figure 9 présente les résultats. Remarquons que pour  $dp = 0,01$  chaque calcul prend de quelques secondes ( $T = 0,04$ ) à plus de 30 minutes ( $T = 400$ ) sur un ordinateur de bureau travaillant en Fortran 99...



**Figure 9.** Evolutions spatiales et temporelles des configurations  $\varphi$  pour plusieurs valeurs du « temps » pour  $K = 10$  (série 1 : 0,04 ; série 2 : 0,1 ; série 3 : 0,4 ; série 4 : 4 ; série 5 : 400 (identique à  $T = 40$ ))

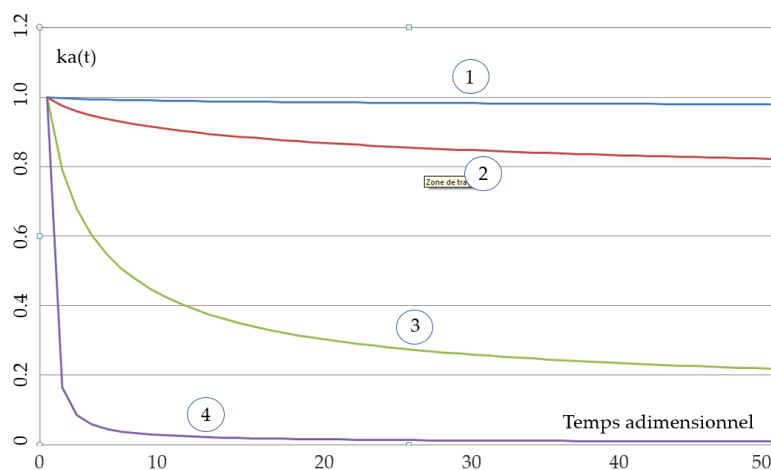


Sur ces graphiques, la valeur de  $\phi$  est toujours une fonction croissante de la distance (ce qui est attendu) et se stabilise dès que le temps adimensionnel dépasse quelques unités. Cette situation complexe doit être explorée pour permettre de faire quelques approximations pour une analyse cinétique des phénomènes en cause, si l'on veut être capable d'interpréter les résultats expérimentaux. Pour  $T = 40$  (temps adimensionnels longs), la figure 10 représente les variations de  $\phi$  au contact entre  $D^*$  et A pour différentes valeurs de  $K$  (série 1 :  $K = 1$  ; série 2 :  $K = 10$  ; série 3 :  $K = 100$  ; série 4 :  $K = 1000$  ; série 5 :  $K = 10000$ ). Remarquons que le pas en  $\tau$  a été adapté pour que la quantité  $K \cdot d\tau$  soit toujours inférieure à l'unité.



**Figure 10.** Variation de  $\phi$  avec la distance pour différentes valeurs de  $K$  (série 1 :  $K = 1$  ; série 2 :  $K = 10$  ; série 3 :  $K = 100$  ; série 4 :  $K = 1000$  ; série 5 :  $K = 10000$ )

De manière évidente, la configuration des A relativement aux  $D^*$  ne peut être regardée comme stationnaire. Sur la base du modèle (compliqué numériquement, mais en réalité simplissime du point de vue physique) décrit ci-dessus, il est maintenant possible d'examiner comment le paramètre  $K$  affecte la constante apparente (adimensionnelle) de réaction entre  $D^*$  et A. La constante dimensionnelle  $k$ , définie par l'intégrale  $k = \int_{\sigma}^{R} r^2 \cdot k(r) \cdot dr$  depuis la distance de collision jusqu'à  $R \cdot \sigma$  (au facteur  $4 \cdot \pi$  près), est obtenue à partir de  $K$  en incrémentant sur les  $i$  (pour aller de  $\sigma$  à  $R \cdot \sigma$ , au facteur  $4 \cdot \pi$  près également). La figure 11 illustre pour différentes valeurs de  $K$  les évolutions temporelles de  $k$  (série 1 :  $K = 0,1$  ; série 2 :  $K = 1,0$  ; série 3 :  $k = 10,0$  ; série 4 :  $K = 100,0$ ). En dehors du cas « évident » d'un transfert à longue distance se produisant avec une faible probabilité ( $K$  petit), il n'est pas possible de considérer que l'on se situe dans des conditions où la cinétique est classique avec de « bonnes relaxations exponentielles », voire bi-exponentielles à trouver dans les résultats expérimentaux...



**Figure 11.** Effets de la valeur de  $K$  sur les évolutions temporelles de  $ka(t)$  (série 1 :  $K = 0,1$  ; série 2 :  $K = 1,0$  ; série 3 :  $k = 10,0$  ; série 4 :  $K = 100,0$ )

### 3.1.2. Constante de vitesse aux temps longs

Comme on peut le constater, aux temps longs,  $k(t)$  tend vers une limite asymptotique correspondant à la résolution de l'équation suivante :

$$0 = \partial^2 \phi / \partial \rho^2 + 2/\rho \cdot \partial \phi / \partial \rho - K_0 \cdot \phi / \rho^6$$

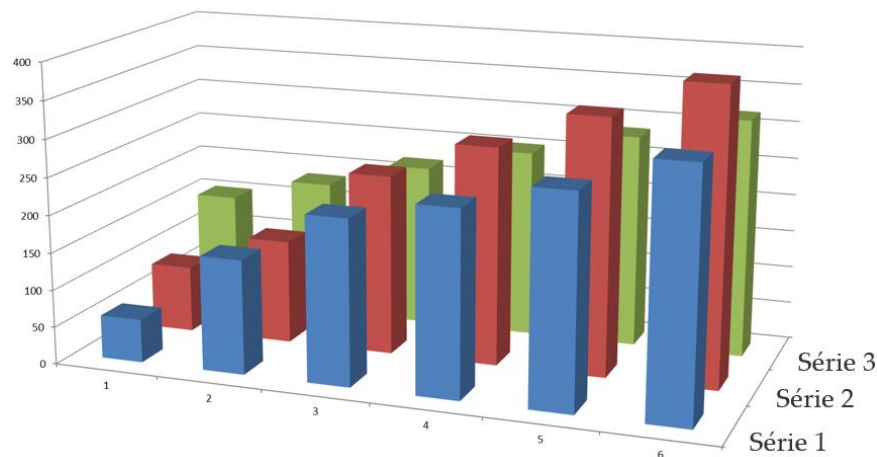
qui n'a (à la connaissance des auteurs) pas de solution analytique (sauf pour  $K_0 = 12$ ) ; force a été de pousser l'intégration numérique assez loin en temps adimensionnel pour déterminer une valeur approchée de  $ka(t)$ . On a représenté sur la figure 12 le logarithme décimal de  $k(t)$  vs le logarithme de  $K$  (allant de 0,1 à 1000 par pas multiplicatif de 10). Si l'on prend en compte les 6 valeurs de  $K$ , un calcul au sens des moindres carrés conduirait à :

$$\log(ka(t)) = 0,502 \cdot \log(K) - 0,61$$

Or pour les faibles valeurs de  $K$ ,  $ka(t)$  devrait être sensiblement proportionnel à  $K$ , ce qui a conduit à une nouvelle optimisation sur les cinq points les plus élevés de  $K$ , alors :

