



HAL
open science

Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques

Pierre-Jean Debouttière

► **To cite this version:**

Pierre-Jean Debouttière. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques. Matériaux. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT : . tel-00194115

HAL Id: tel-00194115

<https://theses.hal.science/tel-00194115>

Submitted on 5 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLÔME DE DOCTORAT
de chimie

(arrêté du 25 avril 2002)

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE DE LYON
SPÉCIALITÉ CHIMIE INORGANIQUE

présentée et soutenue publiquement le 27 juin 2006

par

M. PIERRE-JEAN DEBOUTTIÈRE

TITRE :

ÉLABORATION DE NANOPARTICULES D'OR FONCTIONNALISÉES POUR LA
 DÉTECTION ET L'IMAGERIE BIOLOGIQUES

Directeur de thèse : Pr. Roger LAMARTINE

JURY :

M. Roger Lamartine

Mme. Sylvie Bégin-Colin

M. Frédéric Dallemer

M. Stéphane Daniele, président du jury

M. Francis Vocanson

M. Stéphane Roux

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. J.P. BONHOTAL

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur L. COLLET

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT-LOPEZ

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Pr. Roger Lamartine de m'avoir confié ce travail de thèse et de m'avoir accueilli au sein du SROMB qui a dès le début de ma thèse intégré le « Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement », le Pr. Jean-Marie Herrmann prenant alors la direction. Je tiens d'autre part à remercier ce dernier pour m'avoir permis de terminer ma thèse dans les meilleures conditions.

J'exprime aussi toute ma gratitude au Pr. Sylvie Bégin-Colin, au Pr. Frédéric Dallemer et au Dr Stéphane Daniele d'avoir participé à mon jury de thèse et d'avoir jugé ce travail.

Tous mes remerciements vont aux personnes qui m'ont encadré ou épaulé durant ces quatre années de thèse. S'il est un travail qui ne s'exerce pas seul, c'est bien la recherche scientifique. C'est de la synergie entre les personnes et entre les laboratoires que naissent les projets et les découvertes. Si je suis aujourd'hui le porteur de ce travail, seul auteur, je ne suis que le sommet de la pyramide supporté par tout un édifice ; c'est donc à cet édifice que j'aimerais rendre hommage.

Merci donc au Pr. Olivier Tillement responsable de l'équipe Fennec (Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux luminescents) qui est l'instigateur de ce projet sur les nanoparticules d'or à applications biologiques mais aussi un catalyseur des nanotechnologies par son enthousiasme au sein du laboratoire et l'énergie consacrée pour créer des interactions entre laboratoires, notamment à travers le GDR « Nanohybrides ». Mes remerciements vont aussi à Francis Vocanson, mon responsable N°1, qui m'a « coaché » avec bienveillance tout au long de ma recherche mais aussi durant mes enseignements à l'IUT. Un grand merci à Stéphane Roux dont les grandes compétences et les conseils avisés m'ont été précieux dans l'analyse des résultats et la rédaction du mémoire. Merci à Pascal Perriat pour tout son apport dans la caractérisation des nanoparticules (TEM, DRX). Merci à Christophe Marquette pour sa collaboration précieuse pour les tests sur biopuces.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces quatre années et qui ont égayé chacune de mes journées : à Christian, mon colocataire de bureau et partenaire de football (lyonnais, lyonnais, lyonnais !!!), à l'amical du café de 10 H (Laure, Jana, Hoai, Raph, Fred, Fredo, Carlos, Taïzo, Eric) pour le petit break récréato-instructif, à Lionel (pour tous les coups de mains informatiques), Christine (pour sa disponibilité), aux locataires du Raulin 3 (Caroline, Isabelle, Nathalie, Chantal) pour leur sympathie, aux anciens thésards et D.E.A. (Alexandra, Pascal, Narjes, Fabienne, Roselyne, Hatem, Sofiane), aux membres de l'équipe Fennec (Jean-Luc, Anne-charlotte, Noël, Rana), et tous les membres du LACE que j'ai eu le plaisir de rencontrer.

Je dédie tout spécialement cette thèse à mes parents, qu'ils trouvent là toute ma gratitude pour tout l'amour et l'éducation qu'ils ont su me donner.

