

## APPLICATION DE LA FLUORIMÉTRIE DE PHASE À L'ÉTUDE DES INTERACTIONS SOLUTÉ-SOLVANT DE QUATRE AMINO-9 ACRIDINES SUBSTITUÉES

ALAIN MARTY et PIERRE VIALLET

*Laboratoire de Chimie Physique, Université de Perpignan, avenue de Villeneuve, 66025 Perpignan Cédex (France)*

MADELEINE BOURDEAUX et MONIQUE DELL'AMICO

*Laboratoire de Physique Pharmaceutique, Unité d'Enseignement et de Recherche de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cédex 4 (France)*

(Reçu le 28 février 1984; révisé le 1<sup>er</sup> juin 1984)

### Résumé

Les durées de vie de fluorescence apparentes de l' amino-9 acridine, de l'atébrine et de deux de ses homologues (l' amino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine et le *n*-butylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine) ont été mesurées par fluorimétrie de phase, dans un solvant visqueux (mélange eau-glycérol) et dans un solvant peu visqueux (mélange eau-éthanol). Les résultats obtenus font apparaître une réorientation des molécules de solvant autour de la molécule de soluté après excitation provoquant une stabilisation de l'état excité du fluorophore.

En milieu visqueux, la fluorescence de l'atébrine et de ses deux dérivés peut être considérée comme émise simultanément par deux états F et R dont le second (R) est peuplé par l'intermédiaire du premier (F). La durée de vie de ces deux états a été déterminée pour chaque composé. Le spectre de fluorescence obtenu sous régime stationnaire a été résolu en la fluorescence émise par chacun des deux états.

Dans ce même milieu, la fluorescence de l' amino-9 acridine n'est émise que par un état de type R. Cependant, le processus est suffisamment lent pour être décelé par fluorimétrie de phase. La durée de vie de fluorescence de chacun des deux états a été déterminée.

En milieu de plus faible viscosité la fluorescence des quatre composés n'est émise que par un état de type R et le processus est trop rapide pour être décelé par fluorimétrie de phase. Les mesures ne permettent, alors, que de déterminer la durée de vie de fluorescence de l'état R.

### Summary

The apparent lifetimes of 9-aminoacridine, of atebtrin and of two of its derivatives (9-amino-2-methoxy-6-chloroacridine and 9-*n*-butylamino-2-

methoxy-6-chloroacridine) have been measured by phase modulation fluorometry in a glycerol-water mixture (high viscosity) and an ethanol-water mixture (low viscosity). Results are easily interpreted in terms of a relaxation of the first singlet excited state involving a rearrangement of solvent molecules before excitation.

In the glycerol-water mixture, the stationary fluorescence spectra of atebirin and its two derivatives can be resolved into fluorescence spectra emitted by the relaxed state and fluorescence spectra emitted by the unrelaxed state. For each compound the lifetimes of these two states have been calculated.

In the same solvent mixture the origin of 9-aminoacridine fluorescence is the relaxed state alone. However, the relaxation process is slow enough to be detected by phase modulation fluorometry. The lifetimes of the relaxed and unrelaxed states are still accessible.

In the ethanol-water mixture this is no longer true. For each compound under study the origin of the fluorescence is still the relaxed state but the relaxation process is so rapid, compared with the deactivation processes, that it can no longer be detected by phase modulation techniques. In this case, only the lifetime characteristic of the relaxed state is accessible.

---

## 1. Introduction

Les résultats exposés dans des publications précédentes [1, 2] ont permis de répartir les interactions soluté-solvant de dérivés de l'amino-9 acridine en trois classes: (1) les interactions faisant intervenir la polarité et la polarisabilité des molécules de solvant et de soluté; (2) les interactions provenant de la formation de liaisons hydrogène pour lesquelles l'atome d'azote pyridinique joue le rôle d'accepteur de proton et la molécule de solvant celui de donneur de proton; (3) les interactions provenant de la formation de liaisons hydrogène pour lesquelles le groupement amino joue le rôle de donneur de proton et la molécule de solvant celui d'accepteur de proton.

L'utilisation du formalisme de Kamlet *et al.* [3] permet de déterminer l'influence de chaque type d'interaction sur la position des spectres électroniques. Ainsi l'étude comparative des déplacements des spectres d'absorption et de fluorescence dans divers solvants peut s'interpréter par des différences de solvation entre l'état d'équilibre fondamental et l'état d'équilibre excité des amino-9 acridines [1, 2], c'est-à-dire par une réorganisation des molécules de solvant autour de la molécule de soluté dans l'état excité, entraînant une plus grande stabilité de cet état. Ce phénomène peut être décelé par fluorimétrie de phase lorsqu'il s'effectue avec une vitesse comparable à celles des divers processus de désactivation de l'état excité [4 - 6].

Nous avons donc entrepris une étude par fluorimétrie de phase de l'émission de l'amino-9 acridine (9AA), de l'amino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (ACMA), du *n*-butylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (BCMA)

et du (*N,N*-diéthylamino-4' méthyl-1' *n*-butylamino)-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (atébrine). Dans cet article, nous présentons les résultats obtenus lorsque ces composés sont sous forme de molécule neutre dans un solvant peu visqueux (mélange eau-éthanol) ou dans un solvant plus visqueux (mélange eau-glycérol).

## 2. Partie expérimentale

La 9AA et l'atébrine sous forme de chlorhydrate sont respectivement des produits Fluka et Merck. L'ACMA et le BCMA ont été synthétisés au laboratoire du Dr. Pierre Jacquignon de l'Institut des Substances Naturelles de Gif sur Yvette.

Ces composés possèdent plusieurs sites de protonation et selon l'acidité ou la basicité du milieu la fluorescence peut être émise par le dication, le monocation, la molécule neutre ou l'anion [7, 8].

L'ACMA est insoluble dans l'eau pure. C'est pourquoi nous avons choisi comme solvant peu visqueux un mélange eau-éthanol (80%:20% en volume). Le pH de ce mélange était ajusté à une valeur telle que la molécule neutre fût la seule forme existante ou pour le moins prépondérante dans l'état électronique fondamental comme dans l'état excité [7, 8], à savoir, pH 11,2 pour la 9AA, pH 11 pour l'ACMA et pH 10 pour le BCMA. Pour l'atébrine la solution était à pH 10,3; à ce pH une fraction du composé est protonée sur l'azote porteur des deux groupements éthyle mais cette protonation ne perturbe en rien les spectres électroniques ou le rendement quantique de fluorescence de la forme moléculaire [8].