$$\log(ka(t)) = 0,3302 \cdot \log(K) - 0,136$$

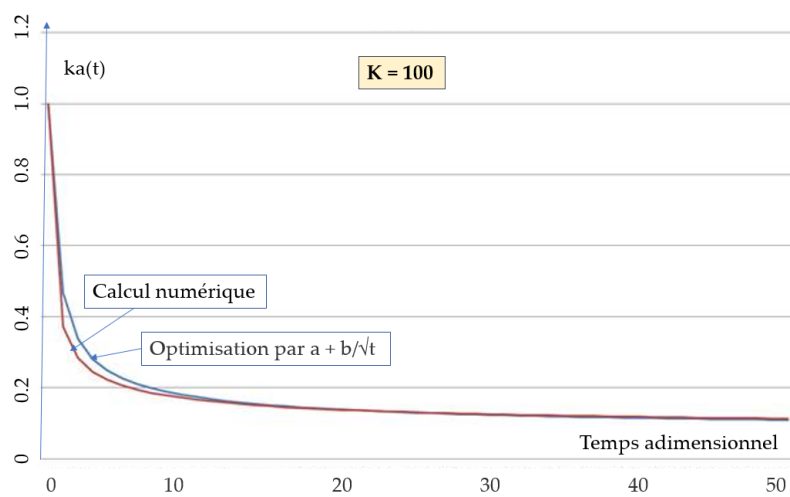
Sur la figure 12, en bleu sont représentés les résultats numériques, en rouge ceux optimisés sur 6 points, en vert sur 5 points. Ce que l'on cependant constater, c'est que le couplage transport réactivité conduit, même pour des temps longs, à des résultats reliant  $ka(t)$  à  $K$ , plutôt complexes. Il est difficile déjà à ce stade de définir des conclusions même partielles.



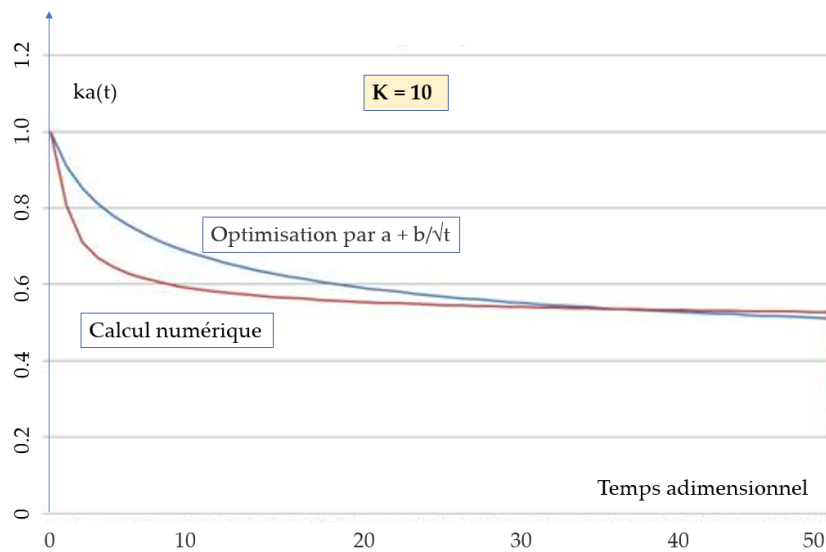
**Figure 12.** Logarithme décimal de  $ka(t)$  vs le logarithme de  $K$  (allant de 0,1 à 1000 par pas multiplicatif de 10)

### Constante de vitesse en $a + b/\sqrt{t}$

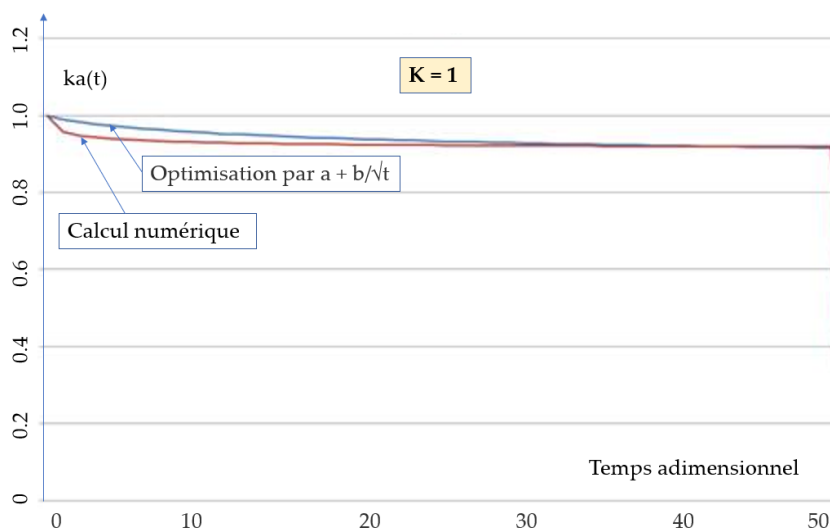
Les figures 13 représentent les comparaisons entre les valeurs de  $ka(t)$  calculées par intégration numérique (cf. supra) et des expressions classiques de la forme  $ka(t) = a + b/\sqrt{t}$  que l'on retrouve souvent dans des couplages transport réactivité à l'échelle moléculaire (cf. supra).



A



B



C

**Figure 13.** Variation de  $ka(t)$  vs  $K$  et optimisation en  $a + bt^{1/2}$

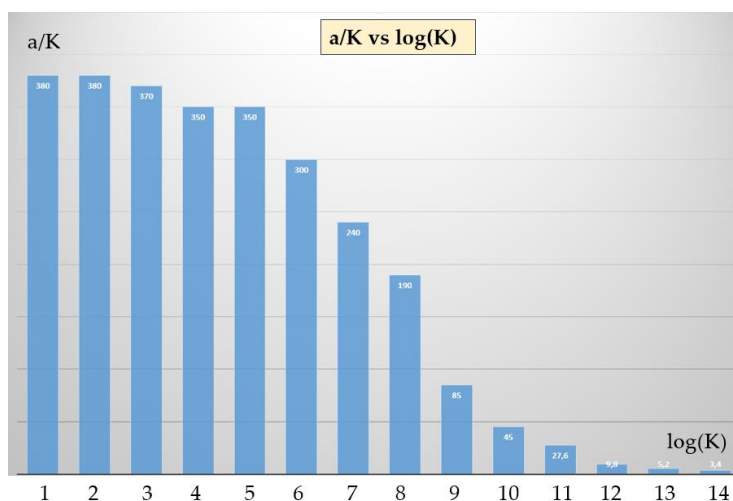
Si, pour des valeurs de  $K$  élevées, et évidemment faibles, il y a un assez bon accord entre simulation et représentation par une loi approchée en  $\sqrt{t}$ , il n'en est pas tout à fait de même pour  $K$

voisin de l'unité (mais, comme souvent, on se satisfait de représentations semi-logarithmiques, quelques dix pour cent sur ka risquent d'être cachés dans le bruit gaussien lié à la technique spectroscopique ?). Cependant, loin d'une quête de l'absolu, si l'on veut pouvoir effectuer un traitement des données, il peut être avantageux de rechercher des déclinés « simplifiés », mais manipulables. Toutefois, leur validité pourra si nécessaire, dans un deuxième temps, être remise en cause pour (éventuellement) affiner le traitement de l'information. Dans cet esprit, nous avons calculé a et b par optimisation numérique au sens des moindres carrés ( $X^2/K$ ) pour différentes valeurs de K. Les valeurs optimisées sont rassemblées dans le tableau 1 :