A Marie, ma femme, qui m'a encouragé tout au long de ma thèse.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE :

I. INTRODUCTION AUX NANOTECHNOLOGIES.....	10
A. Définition de la nanoscience	10
B. Les approches « top-down » et « bottom-up »	10
C. Les outils de la nanoscience	11
II. APPLICATION DES NANOTECHNOLOGIES A LA DETECTION ET IMAGERIE BIOLOGIQUES.....	11
A. Introduction	11
B. Des nanoparticules pour la détection et l'imagerie biologiques.....	13
1. Introduction : une élaboration en 3 étapes.....	13
a) Synthèse de nanoparticules minérales	14
b) Greffage de composés organiques	14
c) Fonctionnalisation des composés organiques.....	15
2. Nanoparticules de silice.....	15
3. Quantum dots.....	15
4. Nanoparticules d'oxydes de fer	16
5. Nanoparticules dendrimères	17
6. Liposomes, nanoparticules polymères, micelles	18
7. Nanoparticules d'argent.....	19
8. Nanoparticules d'or.....	20
III. ELABORATION DE NANOPARTICULES HYBRIDES A CŒUR D'OR	23
A. Synthèses de nanoparticules d'or.....	23
1. Synthèses par méthodes chimiques	23
a) Généralités	23
b) Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols.....	24
c) Synthèse par la voie citrate	26
d) Synthèse par d'autres ligands	27
e) Optimisation de la synthèse de nanoparticules d'or.....	28
2. Synthèses par méthodes physiques.....	28
IV. APPLICATION DES NANOPARTICULES D'OR A LA MICROSCOPIE PAR FLUORESCENCE ET AUX PUCES ADN.....	29
A. Introduction à la microscopie par fluorescence.....	29
B. Assemblage nanoparticule d'or-ADN : application aux biopuces	32
V. INTRODUCTION A L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM) ...	37
A. Historique et application de l'IRM.....	37
B. Principe de fonctionnement de l'IRM	38

C. Magnétisme nucléaire	39
D. Les facteurs de qualité de l'image en IRM.....	39
E. Les agents de contraste en IRM.....	40
1. Les agents de contraste : principe.....	40
2. Les agents paramagnétiques	41
a) Mécanisme.....	42
b) Les agents de contraste paramagnétiques du gadolinium.....	42
3. Agents de susceptibilité magnétique	43
4. Effets des produits IRM sur les vitesses de relaxation et le signal.....	44
a) Relation concentration - vitesse de relaxation.....	45
b) Relation entre valeurs respectives de r_1 et r_2 et classes de produits	45
c) Classes de produits et effets sur le T_1 et T_2	45
d) Relation entre effet sur les T_1 et T_2 et effet sur le signal.....	46
e) Relation concentration - effet sur le signal.....	46
5. Développements	47
a) Introduction	47
b) Agents de contraste de haut poids moléculaire	48
VI. OBJECTIFS.....	52

PARTIE EXPERIMENTALE I

I. ELABORATION D'UN NANOHYBRIDE FLUORESCENT.....	55
A. Objectif	55
B. Elaboration de nanoparticules d'or stables	56
1. Introduction	56
2. Synthèse par la voie NaBH_4	57
3. Synthèse par la voie citrate	58
4. Le choix de la méthode citrate.....	58
C. Stabilisation et fonctionnalisation de la nanoparticule	59
1. Choix du fluorophore	59
2. Stabilisation par des molécules organiques	61
3. Greffage de la lissamine rhodamine B (LRSCB).....	61
a) Deux modes de greffage	61
b) Stratégie par greffage indirect.....	62
c) Greffage direct.....	64
II. MODE OPERATOIRE.....	68
A. Généralités.....	68
B. Stratégie par greffage indirect de la LRSCB	69
1. Synthèse de nanoparticules d'or nues.....	69
2. Stabilisation et fonctionnalisation	69
3. Dosage des fluorophores greffés	70
C. Stratégie par greffage direct de la rhodamine thiolée.....	70
1. Synthèse de rhodamine thiolée (Rhoda-SH)	70
2. Tests sur puces ADN	70
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	71
A. Stratégie par greffage indirect de la LRSCB	71
1. Synthèse.....	71
2. Propriétés optiques des nanoparticules recouvertes de fluorophores.....	74
3. Une procédure spécifique et originale pour le dosage des fluorophores sur la nanoparticule	74
B. Greffage direct : Modification de fluorophores organiques pour le greffage.....	78
1. Modification de la lissamine rhodamine B (LRSCB)	78
2. Tests sur puces ADN	80
C. Conclusion.....	84
D. Perspectives.....	84