Comme solvant visqueux nous avons utilisé un mélange eau-glycérol (12%:88% en volume). Les interactions soluté-solvant sont donc du même type que celles intervenant dans le mélange eau-éthanol. En outre les mélanges eau-glycérol étaient ajustés, goutte à goutte, avec une solution de soude 1 N, de façon à ce que les spectres d'absorption et de fluorescence des différents produits fussent identiques à ceux obtenus dans le mélange eau-éthanol.

Ce sont donc les propriétés de la forme moléculaire des quatre amino-9 acridines qui ont été étudiées.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un fluorimètre Jobin et Yvon 3D, ceux d'absorption sur un spectrophotomètre Uvikon 820.

Les mesures de fluorimétrie de phase ont été effectuées sur un appareil SLM 4800. Le retard de phase  $\phi$  et le facteur de démodulation  $m$  étaient mesurés à  $21 \pm 0,5$  °C en utilisant une suspension de glycogène comme référence. La densité optique de chaque solution était ajustée à 0,1 - 0,2 à la longueur d'onde d'excitation. Les corrections de réponse du photomultiplicateur en fonction de la longueur d'onde ont été effectuées selon la méthode préconisée par Jameson et Weber [9]. Des mesures de contrôle ont été réalisées selon la technique de Spencer et Weber [10] pour vérifier que le mouvement brownien de rotation ne modifie pas les grandeurs mesurées.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Influence de la viscosité sur les spectres de fluorescence

La réorientation des molécules de solvant autour d'une molécule de soluté excitée intervient certainement par une suite discrète d'événements successifs constitués par la réorientation et le réarrangement de chacune des molécules de solvant impliquées. La fluorescence observée résulte alors de l'émission à partir d'une multitude d'états stabilisés les uns par rapport aux autres au fur et à mesure que la relaxation de la cage de solvant se poursuit [11, 12]. Cependant, il est rare que l'on puisse disposer d'informations expérimentales permettant d'utiliser un tel modèle. Il est donc nécessaire de recourir à un deuxième modèle beaucoup moins ambitieux mais compatible avec la nature des données expérimentales [13 - 16]. Dans ce modèle deux états excités seulement sont considérés. Le premier (schématisé par F sur la Fig. 1) est responsable de la fluorescence lorsque la relaxation n'a pas lieu. Le deuxième (schématisé par R sur la Fig. 1) est responsable de la fluorescence lorsque la relaxation est totale.

L'étude théorique effectuée par Lakowicz et Balter [13] montre que les deux modèles prévoient à quelques détails près les mêmes types de résultats lorsque le phénomène est étudié par fluorimétrie de phase.

Sur la Fig. 2 sont représentés les spectres de fluorescence du BCMA dans le cyclohexane, dans le glycérol à  $\theta = 5^\circ\text{C}$  et  $\theta = 21^\circ\text{C}$  et dans un mélange eau-éthanol (80%:20% en volume). On constate un glissement vers les grandes longueurs d'onde lorsqu'on compare l'effet du premier solvant

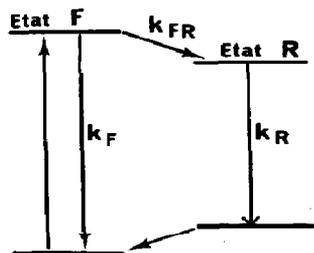


Fig. 1. Diagramme énergétique des états non relaxé (état F) et relaxé (état R).

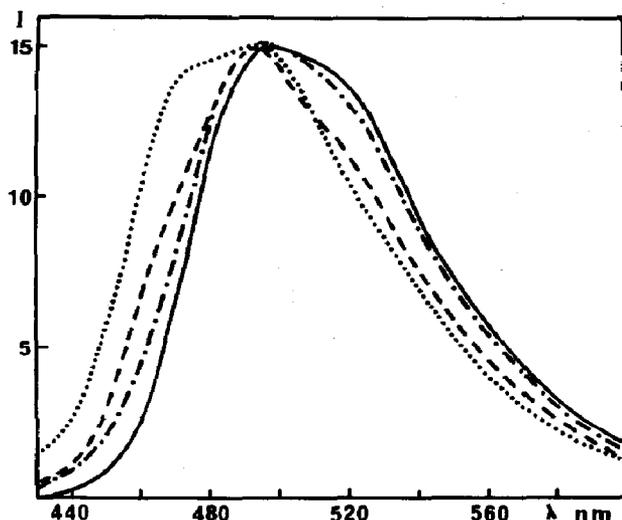


Fig. 2. Spectres de fluorescence normalisés (unité d'intensité arbitraire) du BCMA dans le cyclohexane (.....), le glycérol à  $\theta = 5^\circ\text{C}$  (---), le glycérol à  $\theta = 21^\circ\text{C}$  (-·-) et le mélange eau-éthanol (—).

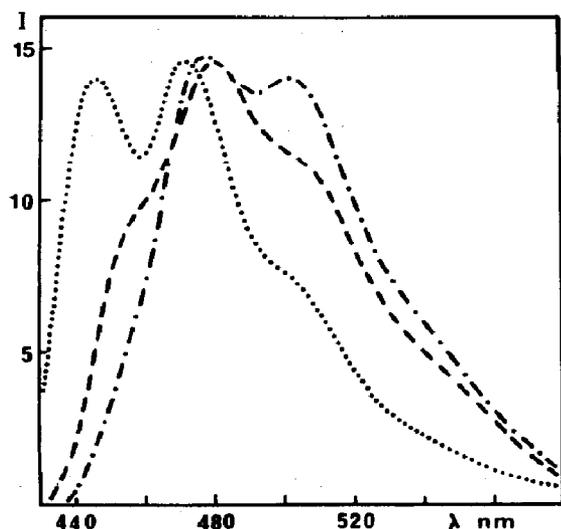


Fig. 3. Spectres de fluorescence normalisés (unité d'intensité arbitraire) de l'ACMA dans le cyclohexane (.....), le glycérol à  $\theta = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (---) et le glycérol à  $\theta = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$  (- · -).