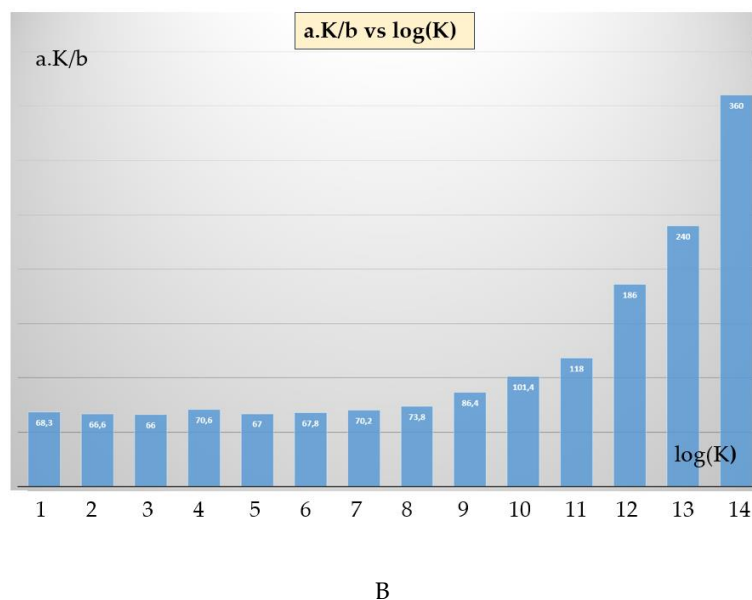
K	a	b	$X^2/K$	a/K	$K \cdot a/b$
0,06	0,023	$2,02 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-9}$	0,38	68,3
0,1	0,038	$5,75 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-8}$	0,38	66,6
0,3	0,11	$5,09 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,37	66,0
0,6	0,21	$1,97 \cdot 10^{-3}$	$8,0 \cdot 10^{-6}$	0,35	70,6
1	0,35	$5,24 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0,35	67,0
3	0,89	$3,89 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,30	67,8
6	1,42	0,121	$2,4 \cdot 10^{-3}$	0,24	70,2
10	1,86	0,252	0,005	0,19	73,8
30	2,55	0,888	0,011	0,085	86,4
60	2,71	1,60	0,10	0,045	101,4
100	2,76	2,34	0,079	0,028	118
300	2,93	4,70	0,024	0,0098	186
600	3,14	7,04	0,0073	0,0052	240
1000	3,39	9,38	0,00035	0,034	360

**Tableau 1.** *Calculs de a et b par optimisation numérique au sens des moindres carrés ( $X^2/K$ ) pour différentes valeurs de K*

En faisant varier K de 0,06 à 1000, les rapports a/K et  $K \cdot a/b$  évoluent faiblement avec K (comme illustré sur les deux figures 14), ce qui autorise une détermination de K connaissant a et b (pour autant que le modèle soit fiable, ce qui sera vérifié expérimentalement). Par ailleurs, le critère des moindres carrés passe comme cela a déjà été exprimé ci-dessus par un maximum vers K=100).



A



**Figure 14.** A:  $a/K$  vs  $\text{Log}(K)$  ; B :  $Ka/b$  vs  $\text{Log}(K)$

S'il est envisageable de considérer que la constante de vitesse est, en première approximation, représentable par une expression de la forme  $a + b/\sqrt{t}$ , il peut être possible d'examiner comment cette cinétique se traduit dans le fait expérimental. Toutefois, avant d'explorer cette potentialité, il peut être utile d'examiner si ce type de modèle « résiste » bien aux évolutions des hypothèses qui ont permis son émergence. Ces considérations sont présentées ci-après.

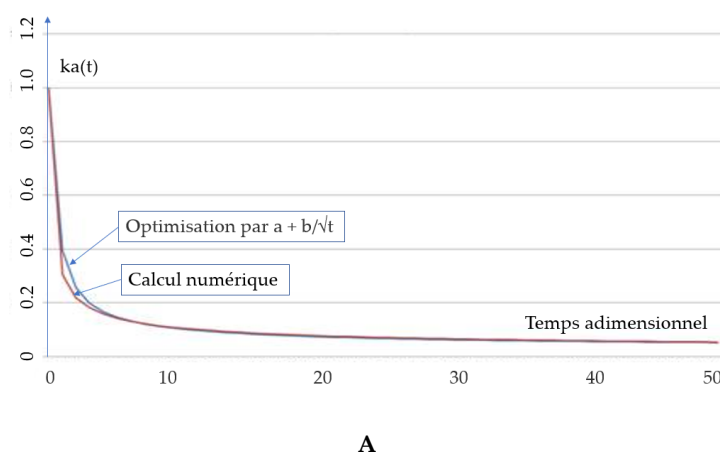
### 3.2. « Crash test » du modèle cinétique

Nous avons fait plusieurs hypothèses dont il convient de tester l'influence sur la forme de  $ka(t)$  : paramètres d'espace, de potentiel d'interaction, d'évolution spatiale pour le coefficient de diffusion, etc. Nous passons donc « à la moulinette », ce qui vient d'être obtenu pour en tester la crédibilité, voire la robustesse.

#### 3.2.1. Changement de l'espace accessible au transport

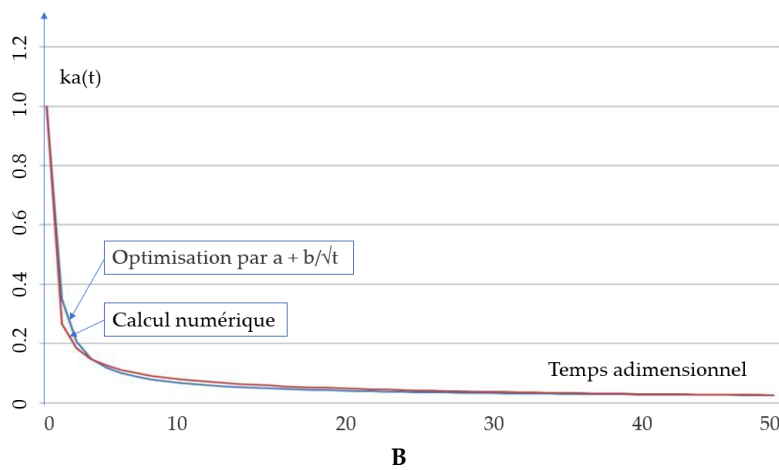
Si l'on examine tout d'abord le changement d'espace (de sphérique à circulaire en passant par un modèle linéaire, en utilisant une valeur de  $K$  identique (100), il est possible de conclure avec une « bonne confiance » à la validité pour  $ka(t)$  de suivre une représentation en  $a + b/\sqrt{t}$  comme l'illustre la figure 15.

Dans un espace à 2 dimensions (approche cylindrique) avec  $K = 100$  :



Avec une approche linéaire (une dimension) avec  $K = 100$  :





**Figure 15.** Validité pour  $ka(t)$  de suivre une représentation en  $a + b/\sqrt{t}$  : A : 2 dimensions ; B : 1 dimension (les courbes en bleu correspondent à une optimisation sous la forme  $a + b/\sqrt{t}$  des résultats des simulations numériques)

Il aurait été possible, pour autant que l'information initiale le permette, de prendre en compte d'autres dimensions, dont des dimensions fractales... Mais... Pour rester dans la comparaison, nous présentons dans le tableau 2 les valeurs de  $a$ ,  $b$ ,  $X^2$  (moindres carrés) pour  $K = 100$  pour les 3 dimensions étudiées :

Dimension	$a$	$b$	$X^2$
3	2,76	2,34	0,79
2	0,39	1,79	0,38
1	-0,35	1,43	0,25

**Tableau 2.** Données des simulations traitées par optimisation pour  $K = 100$

Si la forme du déclin n'est pas en cause, le calcul par une méthode d'optimisation au sens des moindres carrés peut être sujet à caution dans la mesure où, s'il conduit dans l'espace temporel (adimensionnel) exploré à une bonne représentation, une valeur négative de  $a$  (espace unidimensionnel) n'ayant aucun sens physique n'est pas explicable sur les bases scientifiques connues !