PARTIE EXPERIMENTALE II

I. ELABORATION D'UN NANOHYBRIDE D'OR POUR UNE APPLICATION COMME AGENT DE CONTRASTE.....	87
A. Introduction : de nouveaux agents de contraste pour un meilleur diagnostic.....	87
B. Synthèse d'un complexant thiolé.....	88
C. Synthèse de nanohybrides d'or	90
D. Complexation du gadolinium	91
E. Complexation de l'euporium	93
II. MODE OPERATOIRE.....	94
A. Synthèse d'un complexant thiolé.....	94
B. Synthèse de nanohybrides d'or	95
C. Complexation des lanthanides.....	95
1. Complexation du gadolinium	95
2. Mise au point d'une méthode de dosage	95
3. Dosage des DTDTPA en surface des nanoparticules	96
4. Complexation de l'euporium	96
5. Caractérisation.....	96
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	97
A. Synthèse d'un nouveau dérivé thiolé du DTPA.....	97
B. Préparation de nanoparticules hybrides fonctionnalisées stables.....	100
C. Des propriétés intéressantes pour l'IRM	109
D. Complexation de l'euporium	111
E. Conclusion.....	112
F. Perspectives.....	113
CONCLUSION GENERALE.....	114

ANNEXES

ANNEXE I : LA VECTORISATION MEDICALE	116
A. Introduction	116
B. Ciblage passif : ciblage tissulaire	117
C. Ciblage actif : ciblage cellulaire	117
D. Imagerie moléculaire	118
ANNEXE II : PRINCIPE DE L'IRM.....	119
A. Le phénomène de résonance magnétique	119
B. Les phénomènes de relaxation.....	123
1. Relaxation longitudinale.....	124
2. La relaxation transversale	125
3. Contraste en T_1 , T_2 et densité protonique	126
ANNEXE III : LA RELAXIVITE	128
A. Principe de la relaxivité.....	128
B. Relaxivité interne : équations de Solomon-Bloembergen-Morgan.....	128
C. Relaxation externe	129
ANNEXE IV : LES CARACTERISTIQUES DES COMPLEXES DU GADOLINIUM¹³¹	
A. Introduction	131
B. Stabilité des complexes.....	131
C. Affinité du ligand avec le Gd : sites de liaison	131
D. Géométrie et flexibilité	132
E. Affinité du complexe avec l'organisme (spécificité)	133
ANNEXE V : SYNTHESE DE NANOPARTICULES PAR LA VOIE CITRATE	134
A. Synthèse de nanoparticules par la voie citrate.....	134
1. Problématique	134
2. Facteurs expérimentaux, réponses et domaine d'intérêt.....	134
3. Etude détaillée d'une expérience	135
a) Mode opératoire.....	135
b) Résultats expérimentaux.....	136
4. Criblage des facteurs, matrices d'Hadamard	138
a) Théorie.....	138
b) Résultats expérimentaux.....	139

c) Interprétation.....	140
5. Conditions opératoires finalement retenues	140
B. Greffage de dérivés thiolés.....	142
1. Différents dérivés	142
2. Mode opératoire.....	143
3. Taux limites de greffage	144
C. Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique	145
1. Protocole	145
2. Résultats	145
3. Discussion.....	146
D. Greffage des molécules organiques.....	149
1. Choix des ligands	149
2. Etude de stabilité des différentes nanoparticules greffées.....	150
a) Protocole	150
b) Résultats	150
ANNEXE VI : CALCULS DE RAPPORTS ATOMES D'OR/NANOPARTICULE....	152
ANNEXE VII : SPECTRE RMN ¹H SUR LRSCB.....	153
ANNEXE VIII : SPECTRE RMN ¹H SUR RHODA-SH.....	154
ANNEXE IX : SPECTRE DE MASSE SUR LRSCB.....	155
ANNEXE X : SPECTRE DE MASSE SUR RHODA-SH.....	156
ANNEXE XI : SYNTHÈSE AU@DTDTPA	157
ANNEXE XII : LISTE DES AGENTS DE CONTRASTE.....	161
ANNEXE XIII : LISTE DES ABBREVIATIONS.....	162