à celui du deuxième puis du troisième. Ceci est également illustré dans le cas de l'ACMA sur la Fig. 3 et peut être interprété comme suit.

Dans le cas du cyclohexane les interactions avec le soluté sont pratiquement inexistantes et il paraît raisonnable de supposer que la solvation de l'état excité est identique à celle de l'état fondamental. La fluorescence est alors émise par un état de type F (selon la nomenclature de Lakowicz et Balter [13]).

Dans le mélange eau-éthanol, en raison de la faible viscosité du milieu, la réorientation des molécules de solvant doit être très rapide. La fluorescence est alors émise par un état de type R (selon la nomenclature de Lakowicz et Balter [13]).

Dans le glycérol, la viscosité est plus élevée et augmente lorsque la température diminue, et la réorientation des molécules de solvant s'effectue à une vitesse plus lente. On peut supposer que certaines molécules de fluorophore se désactivent à partir d'un état de type F, d'autres à partir d'un état de type R [4, 5].

Avant d'examiner les résultats obtenus par fluorimétrie de phase quelques rappels théoriques nous semblent nécessaires.

### 3.2. Rappels théoriques

En fluorimétrie de phase, la fluorescence de l'échantillon excitée par une radiation

$$I_{\text{ex}}(t) = A + B \sin \omega t$$

est de la forme

$$I_{\text{em}}(t) = A' + B' \sin(\omega t - \phi)$$

où  $\omega = 2\pi\nu$  ( $\nu$  étant la fréquence de modulation).

En effet, du fait de la durée de vie de l'état excité, la radiation émise subit un retard de phase  $\phi$  et une démodulation  $m$  ( $m = B'A/A'B$ ) par rapport à la lumière excitatrice.

A partir des deux grandeurs observables  $m$  et  $\phi$  on définit deux paramètres:

$$\tau_\phi = \frac{1}{\omega} \tan \phi \quad (1)$$

$$\tau_m = \frac{1}{\omega} \left( \frac{1}{m^2} - 1 \right)^{1/2} \quad (2)$$

Si la fluorescence observée est la superposition de celles émises simultanément par deux états excités dont l'un (R) est peuplé par l'intermédiaire de l'autre (F) selon un processus schématisé sur la Fig. 1, on peut écrire [13, 17]

$$\tau_\phi = \frac{\alpha \tau_F (1 + \omega^2 \tau_R^2) + (1 - \alpha)(\tau_F + \tau_R)}{\alpha(1 + \omega^2 \tau_R^2) + (1 - \alpha)(1 - \omega^2 \tau_F \tau_R)} \quad (3)$$

$$\tau_m = \left( \frac{\tau_F^2 \tau_R^2 \omega^2 + \tau_F^2 + \tau_R^2 - \alpha^2 \tau_R^2}{1 + \alpha^2 \tau_R^2 \omega^2} \right)^{1/2} \quad (4)$$

Dans les formules (3) et (4)  $\tau_F$  et  $\tau_R$  sont les durées de vie de fluorescence des états F et R:

$$\tau_F = 1/(k_F + k_{FR})$$

$$\tau_R = 1/k_R$$

$k_F$  et  $k_R$  représentent la somme des constantes de vitesse des désactivations (radiatives et non radiatives) des états F et R,  $k_{FR}$  la constante de vitesse de la transformation de l'état F en l'état R. Les deux fluorescences des états F et R pourront être examinées simultanément si la valeur de  $k_{FR}$  n'est ni trop grande ni trop faible devant la valeur de  $k_F$ .

$\alpha$  ( $= I_F/(I_F + I_R)$ ) est un paramètre qui mesure la contribution de l'état F à la fluorescence totale observée à une longueur d'onde donnée. Sa valeur ne dépend que de la longueur d'onde d'observation.

Dans la pratique on étudie souvent le rapport  $m/\cos \phi$  qui permet de comparer les grandeurs directement observables. Dans le cas qui nous intéresse (Fig. 1), il s'exprime [13, 17]

$$\frac{m}{\cos \phi} = \frac{1 + \alpha^2 \omega^2 \tau_R^2}{\alpha \omega^2 \tau_R (\tau_F + \tau_R) + (1 - \omega^2 \tau_F \tau_R)} \quad (5)$$

L'étude des trois fonctions  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos \phi$  en fonction de  $\omega$  et  $\alpha$  permet de prévoir leurs sens de variation avec la fréquence de modulation d'une part et la longueur d'onde d'observation d'autre part. Les principaux résultats obtenus sont [17] les suivants: (i) du côté des courtes longueurs d'onde (pour  $\alpha > \tau_F/\tau_R$ ),  $\tau_\phi < \tau_m$ ,  $m/\cos \phi < 1$  et  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  diminuent lorsque

la fréquence de modulation augmente; (ii) du côté des grandes longueurs d'onde (pour  $\alpha < \tau_F/\tau_R$ ),  $\tau_\phi > \tau_m$ ,  $m/\cos \phi > 1$  et  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  augmentent lorsque la fréquence de modulation augmente; (iii) enfin lorsque  $\alpha = \tau_F/\tau_R$  on a  $\tau_\phi = \tau_m = \tau_R$  et  $m/\cos \phi = 1$  quelle que soit la fréquence de modulation.

### 3.3. Résultats obtenus par fluorimétrie de phase

Dans les Tableaux 1 - 4 sont rassemblés les résultats obtenus par fluorimétrie de phase. Dans chaque tableau figurent les valeurs de  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos \phi$  mesurées pour un produit donné dans les mélanges eau-éthanol et eau-glycérol à trois fréquences de modulation et à différentes longueurs d'onde d'observation.