### 3.2.2. Transport dans un champ de potentiel

Il s'agit de résoudre l'équation suivante (en faisant l'hypothèse d'un coefficient de diffusion indépendant de  $r$  et de  $\psi$ ) :

$$\partial\phi/\partial t = D_{DA} \cdot (\partial^2\phi/\partial r^2 + 2 \cdot \partial\phi/\partial r/r) - \text{div}(1/k_B T \cdot \text{grad}(\psi) \cdot \phi) - k(r) \cdot \phi$$

$\Psi$  désigne le potentiel,  $k_B$  la constante de Planck et  $T$  la température absolue ; les autres termes ont été définis par ailleurs. Comme on ne dispose pas de données sur la question, nous avons choisi de diviser l'espace en trois domaines :

- Entre  $\sigma$  et  $\sigma.R_1$  : pas de potentiel ; distribution  $\phi_1$  ;
- Entre  $\sigma.R_1$  et  $\sigma.R_2$  existence d'un potentiel constant  $\psi$  ; distribution  $\phi_2$  ;
- Au-delà pas de potentiel ; distribution  $\phi_3$ .

En l'absence de réaction (distribution des A avant excitation électronique autour des D), il existe une distribution dans la zone intermédiaire représentée par  $\phi_0 \cdot \exp(\psi/k_B T) = \phi_0 \cdot P$  alors qu'elle est « juste »  $\phi_0$  dans les deux autres zones. Le calcul de  $\phi_0$  est défini par la connaissance du fait qu'il n'y a qu'un A par entité D (ou  $D^*$  à  $t = 0$ ). Alors :

$$\varphi_0 = (R^3 - 1) / (R^3 + (P-1).R_2^3 - (P-1).R_1^3 - 1)$$

Les conditions aux limites sont définies pour  $\sigma$  et  $\sigma.R$  comme précédemment ; 4 nouvelles conditions sont ajoutées :

$$P. \varphi (R_1 - \varepsilon) = \varphi (R_1 + \varepsilon)$$

$$P. \varphi (R_2 + \varepsilon) = \varphi (R_2 - \varepsilon)$$

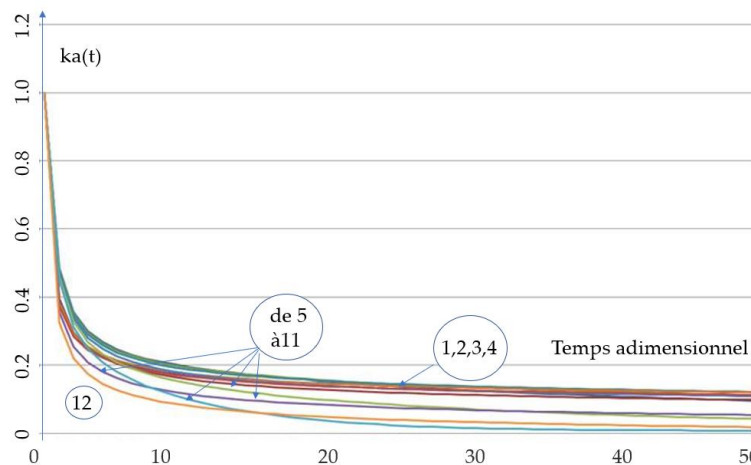
$$\partial \varphi / \partial r (R_1 - \varepsilon) = P. \partial \varphi / \partial r (R_1 + \varepsilon) \text{ (égalité des flux)}$$

$$\partial \varphi / \partial r (R_2 + \varepsilon) = P. \partial \varphi / \partial r (R_2 - \varepsilon)$$

Il est alors possible de définir trois zones qui doivent satisfaire l'équation simplifiée suivante :

$$\partial \varphi / \partial t = D.(\partial^2 \varphi / \partial r^2 + 2. \partial \varphi / \partial r / r) - k(r). \varphi$$

La figure 16 rassemble quelques essais pour  $K = 100$  et à différentes valeurs de  $P$  (0,7 pour les séries 1 et d'optimisation 2, 0,8 pour 3 et 4, 0,9 pour 5 et 6, 1 pour 7 et 8, 1,1 pour 9 et 10, 1,2 pour 11 et 12).



**Figure 16.** Influence d'un potentiel sur  $ka(t)$  pour différentes valeurs de  $P$

Si l'existence d'un potentiel (dans l'exemple retenu entre le 1/3 et 2/3 de l'espace radial) affecte les valeurs de  $a$  et  $b$  (cf. tableau 3), on peut encore considérer qu'il existe un assez bon accord entre calcul numérique et modélisation.

Valeur de $P$	$a$	$b$	$\chi^2$
0,7	2,08	2,91	2,07
0,8	2,67	2,67	1,45
0,9	3,09	2,44	0,96
1,0	2,75	2,33	0,79
1,1	0,15	2,67	1,45
1,2	-1,18	2,63	1,43

**Tableau 3.** Paramètres de variation de  $ka(t)$  en fonction de  $P$

Toutefois, comme dans l'exemple précédent, la signification physique d'une valeur de  $a$  négative pour  $P = 1,2$  n'est pas interprétable, sans qu'il soit possible à ce niveau de savoir si la valeur de  $P$  a un sens physique.

### 3.2.3. Coefficient de diffusion fonction de l'espace

Dernier volet de notre exploration, nous allons examiner l'effet possible d'une évolution de  $\mathcal{D}$  avec la distance  $r$ . Encore une fois, on ne dispose pas de données dans ces espaces confinés où d'ailleurs le nombre de molécules de solvant n'est sans doute pas suffisamment élevé pour qu'on puisse considérer le milieu environnant le couple DBA comme quasi-continu... Mais, il faut faire avec ce qui est à la disposition du modélisateur qui souhaite sortir « quelque chose » d'utile et de crédible d'une expérience (de photo-physique en l'occurrence).

Il convient alors de résoudre l'équation suivante :

$$\partial\phi/\partial t = \text{div}(D_{DA}.\text{grad}\phi) - k(r). \phi$$

qui devient :

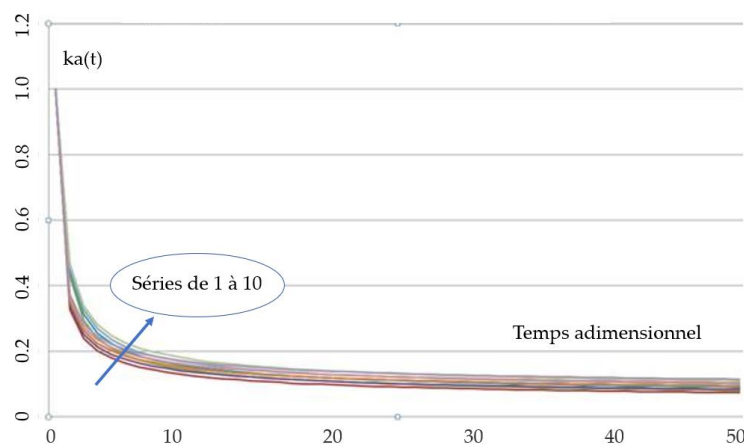
$$\partial\phi/\partial t = D_{DA}(r).\partial^2\phi/\partial\rho^2 + \partial\phi/\partial\rho.(2.D_{DA}(r)/r + dD_{DA}(r)/dr) - k(r). \phi$$

Elle peut être maîtrisable pour autant qu'on dispose d'un estimateur de  $D_{DA}(r)$  et que, par ailleurs, on fasse l'hypothèse (discutable ?) de l'indépendance de  $D_{DA}$  avec le temps de réaction (lié à l'éloignement des deux chromophores D et A). En l'absence de connaissance de  $D_{DA}(r)$ , il est possible de considérer une diffusion plus libre quand la chaîne qui relie D à A est étirée, alors que le repliement de cette dernière pour les distances courtes peut limiter le transport brownien. Sur cette base (certes discutable comme la plupart de celles qui ont déjà été présentées), on propose de définir  $D_{DA}(r)$  par une relation de la forme :

$$D_{DA}(\rho) = D_{DA}.\left(\lambda + (1-\lambda). \sin\left(\pi. (\rho-1)/2/(R-1)\right)\right) \text{ avec } \lambda \in [0,1] \text{ et}$$

$$dD_{DA}/d\rho = D_{DA}.(1-\lambda).\pi/2/(R-1).\text{Cos}\left(\pi. (\rho-1)/2/(R-1)\right)$$

La figure 17 traduit pour  $K = 100$  les évolutions de  $ka(t)$  pour différentes valeurs de  $\lambda$ .



**Figure 17.** Influence d'un changement de  $D_{DA}$  vs  $r$  sur  $ka(t)$  pour différentes valeurs de  $\lambda$

L'effet de cette évolution ne perturbe pas la représentation en  $a + b/\sqrt{t}$ . Les valeurs de  $\lambda$  vont de 0 (séries 1 et 2) à 1,0 (séries 9 et 10) par incrément de 0,25. Le tableau 4 rassemble les valeurs de  $a$  et  $b$  ainsi calculées par optimisation numérique.

$\lambda$	a	b	$\chi^2$
0,00	1,18	2,30	0,63
0,25	1,57	2,32	0,69
0,50	1,97	2,33	0,73
0,75	2,36	2,33	0,76
1.0	2.7	2,33	0,79

**Tableau 4.** Influence de  $\lambda$  sur les paramètres a et b de  $ka(t)$

Ainsi, compte tenu des hypothèses susceptibles d'être explorées, ce que l'on peut conclure, c'est que la représentation de la constante cinétique est assez bien représentée, quelle que soit l'hypothèse testée, par une représentation classique en  $a + b/\sqrt{t}$ . Le coefficient b qui est une fonction de K résiste « assez » bien aux perturbations qu'on lui a fait subir. En revanche, le coefficient a est sensible à des modifications paramétriques même modestes. Il sera donc difficile, pour autant qu'on puisse calculer ces deux paramètres, d'atteindre les processus primaires se produisant autour de  $D^*$  avec une finesse acceptable, tout au plus pourrons nous montrer l'existence d'une compatibilité entre théorie (simplifiée) et expérience de photo-physique en résolution temporelle...

Maintenant que le modèle approché a subi avec un certain succès ce crash-test, deux opérations sont à mener : sortir de l'adimensionnalisation et introduire le « vrai »  $ka(t)$  dans la cinétique réactionnelle, ce qui est envisagé ci-après.

### 3.3. Retour dans l'espace des temps

La concentration moyenne entre la distance de collision  $\sigma$  et  $R.\sigma$  est définie par le fait qu'il n'y a qu'une entité Q, soit un volume de  $4.\pi.(R^3-1).\sigma^3/3$ . Dans ces conditions, la « concentration moyenne » (en l'absence de potentiel) s'exprime en mole.l<sup>-1</sup> par :

$$C_0 = 3/(4.\pi.N_A.\sigma^3.(R^3-1))$$

Ce qui correspond avec les valeurs retenues à une concentration moyenne de l'ordre de  $3.2 \cdot 10^{-2}$  mole.l<sup>-1</sup> (rappelons que l'on a choisi  $\sigma = 0,5$  nm,  $R.\sigma = 5$  nm). A  $t = 0$ , la vitesse de disparition de  $D^*$  est définie par l'intégrale (de  $\sigma$  à  $R.\sigma$ ) suivante :

$$ka(0) = \int 4.\pi.N_A.C_0.r^2 (R_0.\sigma/r)^6 .dr$$

Ce qui, après quelques manipulations conduit à  $ka(0)$  exprimé en s<sup>-1</sup> :

$$ka(0) = R_0^6/R^3/\tau_0$$

avec les hypothèses,  $ka(0)$  vaudrait :  $ka(0) = 2^6/10^3/10^{-8} = 6,4 \cdot 10^6$  s<sup>-1</sup> (c'est-à-dire  $K = 1.6$ ). Dans la suite, pour des temps supérieurs, pour autant que l'expression de  $K_a$  soit bien en  $a + b/\sqrt{t}$ ,  $ka(t)$  s'exprime par :

$$ka(t) = ka(0).(a+b.\sigma/\sqrt{D_{DA}.t})$$

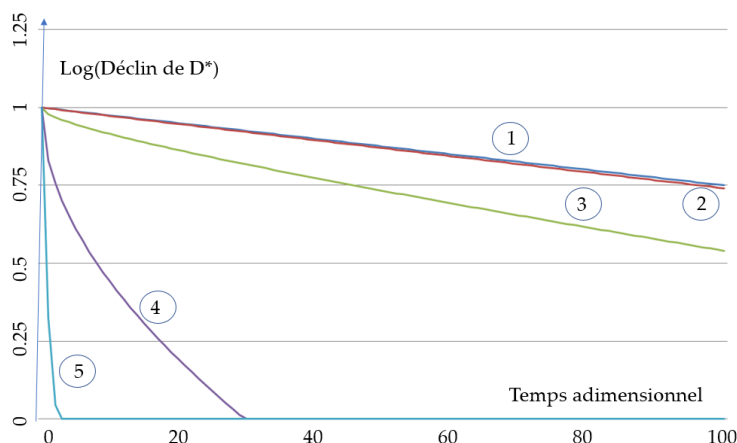
Si maintenant, on revient à la cinétique de disparition de  $D^*$ , celle-ci s'exprime par la relation :

$$d(D^*)/(D^*).dt = - 1/\tau_0 - ka(t)$$

L'intégration de cette équation conduit, de manière évidente, à :

$$(D^*)/(D^*)_0 = \exp(- (a.ka(0)+1/\tau_0).t - 2.ka(0).b.\sigma\sqrt{t}/\sqrt{D_{DA}})$$

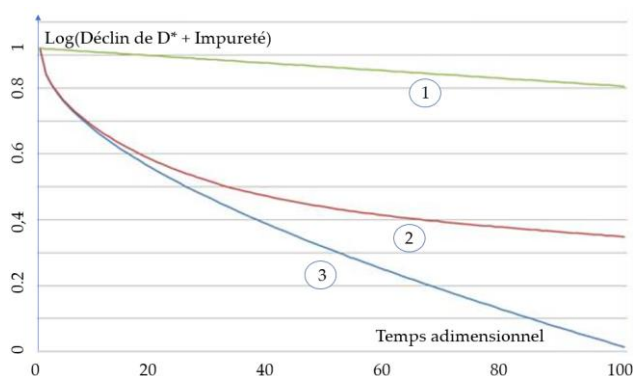
En choisissant des valeurs de  $K$  telles que celles étudiées précédemment ( $K$  de 1 à 1000), la figure 18 exprimée en semi-log permet de visualiser des déclin temporels de  $D^*$  après une excitation de Dirac (donc en l'absence de convolution par l'excitation et de bruit blanc aléatoire).



**Figure 18.** Influence de  $K$  sur le déclin de  $D^*$  : 1 :  $K = 0$  ; 2 :  $K = 1$  ; 3 :  $K = 10$  ; 4 :  $K = 100$  ; 5 :  $K = 1000$

Sur la figure exprimant le déclin en semi-logarithmique, l'effet de  $K$  est effectif (série 1 :  $K=0$  ; série 2 :  $K = 1$  ; série 3 :  $K=10$  ; série 4 :  $K = 100$  ; série 5 :  $K = 1000$ ). La nature non exponentielle du signal n'est notable que pour des situations où  $K$  n'est ni trop petit, ni trop grand... En première instance, pour le chercheur non réellement photo-physicien, le déclin est sans doute complexe, mais est « relativement » assimilable à une exponentielle... (cf. Encadré 1).