TABLEAU 1

Valeur des durées de vie apparentes de l'ACMA mesurées par fluorimétrie de phase dans les mélanges eau-éthanol et eau-glycérol

|   | $\nu = 30 \text{ MHz}$ |                  |               | $\nu = 18 \text{ MHz}$ |                  |               | $\nu = 6 \text{ MHz}$ |                  |               |
|---|------------------------|------------------|---------------|------------------------|------------------|---------------|-----------------------|------------------|---------------|
|   | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos \phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos \phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)   | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos \phi$ |
| $\lambda_{\text{obs}} = 440 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-glycérol                    | 4,8                    | 11,4             | 0,57          | 7,5                    | 13,5             | 0,72          | 11,5                  | 14,8             | 0,95          |
| $\lambda_{\text{obs}} = 460 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 17,2                   | 18,1             | 0,95          | 18,8                   | 17,4             | 1,06          | 18,5                  | 18,1             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 10,3                   | 15,7             | 0,70          | 13,2                   | 16,1             | 0,86          | 15,5                  | 15,9             | 0,99          |
| $\lambda_{\text{obs}} = 480 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 18,2                   | 17,8             | 1,02          | 18,1                   | 18,3             | 0,99          | 18,7                  | 18,2             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 18,1                   | 17,8             | 1,02          | 17,7                   | 16,9             | 1,04          | 16,8                  | 16,1             | 1,01          |
| $\lambda_{\text{obs}} = 500 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 17,9                   | 18,2             | 0,99          | 17,5                   | 17,9             | 0,98          | 17,9                  | 17,5             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 20,1                   | 18,0             | 1,11          | 18,7                   | 17,0             | 1,08          | 17,1                  | 16,2             | 1,02          |
| $\lambda_{\text{obs}} = 520 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 19,0                   | 18,6             | 1,02          | 19,2                   | 18,3             | 1,04          | 18,6                  | 17,9             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 21,1                   | 17,8             | 1,17          | 19,8                   | 17,0             | 1,13          | 17,7                  | 16,5             | 1,02          |
| $\lambda_{\text{obs}} = 540 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 18,5                   | 18,2             | 1,02          | 18,7                   | 17,9             | 1,04          | 18,5                  | 17,8             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 22,7                   | 17,8             | 1,26          | 20,3                   | 17,0             | 1,16          |                       |                  |               |
| $\lambda_{\text{obs}} = 560 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 18,6                   | 18,1             | 1,03          | 17,9                   | 18,3             | 0,98          | 18,7                  | 18,3             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 20,4                   | 17,2             | 1,17          | 19,7                   | 17,0             | 1,13          |                       |                  |               |
| $\lambda_{\text{obs}} = 575 \text{ nm}$ |                        |                  |               |                        |                  |               |                       |                  |               |
| Mélange eau-éthanol                     | 18,8                   | 18,4             | 1,02          | 19,2                   | 18,2             | 1,04          | 18,6                  | 18,1             | 1,01          |
| Mélange eau-glycérol                    | 24,7                   | 16,6             | 1,45          | 19,4                   | 17,0             | 1,11          |                       |                  |               |

TABLEAU 2

Valeur des durées de vie apparentes du BCMA mesurées par fluorimétrie de phase dans les mélanges eau-éthanol et eau-glycérol

|   | $\nu = 30 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 18 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 6 \text{ MHz}$ |                  |              |
|---|------------------------|------------------|--------------|------------------------|------------------|--------------|-----------------------|------------------|--------------|
|   | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)   | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ |
| $\lambda_{\text{obs}} = 460 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 5,5                    | 11,9             | 0,59         | 8,2                    | 12,4             | 0,79         | 12,5                  | 14,5             | 0,97         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 480 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 11,4                   | 11,6             | 0,99         | 11,6                   | 12,3             | 0,96         | 12,3                  | 12,8             | 0,99         |
| Mélange eau-glycérol                    | 11,5                   | 14,1             | 0,84         | 12,8                   | 13,7             | 0,96         | 14,0                  | 13,9             | 1,00         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 500 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 12,6                   | 11,9             | 1,05         | 12,2                   | 12,1             | 1,01         | 12,6                  | 12,8             | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 14,6                   | 14,4             | 1,01         | 14,4                   | 13,8             | 1,03         | 14,5                  | 13,9             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 520 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 16,8                   | 14,5             | 1,14         | 15,0                   | 13,9             | 1,06         | 14,7                  | 14,0             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 540 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 17,3                   | 14,2             | 1,19         | 15,9                   | 13,8             | 1,11         | 15,0                  | 14,2             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 560 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 13,0                   | 11,7             | 1,09         | 12,5                   | 12,5             | 1,00         | 12,6                  | 12,9             | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 17,4                   | 14,5             | 1,18         | 16,4                   | 14,1             | 1,12         | 14,7                  | 13,9             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 575 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 20,9                   | 14,1             | 1,43         | 16,1                   | 14,7             | 1,07         | 14,4                  | 13,5             | 1,01         |

### 3.3.1. Résultats obtenus dans le mélange eau-glycérol pour l'ACMA, le BCMA et l'atébrine

Lorsque pour une fréquence de modulation fixée on augmente la longueur d'onde d'observation on constate que la valeur de  $\tau_\phi$  croît de même que celle de  $\tau_m$  bien que de façon moins sensible (Tableaux 1 - 3).

Par ailleurs, du côté des courtes longueurs d'onde  $\tau_\phi < \tau_m$  et  $m/\cos\phi < 1$  quelle que soit la fréquence de modulation utilisée. En outre,  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos\phi$  diminuent lorsque cette même fréquence augmente.

Au contraire, du côté des grandes longueurs d'onde d'observation  $\tau_\phi > \tau_m$  et  $m/\cos\phi > 1$  quelle que soit la fréquence de modulation utilisée. En outre,  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos\phi$  augmentent avec cette même fréquence.

Ces observations sont en accord avec les prévisions théoriques concernant l'émission simultanée de deux états F et R dont l'un (R) est peuplé par l'intermédiaire de l'autre (F).

La présence de glycérol a pour effet d'augmenter la viscosité du milieu et de diminuer la vitesse du réarrangement des molécules de solvant après excitation. Parmi les molécules de fluorophore une partie fluoresce avant que la stabilisation de l'état excité ne soit effective tandis que l'autre partie fluoresce après stabilisation.