Le chimiste, si doué soit-il, quand il a synthétisé et purifié sa molécule sérieusement n'est pas toujours sûr d'une présence résiduelle de la molécule  $D$  (ou  $D$ -Bras espaceur) dans sa préparation. Par jeu un peu cynique, la figure 19 représente le signal qui devrait être obtenu en présence de 1% d'impureté de  $D$  (qui a la même durée de vie que  $D^*$  dans  $DBA$ ), insensible à la présence de  $A$ . Sur cette figure correspondant à  $K = 100$  (série 1 : fluorescence exponentielle de  $D^*$  seul (vert), série 2 : fluorescence simulée de  $D^*BA$  (bleu), série 3 : 1% de fluorescence de  $D^*$  seul, considéré comme impureté) (rouge), la fluorescence parasite par un chromophore libre devient préoccupante pour déterminer les paramètres  $a$  et  $b$ . Rappelons que l'essentiel de l'information se situe aux temps courts ! Mais, il faudrait aussi tenir compte des aspects anisotropie de la fluorescence, de la discrétisation du signal et de l'élimination des diffusions de lumière...



**Figure 19.** Influence d'impuretés sur le déclin de fluorescence (semi-log)

Pour aller au bout du propos, s'il en est ainsi, il convient d'examiner ce qui se passe aux temps courts si, en plus, la lumière parasite vient perturber le signal. Admettons alors dans les mêmes conditions que celles de la figure 18 précédente, l'effet de 10% de lumière parasite (qui n'existera qu'au temps 0 si elle provient de l'excitation de Dirac, compte tenu de nos hypothèses). On obtiendra un signal incorrect pour  $t = 0$ , le reste de l'information pouvant être exploitée. Or,



expérimentalement, l'excitation par la lumière pour produire  $D^*(t)$  n'est pas un Dirac ( $E(t)$ ), alors le signal de fluorescence obtenu (en l'absence de bruit gaussien) est la convolution  $S(t) = E(t)*D(t)$ . En présence de lumière parasite issue de l'excitation,  $S(t)$  sera pollué par la lumière parasite, ce qui peut conduire à une surestimation du paramètre  $b$ .

#### 4. Questions de robustesse et de retour sur $ka(t)$ : différences de points de vue

##### 4.1. Considérations générales

L'objet d'une modélisation/conception robuste est d'optimiser en même temps les « performances » de la modélisation et de l'expérimentation de manière à atteindre des résultats utiles qui minimisent la sensibilité aux perturbations. C'est bien sur ces bases réductionnistes que le chercheur en sciences de l'ingénieur privilégie l'efficacité relativement à une vérité « absolue ». En effet, avec toutes les imprécisions potentielles et effectives, il s'agit, avec un modèle de tendance le plus précis possible, de permettre des prolongements pour les autres experts engageables dans la réalisation d'un procédé robuste de traitement de certains cancers. Dans l'exemple retenu, les effets des perturbations ont été rappelées avec la meilleure couverture du champ et la meilleure précision possibles pour proposer, dans le système transport moléculaire-réactivité étudié, une loi de tendance. C'est à ce stade qu'il peut y avoir débat entre le chimiste, le biologiste, l'oncologue et le physicien... Mais au fond se pose la question du but/des buts poursuivi(s) ainsi que des moyens techniques et méthodologiques pour les atteindre (cf. encadré 1) :

Pour le physicien, il s'agit d'atteindre le plus finement possible les processus élémentaires en cause dans une réaction intramoléculaire. Il peut s'appuyer pour ce faire sur une instrumentation bien maîtrisée et sur un traitement du signal qu'il domine. Il doit toutefois faire confiance à celui qui a réalisé la synthèse de ce système réactif complexe. Dans cette approche, le choix couplé doit faire l'objet d'un approfondissement commun visant une synthèse optimisée des points de vue synthèse, purification et propriétés physico-chimiques ; par ailleurs, ce qui va l'intéresser c'est la mise à disposition de la part du chimiste de chaînes à flexibilités et à longueurs variables pour voir comment dans un fluide donné, la réaction peut s'opérer. Mais, de manière évidente, ce détournement éloigne ce scientifique de la transformation de la matière de son objectif d'étude de réactions de type « molecular beacons » ;

Pour le chimiste, il s'agit de valider une méthodologie qui pourra être mise en œuvre ensuite, par exemple dans des applications en oncologie (exemple ciblé de la thérapie photo-dynamique). Ce qui peut être recherché, c'est de disposer d'un système DBA très efficace en termes de transfert de type Foerster. Une approche semi-quantitative peut suffire pour autant que la pureté photo-physique de la substance soit suffisante ; tant que  $D$  est relié à  $A$ , le déclin de fluorescence est très rapide parce que  $A$  inhibe le fluorescence de  $D^*$ , quand les deux entités sont libérées l'une de l'autre par un processus enzymatique, la fluorescence naturelle de  $D$  apparaît (ce qui permettrait une approche cinétique simplifiée autorisant l'observation de la coupure enzymatique responsable de la libération de  $D$  et de  $A$ ) ;

Pour le biologiste qui veut, par exemple, utiliser un processus enzymatique qui va couper la substance pour libérer  $D$  de son compagnon  $A$  (pour permettre ensuite une production d'oxygène singulet ciblée pour des traitements de cancers selon un transfert d'énergie par collision (Dexter) entre  $D^*$  et l'oxygène en solution), une « simple » augmentation du rendement de fluorescence peut constituer un indicateur de la coupure souhaitée (pour autant que  $D$  ne soit pas rapidement photo-oxydé par l'oxygène—moléculaire triplet ou singulet, voire par d'autres espèces réactives de l'oxygène—; toutefois, des analyses plus fines peuvent être nécessaires car, dans des milieux biologiques, la conformation du système peut ne plus être celle que l'on a dans un fluide

« simple » (le solvant) constitué de pseudosphères dures et la comparaison de déclin peut être à même de donner des informations sur cette différence (un retour vers des études photo-physiques) ; le suivi de la cinétique de coupure peut également être réalisé en milieu biologique selon la mesure définie pour le « chimiste » ;

Pour l'ingénieur qui cherche à optimiser le système (indépendamment de l'apport quantitatif de photons dans les zones à traiter qui constitue un autre verrou, mais dans un autre domaine), le taux de coupure ne suffit pas, c'est le taux de production d'oxygène actif dans la zone à traiter qui est recherché, tenant compte à la fois de la coupure, de la répartition spatiale de DBA relativement aux zones à traiter, des enzymes « coupeurs », de l'espace accessible aux différentes réactions, aux transferts de matière à l'échelle locale (oxygène en particulier) et à la mobilité des espèces (diffusion moléculaire) ; ce dernier va donc chercher à disposer d'une « sonde » qui renseignera sur la production d'espèces réactives de l'oxygène qu'il saura relier au flux lumineux et au traitement ;

Pour l'oncologue, qui a besoin de disposer d'un outil fiable de traitement, en dehors de contraintes d'hygiène et de risques liés à la dangerosité des substances utilisées, une mesure de fluorescence en excitation continue/pulsée (à 1 ou à 2 photons) peut renseigner sur la concentration locale des D libérés et donc sur l'action ultérieure dans la production d'oxygène actif... Pour autant, si cela permet de « creuser » scientifiquement le sujet, c'est une mesure de la concentration locale de l'oxygène singulet ou d'autres molécules représentatives de l'action de la lumière qui est recherchée. Il se retourne alors vers le biologiste et l'ingénieur pour cet objectif (qui peut se réduire à une simple mesure de flux lumineux, validée par des analyses biologiques). Cette situation dans le cas DBA n'a pas été mise en œuvre.