TABLEAU 3

Valeur des durées de vie apparentes de l'atébrine mesurées par fluorimétrie de phase dans les mélanges eau-éthanol et eau-glycérol

|   | $\nu = 30 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 18 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 6 \text{ MHz}$ |                  |              |
|---|------------------------|------------------|--------------|------------------------|------------------|--------------|-----------------------|------------------|--------------|
|   | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)   | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ |
| $\lambda_{\text{obs}} = 460 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 4,8                    | 9,2              | 0,67         | 6,4                    | 10,2             | 0,81         | 8,6                   | 11,2             | 0,97         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 480 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 9,1                    | 10,0             | 0,93         | 8,7                    | 9,3              | 0,97         | 9,3                   | 10,2             | 0,99         |
| Mélange eau-glycérol                    | 8,7                    | 11,2             | 0,82         | 9,9                    | 11,7             | 0,90         | 11,0                  | 11,6             | 0,99         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 500 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 9,8                    | 8,9              | 1,07         | 9,4                    | 9,4              | 1,00         | 9,7                   | 9,9              | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 11,6                   | 12,1             | 0,97         | 11,9                   | 12,0             | 0,99         | 11,9                  | 11,9             | 1,00         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 520 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 10,1                   | 10,1             | 1,00         | 10,1                   | 10,8             | 0,96         | 9,8                   | 10,3             | 0,99         |
| Mélange eau-glycérol                    | 13,9                   | 12,2             | 1,12         | 12,8                   | 12,2             | 1,03         | 12,3                  | 11,6             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 540 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 9,7                    | 9,2              | 1,04         | 9,8                    | 9,6              | 1,01         | 10,0                  | 9,8              | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 16,3                   | 12,3             | 1,28         | 13,4                   | 12,4             | 1,05         | 12,4                  | 11,8             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 560 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 17,8                   | 12,6             | 1,36         | 14,4                   | 12,6             | 1,10         | 12,5                  | 11,9             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 575 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 9,6                    | 9,1              | 1,04         | 9,4                    | 9,7              | 0,98         | 9,9                   | 9,8              | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 18,9                   | 12,7             | 1,43         | 14,9                   | 12,5             | 1,13         | 12,9                  | 11,7             | 1,02         |

Pour chacun des trois produits considérés il existe une longueur d'onde (voisine de 480 - 500 nm) pour laquelle  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  sont égaux (et  $m/\cos\phi = 1$ ) et gardent une valeur constante quelle que soit la fréquence de modulation utilisée. L'étude des variations des fonctions  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  montre que cette longueur d'onde est celle pour laquelle  $\alpha = \tau_F/\tau_R$  et qu'alors  $\tau_\phi = \tau_m = \tau_R$  [17].

Les résultats des Tableaux 1 - 3 permettent donc de déduire la durée de vie de fluorescence de l'état stabilisé par la réorientation des molécules de solvant. Les valeurs approximatives sont  $\tau_R = 16,5$  ns pour l'ACMA,  $\tau_R = 14,0$  ns pour le BCMA et  $\tau_R = 12,0$  ns pour l'atébrine. On peut alors pour chaque composé calculer la valeur de  $k_R$  dans le mélange eau-glycérol (Tableau 5).

Les valeurs de  $\tau_R$  étant déterminées, on dispose de deux équations (éqns. (3) et (4)) comportant, pour une fréquence de modulation et une longueur d'onde d'observation données, deux inconnues  $\alpha$  et  $\tau_F$  qui peuvent donc être calculées. Ces deux équations peuvent se mettre sous la forme

$$\alpha = \frac{A\tau_F + \tau_1}{\tau_2\tau_F + A\tau_R} \quad (6)$$

TABLEAU 4

Valeur des durées de vie apparentes de la 9AA mesurées par fluorimétrie de phase dans les mélanges eau-éthanol et eau-glycérol

|   | $\nu = 30 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 18 \text{ MHz}$ |                  |              | $\nu = 6 \text{ MHz}$ |                  |              |
|---|------------------------|------------------|--------------|------------------------|------------------|--------------|-----------------------|------------------|--------------|
|   | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)    | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ | $\tau_\phi$<br>(ns)   | $\tau_m$<br>(ns) | $m/\cos\phi$ |
| $\lambda_{\text{obs}} = 440 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-glycérol                    | 15,4                   | 13,8             | 1,10         | 14,9                   | 13,6             | 1,07         | 13,9                  | 14,9             | 1,01         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 460 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 14,8                   | 15,1             | 0,98         | 14,6                   | 15,3             | 0,97         | 15,4                  | 14,9             | 1,01         |
| Mélange eau-glycérol                    | 15,8                   | 14,2             | 1,10         | 15,4                   | 13,4             | 1,11         | 14,0                  | 12,9             | 1,02         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 480 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 15,7                   | 15,1             | 1,03         | 14,9                   | 15,2             | 0,98         | 15,6                  | 14,9             | 1,01         |
| Mélange eau-glycérol                    | 17,4                   | 14,0             | 1,22         | 16,1                   | 13,5             | 1,14         | 14,1                  | 13,0             | 1,02         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 500 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 15,5                   | 15,0             | 1,03         | 14,4                   | 15,3             | 0,96         | 15,6                  | 15,0             | 1,01         |
| Mélange eau-glycérol                    | 15,6                   | 13,9             | 1,11         | 15,3                   | 13,4             | 1,10         | 13,9                  | 12,7             | 1,02         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 520 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 15,3                   | 15,2             | 1,01         | 15,3                   | 15,5             | 0,99         | 15,6                  | 15,0             | 1,01         |
| Mélange eau-glycérol                    | 16,1                   | 14,0             | 1,13         | 15,5                   | 13,6             | 1,10         | 14,1                  | 12,8             | 1,02         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 540 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 17,5                   | 14,8             | 1,16         | 14,8                   | 15,4             | 0,97         | 15,4                  | 14,7             | 1,01         |
| Mélange eau-glycérol                    | 15,6                   | 13,9             | 1,11         | 15,2                   | 14,1             | 1,06         | 13,7                  | 13,4             | 1,00         |
| $\lambda_{\text{obs}} = 560 \text{ nm}$ |                        |                  |              |                        |                  |              |                       |                  |              |
| Mélange eau-éthanol                     | 15,3                   | 15,3             | 1,00         | 14,8                   | 14,9             | 0,99         | 14,9                  | 14,8             | 1,00         |
| Mélange eau-glycérol                    | 15,4                   | 14,0             | 1,09         | 15,7                   | 13,9             | 1,09         | 13,9                  | 13,3             | 1,01         |

$$B\tau_2^2\tau_F^4 + 2AB\tau_2\tau_R\tau_F^3 + (A^2\omega^2\tau_R^2 + \tau_2^2)\tau_3\tau_F^2 + 2A\tau_R(\tau_2\tau_3 - C\tau_1\tau_R)\tau_F + (A^2\tau_3 - C\tau_1^2)\tau_R^2 = 0 \quad (7)$$

avec

$$A = 1 + \omega^2\tau_R\tau_\phi$$

$$\tau_1 = \tau_R - \tau_\phi$$

$$B = 1 + \omega^2\tau_R^2$$

$$\tau_2 = (\tau_\phi - \tau_R)\omega^2\tau_R$$

$$C = 1 + \omega^2\tau_m^2$$

$$\tau_3 = \tau_R^2 - \tau_m^2$$

Dans le Tableau 6 nous avons rassemblé les valeurs de  $\alpha$  obtenues dans le cas de l'atébrine pour chacune des longueurs d'onde examinées aux fréquences de modulation 30 et 18 MHz. Pour obtenir ces valeurs, nous avons tout d'abord calculé  $\tau_F$  en prenant  $\tau_R = 12,0$  ns et en résolvant l'éqn. (7). La valeur moyenne de  $\tau_F$  est alors  $2,1 \pm 0,8$  ns. Nous avons ensuite calculé, à l'aide de l'éqn. (6), la valeur de  $\alpha$  pour chaque longueur d'onde.

TABLEAU 5

Valeurs des différentes constantes de désactivation déterminées dans le cyclohexane, dans le mélange eau-éthanol et dans le mélange eau-glycérol

|   | 9AA | ACMA | BCMA | Atébrine |
|---|-----|------|------|----------|
| $k_F \times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$            |     |      |      |          |
| Dans le cyclohexane                                     | —   | 1,6  | 5,6  | 6,2      |
| $k_R \times 10^{-7} \text{ (s}^{-1}\text{)}$            |     |      |      |          |
| Dans le mélange eau-éthanol                             | 6,6 | 5,5  | 8,1  | 10,3     |
| Dans le mélange eau-glycérol                            | 7,4 | 6,1  | 7,1  | 8,3      |
| $(k_F + k_{FR}) \times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ |     |      |      |          |
| Dans le mélange eau-glycérol                            | 20  | 2,9  | 7,1  | 4,8      |

TABLEAU 6

Valeurs de  $\alpha$  obtenues pour l'atébrine par résolution des éqns. (6) et (7)

| $\nu \text{ (MHz)}$ | $\alpha$ |        |        |        |        |        |        |
|---------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                     | 460 nm   | 480 nm | 500 nm | 520 nm | 540 nm | 560 nm | 575 nm |
| 30                  | 0,45     | 0,25   | 0,18   | 0,15   | 0,12   | 0,11   | 0,10   |
| 18                  | 0,44     | 0,25   | 0,18   | 0,15   | 0,14   | 0,11   | 0,10   |

Les calculs ont été effectués en prenant  $\tau_R = 12,0 \text{ ns}$  et  $\tau_F = 2,1 \text{ ns}$ .

Connaissant les différentes valeurs de  $\alpha$  on peut décomposer le spectre de fluorescence obtenu sous régime stationnaire en fluorescence émise par l'état F et en celle émise par l'état R (Fig. 4).

Sur les Figs. 5 et 6 sont représentés les spectres obtenus de façon similaire pour le BCMA et l'ACMA. Les résolutions de spectre ont été effec-

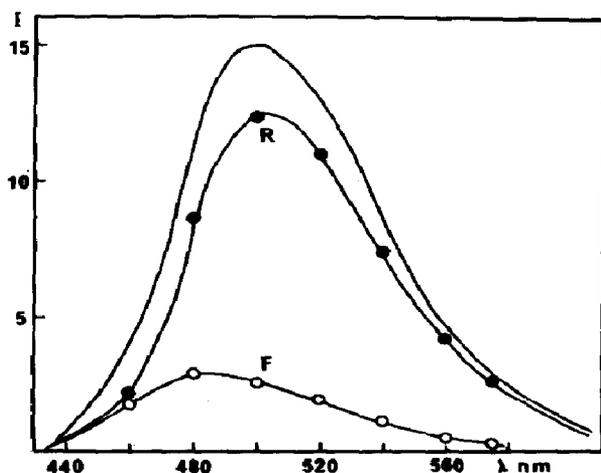


Fig. 4. Résolution du spectre de fluorescence de l'atébrine dans le mélange eau-glycérol (unité d'intensité arbitraire) en fluorescence émise par l'état F et en celle émise par l'état R.

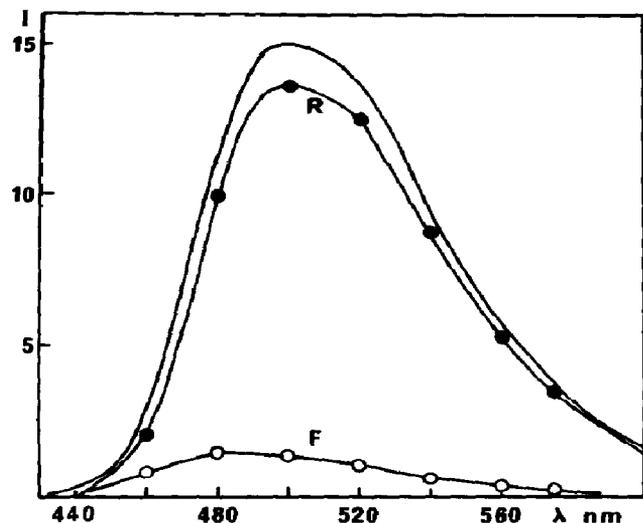


Fig. 5. Résolution du spectre de fluorescence du BCMA dans le mélange eau-glycérol (unité d'intensité arbitraire) en fluorescence émise par l'état F et en celle émise par l'état R.