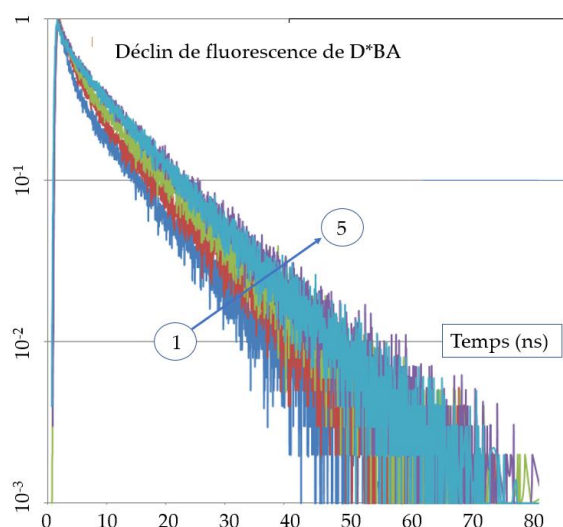
Ainsi, chaque « métier » de la recherche peut avoir des impératifs différents, mais pour les atteindre, chaque partenaire a besoin (doit avoir besoin) des tenants des autres disciplines. Pour ce qui concerne les bases instrumentales de photo-physique, la boîte à outils qui a été décrite peut permettre de faire un peu de chemin dans la bonne direction. Elle consiste dans la définition de séries d'expérimentations pertinentes pour valider un modèle ainsi que du choix réfléchi et optimal d'une ou plusieurs instrumentations. Ces dernières, au cours du rapprochement avec l'application, s'appuyant sur des modèles expérimentaux *in silico* et *in vitro* devraient évoluer vers une simplification, tout en gardant une robustesse au procédé de traitement. Rappelons qu'un test ou un modèle sont robustes s'ils restent valables alors que les hypothèses d'application ne sont pas toutes réunies. Une quantité suffisante de données, résultant d'une approche expérimentale précise, permet, en principe, de bâtir des modèles fiables et solides, pour autant que chacune des disciplines accepte de se poser les bonnes questions sans faire trop confiance aux autres (principe d'égalité).

#### **Encadré 1.** *Considération « mesure/résultat d'intérêt lié(s) à la discipline »*

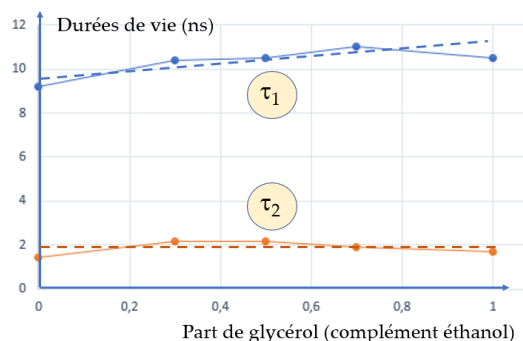
### **4.2. La frustration !**

La figure 20 illustre (la fin du suspense !) la difficulté d'une possible discussion s'appuyant sur les résultats expérimentaux puisqu'un déclin de fluorescence de D\* peut avec une très bonne approximation être défini par une « simple » loi bi-exponentielle de décroissance temporelle, sans que des effets en  $\sqrt{t}$  soient perceptibles... Ce résultat non contestable d'un point de vue spectroscopique et réalisé par Stallivieri (2015) fait perdre la possibilité de lien entre réactions dont la cinétique est liée à la diffusion intermoléculaire et systèmes de type « molecular beacons » ou plus simplement DBA.

Cependant, avec des valeurs des moindres carrés pondérés compris entre 0.97 et 0.99, ce qui est satisfaisant, les valeurs des deux coefficients des déclin bi-exponentiels observés,  $\tau_1$  et  $\tau_2$ , ont pu être calculées et faire l'objet de la figure 21. S'il n'est pas possible d'observer une variation de la viscosité (et donc de  $\mathcal{D}_{DA}$ ) sur  $\tau_2$ , il serait possible qu'un effet existe sur  $\tau_1$  qui augmenterait avec la viscosité. Ce résultat montrerait qualitativement que l'inhibition par A de  $D^*$  est partiellement limitée par la viscosité et donc par les phénomènes de transport (sans qu'il soit possible d'aller plus loin).



**Figure 20.** Résultats expérimentaux en fonction de la viscosité du solvant (mélanges éthanol – glycérol) 1 : éthanol pur ; 2 : mélange 30 – 70 % ; 3 : 50-50 ; 4 : 70 – 30 ; 5 : glycérol pur



**Figure 21.** variation des durées de vie  $\tau_1$  et  $\tau_2$  avec le mélange éthanol/glycérol.

A ce stade, plusieurs hypothèses peuvent être faites :

- L'inadéquation de modèles de la forme  $k(t) = a + b.t^{1/2}$  pour des systèmes  $D^*BA$ . En particulier, nous avons supposé qu'autour de DBA le milieu était continu alors que les molécules de solvant ont des tailles inférieures, mais du même ordre de grandeur que DBA. Pourtant dans Reis e Souza et al (1994), des effets diffusionnels produits dans une cage de solvant à l'échelle nanométrique avaient pu être modélisés et validés expérimentalement. La seconde faiblesse est que pour que  $D^*$  et A se rapprochent, il faut que les liaisons dans le bras espaceur permettent un mouvement de rotation locale entraînant un changement de la distance  $D^*BA$ . Ces rotations intramoléculaires dépendent de la nature des atomes concernés avec des énergies d'activation à prendre en considération pour chaque rotation dans DBA... La valeur de  $\mathcal{D}_{DA}$  dépend de ces rotations complexes avec de possibles effets d'empêchement stériques.

- Dans les fluides biologiques la lumière parasite (diffusions Rayleigh, Tyndall, etc.) peut polluer le signal, entraînant des effets sur a et sur b amplifiés. Avec des solvants classiques utilisés par les chimistes, cet effet peut généralement être négligé.

- Reste alors la question de la propreté de DBA qui, contenant moins de 1% de A libre, pourrait polluer le signal dont, chacun le sait, le nombre de paramètres à extraire doit être modeste (deux plutôt que trois).

Pour aller plus loin, il serait probablement avantageux de disposer de bras espaceurs plus simples (chaîne hydrocarbonée par exemple, dans la limite où, pour les chercheurs engagés dans la recherche PDT, cette séquence pourrait être clivée par les enzymes) avec un nombre de chaînons variable pour étudier l'effet de la longueur de chaîne sur la réactivité expérimentale  $D^*/A$ . Mais si la question posée aux chimistes engagés dans des synthèses complexes avec un but d'utilité publique est bien comprise, elle n'est évidemment pas prioritaire. Et comment les blâmer !