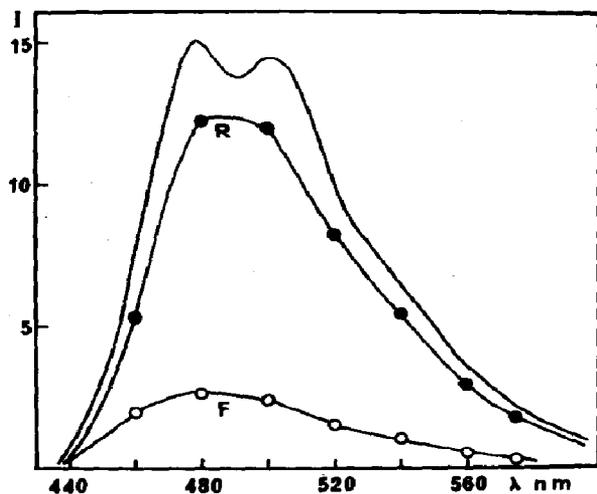


Fig. 6. Résolution du spectre de fluorescence de l'ACMA dans le mélange eau-glycérol (unité d'intensité arbitraire) en fluorescence émise par l'état F et en celle émise par l'état R. La résolution a été effectuée sans tenir compte de la structure du spectre.

tuées en utilisant pour  $\tau_R$  et  $\tau_F$  les valeurs respectives de 14,0 et 1,5 ns pour le BCMA, et de 16,5 et 3,4 ns pour l'ACMA.

Comme  $\tau_F = 1/(k_F + k_{FR})$ , on peut pour chaque composé calculer la somme des constantes de désactivation de l'état F dans le mélange eau-glycérol.

Dans le Paragraphe 3.1 nous avons émis l'hypothèse que la fluorescence est émise par un état de type F lorsque le solvant utilisé est le cyclohexane. La mesure de la durée de vie de la fluorescence des différents produits ( $\tau_F =$

6,2 ns pour l'ACMA,  $\tau_F = 1,8$  ns pour le BCMA et  $\tau_F = 1,6$  ns pour l'atébrine) permet de calculer la valeur de  $k_F$  dans ce solvant.

L'ensemble de ces résultats figure dans le Tableau 5. Il apparaît dans le cas de l'atébrine que la valeur de  $k_F$  dans le cyclohexane est supérieure à celle de  $k_F + k_{FR}$  dans le mélange eau-glycérol. Ceci indique que  $k_F$  est fonction du solvant utilisé et en particulier de la nature des interactions soluté-solvant.

### 3.3.2. Résultats obtenus pour la 9AA dans le mélange eau-glycérol

Les valeurs de  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos \phi$  sont rassemblées dans le Tableau 4 et leurs variations en fonction de la fréquence de modulation et de la longueur d'onde d'observation diffèrent de celles obtenues pour les autres composés.

En effet, pour une fréquence de modulation donnée, les valeurs de  $\tau_\phi$ ,  $\tau_m$  et  $m/\cos \phi$  sont pratiquement indépendantes de la longueur d'onde d'observation. En outre, quelles que soient la fréquence de modulation et la longueur d'onde d'observation  $\tau_\phi > \tau_m$  et  $m/\cos \phi > 1$ .

Ces résultats sont caractéristiques du cas où la fluorescence est émise par un seul état (R) peuplé par l'intermédiaire d'un autre état (F) directement excité par absorption lumineuse (éqns. (3), (4) et (5), cas  $\alpha = 0$ ).

Lorsque la 9AA est dissoute dans un mélange eau-glycérol, le réarrangement des molécules de solvant après excitation a le temps de s'effectuer avant que l'émission de fluorescence n'intervienne.

Les valeurs de  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  figurant dans le Tableau 4 permettent de calculer par les formules (3) et (4) avec  $\alpha = 0$  les durées de vie des deux états F et R. Ainsi pour les trois fréquences 30, 18 et 6 MHz on obtient respectivement  $\tau_F = 0,2$  ns et  $\tau_R = 14,0$  ns,  $\tau_F = 0,5$  ns et  $\tau_R = 13,6$  ns,  $\tau_F = 0,7$  ns et  $\tau_R = 13,0$  ns, soit les valeurs moyennes  $\tau_F = 0,5 \pm 0,3$  ns et  $\tau_R = 13,5 \pm 0,5$  ns. On peut alors déterminer la somme des constantes de désactivation des deux états F et R de la 9AA dans le mélange eau-glycérol (Tableau 5).

### 3.3.3. Résultats obtenus dans le mélange eau-éthanol

Pour chaque composé étudié dans le mélange eau-éthanol, les valeurs de  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  sont voisines et pratiquement constantes quelles que soient la fréquence de modulation et la longueur d'onde d'observation. Par conséquent, la valeur de  $m/\cos \phi$  est toujours proche de l'unité. Ceci veut dire que, dans les conditions expérimentales, les valeurs de  $\tau_\phi$  et  $\tau_m$  mesurent, pour chaque composé, la durée de vie de l'état responsable de la fluorescence.

Ces résultats sont *a priori* caractéristiques du cas où la fluorescence est émise par un seul état directement excité (éqns. (3), (4) et (5) avec  $\alpha = 1$ ). Or nous avons supposé au Paragraphe 3.1 qu'en fait l'état responsable de la fluorescence est un état de type R.

Les résultats obtenus par fluorimétrie de phase semblent donc en contradiction avec l'hypothèse émise. Nous allons montrer que tel n'est pas le cas.

En effet, lorsque la constante de vitesse  $k_{FR}$  est très grande (cas du mélange eau-éthanol) la probabilité d'émission de fluorescence à partir de l'état F est quasiment nulle. Les relations (3) et (4) deviennent

$$\tau_{\phi} = \frac{\tau_F + \tau_R}{1 - \omega^2 \tau_F \tau_R} \quad (3')$$

$$\tau_m = (\tau_R^2 + \tau_F^2 + \omega^2 \tau_F^2 \tau_R^2)^{1/2} \quad (4')$$

Pour les composés étudiés les interactions soluté-solvant dans le mélange eau-éthanol sont du même type que celles intervenant dans le mélange eau-glycérol [1, 2]. Par conséquent, les valeurs de  $k_F$  et  $k_R$  doivent peu varier d'un mélange à l'autre.

Par contre, à cause de la forte augmentation de  $k_{FR}$ , la valeur de  $\tau_F = 1/(k_F + k_{FR})$  dans le premier solvant devient très inférieure à la valeur de  $\tau_F$  dans le second. Il s'ensuit que dans le mélange eau-éthanol  $\tau_F$  peut être négligé devant  $\tau_R$ .

En outre, lorsque  $\tau_R < 20$  ns et  $\tau_F \ll 1,5$  ns et pour les valeurs de  $\omega$  utilisées au plan pratique on a

$$\omega^2 \tau_F \tau_R \ll 1 \quad \omega^2 \tau_F^2 \tau_R^2 \ll \tau_R^2$$

Les formules (3') et (4') deviennent donc  $\tau_{\phi} = \tau_R$  et  $\tau_m = \tau_R$ .

On conçoit donc que dans nos conditions expérimentales, en raison des valeurs respectives de  $\tau_R$  et  $\tau_F$  et de la limite de sensibilité de l'appareil, la mesure permet de déterminer directement  $\tau_R = \tau_{\phi} = \tau_m = 1/k_R$ .

Les différentes valeurs figurant dans les Tableaux 1 - 4 mesurent donc la durée de vie de fluorescence de l'état relaxé dans le mélange eau-éthanol.

La valeur moyenne obtenue pour chaque composé est  $\tau = 15,2 \pm 0,5$  ns pour la 9AA (15,4 ns dans l'eau à pH = 12,7 [18]),  $\tau = 18,3 \pm 0,5$  ns pour l'ACMA (18,7 ns dans le méthanol [19]),  $\tau = 12,3 \pm 0,5$  ns pour le BCMA et  $\tau = 9,7 \pm 0,5$  ns pour l'atébrine (6,9 ns dans le méthanol [19]).

A partir de ces valeurs moyennes on peut calculer, pour chaque composé, la valeur de  $k_R$  (somme des constantes de désactivation de l'état R) dans le mélange eau-éthanol. Les résultats figurent dans le tableau récapitulatif (Tableau 5). Il est à noter que pour chaque molécule la valeur obtenue est voisine de celle calculée pour le mélange eau-glycérol.

#### 4. Conclusion

L'étude des durées de vie apparentes de la 9AA, de l'atébrine et de deux de ses dérivés mesurées par fluorimétrie de phase dans un solvant visqueux (mélange eau-glycérol) permet de mettre en évidence une réorientation des molécules de solvant autour de la molécule de soluté après excitation provoquant une stabilisation de l'état excité du fluorophore.

Ce processus peut être analysé en faisant intervenir deux états excités du fluorophore. Pour le premier état F, la solvation du soluté est identique à celle de l'état fondamental. Pour le second état R, la solvation du soluté est différente de celle de l'état fondamental. L'état R est donc peuplé par l'intermédiaire de l'état F. Les durées de vie apparentes mesurées par fluori-

métrie de phase sont alors fonction des durées de vie  $\tau_F$  et  $\tau_R$  de ces deux états. Cependant, les valeurs mesurées permettent de calculer  $\tau_F$  et  $\tau_R$  ainsi que la participation de la fluorescence émise par chacun des deux états à la fluorescence totale.

Les résultats obtenus au cours de cette étude laissent apparaître la limite de la technique utilisée. En effet, lorsque la constante de vitesse  $k_{FR}$  de la transformation de l'état F en l'état R est très supérieure à la somme des constantes de vitesse des divers processus de désactivation de l'état F (cas du mélange eau-éthanol)  $\tau_F$  devient négligeable devant  $\tau_R$ . La fluorimétrie de phase permet alors de mesurer  $\tau_R$  mais ne permet pas de mettre en évidence le phénomène intervenant dans l'état excité.

## Références

- 1 A. Marty et P. Viallet, *J. Photochem.*, 20 (1982) 213.
- 2 A. Marty et P. Viallet, *C.R. Acad. Sci., Sér. II*, 296 (1983) 343.
- 3 M. J. Kamlet, C. Dickinson et R. W. Taft, *Chem. Phys. Lett.*, 77 (1981) 69.
- 4 J. R. Lakowicz, H. Cherek et D. R. Bevan, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 4403.
- 5 J. R. Lakowicz et H. Cherek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99 (1981) 1173.
- 6 T. V. Veselova, L. A. Limareva, A. S. Cherkasov et V. I. Shirokov, *Opt. Spectrosc. (U.S.S.R.)*, 19 (1965) 39.
- 7 A. C. Capomacchia, J. Casper et S. G. Schulman, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1272.
- 8 A. C. Capomacchia et S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta*, 77 (1975) 79.
- 9 D. M. Jameson et G. Weber, *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 953.
- 10 R. D. Spencer et G. Weber, *J. Chem. Phys.*, 52 (1970) 1654.
- 11 N. G. Bakhshiev, Y. T. Mazurenko et I. V. Piterskaya, *Opt. Spectrosc. (U.S.S.R.)*, 21 (1966) 307.
- 12 R. P. de Toma et L. Brand, *Chem. Phys. Lett.*, 47 (1977) 231.
- 13 J. R. Lakowicz et A. Balter, *Biophys. Chem.*, 16 (1982) 99.
- 14 J. R. Lakowicz et A. Balter, *Photochem. Photobiol.*, 36 (1982) 125.
- 15 J. R. Lakowicz et A. Balter, *Biophys. Chem.*, 15 (1982) 353.
- 16 T. Lai et E. C. Lim, *Chem. Phys. Lett.*, 84 (1981) 303.
- 17 A. Marty, M. Bourdeaux, M. Dell'Amico et P. Viallet, soumis pour publication à *Biophys. Chem.*
- 18 K. Kasama, K. Kikushi, Y. Nishida et H. Kokubun, *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 4148.
- 19 L. J. Cline Love, L. M. Upton et A. W. Ritter III, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 2059.