## Bibliographie

- Ababou A., Bombarda E. (2001) "On the involvement of electron transfer reactions in the fluorescence decay kinetics heterogeneity of proteins" *Protein Science*, 10, 2102-2113.
- Achilias D.S., Verros G.D. (2010) "Modeling of diffusion-controlled reactions in free radical solution and bulk polymerization: Model validation by DSC experiments" *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 1842-1856.
- André J.C., Bouchy M., Donner M. (1992) "Kinetics of partly diffusion controlled reactions : XXIV : Unidimensionalisation of diffusion in cylindrical symmetry systems : application to membranes" *Journal of Biological Physics*, 18, 247-60.
- André J.C., Bouchy M., Viovy J.L., Vincent L.M., Valeur B. (1982) "Use of regularization operators together with LAGRANGE multipliers in numerical deconvolution of fluorescence decay curves" *Computer & Chemistry*, 6, 5-13.
- André J.C., Vincent L.M., O'Connor D., Ware W.R. (1979) "Applications of fast FOURIER transform to deconvolution in single photon counting" *Journal of Physical Chemistry*, 83, 2285-94.
- Ayee M.A.A., Bunker B.C., De Groot J.L. (2020) "Membrane modulatory effects of omega-3 fatty acids: Analysis of molecular level interactions" *Current Topics in Membranes*, 86, 57-81.
- Barberi-Heyob M., Frochot C., Bezdetnaya-Bolotine L., Brault D., Dumas D., Guillemin F., Krausz P., Maillard P., Maunit B., Merlin J.L., Mordon S., Müller J.F., Patrice T., Simonneaux G., Tanielian C. (2007) "The photodynamic therapy" [https://www.researchgate.net/publication/281929134\\_The\\_photodynamic\\_therapy](https://www.researchgate.net/publication/281929134_The_photodynamic_therapy)
- Chemistry LibreText (2021) "Fluorescence Resonance Energy Transfer" [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Fundamentals/Fluorescence\\_Resonance\\_Energy\\_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer)
- Delaire J., Piard J., Meallet-Renault R., Clavier G. (2016) « Photophysique et photochimie: Des fondements aux applications » EDP Sciences Ed. – Paris.
- Dong W., André J.C. (1994) "Diffusion-controlled reactions. II. An approach based on a generalized diffusion equation" *Journal of Chemical Physics*, 101, 299-306.
- Duhamel J., Bouchy M., Baros F., André J.C. (1992) "Experimental determination of the apparent rate constant in the case of the reactions of formation of excimer of 1.2 benzantracene in viscous solvents" *Journal of Luminescence*, 54, 203-207.
- Duhamel J., Winnick M., Baros F., André J.C., Martinho J.M.G. (1992a) "Diffusion effects on pyrene excimer kinetics : determination of the excimer formation rate coefficient time dependence" *Journal of Physical Chemistry*, 96, 9805-9810.
- El-Hussein A., Manoto S.L., Ombinda-Lemboumba S., Alrowaili Z.A., Mthunzi-Kufa P. (2021) "A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment" *Anticancer Agents Medical Chemistry*, 21, 149-161.
- He Y., Rice S.A., Xu X. (2016) "Analytic solution of the Ornstein-Zernike relation for inhomogeneous liquids" *Journal of Chemical Physics*, 145, 234508.

- Isenberg I. (1983) "Robust estimation in pulse fluorometry. A study of the method of moments and least squares" *Biophysical Journal*, 43, 141-148.
- IST - Interface Science and Technology (2004) "Ornstein Zernike Equation" <https://www.sciencedirect.com/topics/mathematics/ornstein-zernike-equation>
- Kats E.I., Muratov A.R. (2018) "Simple analysis of scattering data with the Ornstein-Zernike equation" *Physical Review*, E97, 012610.
- Krotov D., Dubuis J.O., Gregor T., Bialek W. (2014) "Morphogenesis at criticality" *Proceedings of the National Academy of Science*, 111, 3683–3688.
- Lee K., Lee S. (2020) "Interplay of reactive interference and crowding effects in the diffusion-influenced reaction kinetics" *Journal of Chemical Physics*, 153, 044129.
- Mohd-Gazzali A., Colombeau L., Arnoux P., Wah H.A., Frochot C., Vanderesse R., Acherar (2017) "Synthesis of mono-, di- and triporphyrin building blocks by click chemistry for photodynamic therapy application" *Tetrahedron*, 73, 532-541.
- O'Connor D., Ware W., André J.C. (1979) "Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques » *Journal of Physical Chemistry*, 83, 1333-1343.
- Okamoto A. (2011) "ECHO probes: a concept of fluorescence control for practical nucleic acid sensing" *Chemical Society Reviews*, 40, 5815–28.
- Ornstein L.S., Zernike F. (1914/2018) "Accidental deviations of density and opalescence at the critical point of a single substance" *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW), Proceedings*, 17, 793–806.
- Philibert J. (1985) « Diffusion et transport de matière dans les solides » Editions de Physique – Paris.
- Ramamurthy V. (2019) "Organic Photochemistry" CRC Press Ed. – New-York – USA.
- Reis e Souza A.T., Martinh J.M.G., Baros F., André J.C. (1994) "Self-quenching of azulene fluorescence in cyclohexane" *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 83, 199-203.
- Rhew K., Chae Y.C., Chang J.E. (2022) "Progress and recent trends in photodynamic therapy with nanoparticles" *Journal of Pharmaceutical Investigation* – <https://doi.org/10.1007/s40005-022-00594-8>
- Rouwhorst J., Ness C., Soyano S., Zaccane A., Schall P. (2020) "Nonequilibrium continuous phase transition in colloidal gelation with short-range attraction" *Nature Communications*, 11, 3558.
- Satoh A. (2015) "Brownian dynamics simulation of a dispersion composed of disk-like hematite particles regarding aggregation phenomena" *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* 483, 328-340.
- Satpati A.K., Nath S., Kumbhakar M., Maity D.K., Senthilkumar S., Pal H. (2008) "Bimolecular electron transfer reactions in coumarin–amine systems: Donor–acceptor orientational effect on diffusion-controlled reaction rates" *Journal of Molecular Structure*, 878, 84-94.
- Smoluchowski M. (von) (1916) "Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen" *Physikalische Zeitung (in German)*, 17, 557–571; 585–599.
- Shekdar K., Langer J., Venkatachalan S., Schmid L., Anobile J., Shah P., (2021) "Cell engineering method using fluorogenic oligonucleotide signaling probes and flow cytometry" *Biotechnology Letters*, 43, 949–958.
- Sherman W.R., Craig A.B. (2018) "Presenting the Virtual World" *Understanding Virtual Reality Interface, Application, and Design* The Morgan Kaufmann Series in Computer Graphics, 398-536.
- Solow R. (1956) "A contribution to the theory of economic growth" *Quarterly Journal of Economics*, 70, 65-94.
- Stallivieri A. (2015) « Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique » Thèse de l'Université de Lorraine - Nancy.
- Stallivieri A., Colombeau L., Devy J., Etique N., Chaintreuil C., Myrzakhmetov B., Achard M., Baros F., Arnoux P., Vanderesse R., Frochot C. (2018) "New Photodynamic Molecular Beacons (PMB) as potential cancer-targeted agents in PDT" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26, 688-702.
- Stanley H.E. (1971) "Introduction to Phase Transitions and Critical Phenomena" Clarendon Press Ed. – Oxford -UK.
- Täpp I., Malmberg L., Rennel E., Wik M., Syvänen A.C. (2000) "Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes" *BioTechniques*, 28, 732–8.
- Thierry P. (2003) "Photodynamic therapy" Cambridge University Ed. Cambridge – UK.



- Tyagi S., Kramer F.R. (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" *Nature Biotechnology*, 14, 303–308.
- Valeur B. (2004) « Invitation à la fluorescence moléculaire » De Boeck Ed. – Paris.
- Valeur B. (2017) « Lumière et luminescence : ces phénomènes lumineux qui nous entourent » Belin Ed. – Paris.
- Walliser R.M., Boudoire F., Orosz E., Tóth R., Braun A., Constable E.C., Rácz Z., Lagzi I. (2015) "Growth of Nanoparticles and Microparticles by Controlled Reaction-Diffusion Processes" *Langmuir*, 31, 1828–1834.
- Wilson B.C., Patterson M.S. (2008) "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy" *Physical and Medical Biology*, 53, R61–R109.
- Wu Y.T., Nitsche J.M. (1995) "On diffusion-limited site-specific association processes for spherical and nonspherical molecules" *Chemical Engineering Science*, 50, 1467-1487.
- Zhou H.X., (1993) "Brownian Dynamics Study of the Influences of Electrostatic Interaction and Diffusion on Protein-Protein Association Kinetics" *Biophysical Journal*, 64, 1711-1726.

## Remerciements

Les auteurs remercient très sincèrement Aurélie Stallivieri pour son travail de synthèse et pour les expériences de fluorescence résolue dans le temps avec des solvants dont la viscosité a été variée. Ils remercient également les évaluateurs de cet article pour leurs conseils encourageants et positifs d'amélioration significative de ce dernier.