I. Introduction aux nanotechnologies

A. Définition de la nanoscience

Le terme «nanotechnologie» est devenu un mot très utilisé que ce soit dans la littérature scientifique et même récemment dans le langage courant. Ce mot est devenu porteur de beaucoup d'enthousiasme et d'intérêt auprès du monde scientifique, ce qui lui a valu d'être un peu galvaudé et d'en oublier son véritable sens. Ce sens est d'ailleurs controversé au sein même de la communauté scientifique. En effet, selon la spécialité, le mot nanotechnologie prend un sens différent que ce soit par exemple pour un chimiste ou un physicien. Il convient donc de redéfinir le terme de façon claire.

Si on décortique le mot nanotechnologie, il se compose donc du préfixe « nano » et du nom « technologie ». La technologie peut être définie comme la capacité à tirer avantages des progrès de la science pour créer de nouvelles applications pratiques. Le préfixe « nano » comme d'autres préfixes (pico, femto, micro) est utilisé pour exprimer un ordre de grandeur, celui du nano correspond à un milliardième de mètre. Une interprétation simpliste pourrait donc définir la nanoscience et les nanotechnologies comme la science et la technologie concernant les objets de taille nanométrique. Les atomes étant de l'ordre du dixième de nanomètre et les molécules de l'ordre du nanomètre, et chaque chose étant faite d'atome, tout serait alors de l'ordre de la nanoscience. Cette définition n'est donc pas très satisfaisante. Une définition plus satisfaisante des nanosciences serait l'étude des principes fondamentaux des molécules et des structures dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm. La nanotechnologie est donc basée sur les propriétés intrinsèques d'objets de taille nanométrique et sur la possibilité de les utiliser ou de les assembler de façon à obtenir des propriétés spécifiques. Ce qui est à l'échelle nanométrique n'est pas simplement tout petit, c'est aussi et surtout quelque chose de différent dans la manière d'être tout petit.^{1,2} Ainsi, l'or à l'état brut possède des propriétés physiques différentes de ses nanoparticules. Cette originalité, bien que méconnue à l'époque, est utilisée depuis le Moyen-Âge par les maîtres verriers qui teintaient les vitraux en de multiples couleurs en utilisant des particules d'or de dimensions nanométriques différentes.

B. Les approches « top-down » et « bottom-up »

On peut différencier les applications des nanotechnologies selon l'approche faite pour traiter un problème à l'aide des nanotechnologies. On distingue donc deux types d'approches : l'approche descendante appelée communément «top down» qui propose simplement une miniaturisation des technologies actuelles. En effet, elle utilise des matériaux massifs ultrapurs qui sont taillés ou gravés pour fabriquer des pièces, des composants et des machines entières de plus en plus petites, par assemblage ou dans une approche monolithique.³ Cette approche atteint ses limites pour des tailles inférieures à 100 nm. En effet, cette taille qui pour des considérations usuelles représente une taille très petite (un millième de la largeur d'un cheveu), représente une taille énorme par rapport à celle d'un atome ou d'une molécule. Il existe donc « une quantité de place en bas » comme le disait Richard Feynman dans son discours à l'American Physical Society en 1959,⁴ mais l'approche top-down ne semble pas en

¹ M.A. et D. Ratner, *Nanotechnologies : la révolution de demain* (Nanotechnology : a gentle introduction to a big idea), 2003, Campus press, Upper Saddle River, NJ :prentice Hall

² V. Balzani, *Small*, 2005, 1, 3, 278.

³ Observatoire français des techniques avancées, 2001, *Nanocomposants et nanomachines*, Arago26, OFTA

⁴ a) R.P. Feynman, *Eng. Sci.*, 1960, 23, 22, b) R.P. Feynman, *Saturday Rev.*, 1960, 43, 45.

mesure d'exploiter cette opportunité. L'approche « bottom-up » essaie d'utiliser les propriétés intrinsèques d'auto-assemblage ou d'assemblage direct de molécules ou atomes en nanostructures comme réponse à des problèmes technologiques. On part donc de particules nanométriques ou sub-nanométriques pour aller à une structure de taille nanométrique, d'où le nom bottom-up (de bas en haut). Cette approche semble la stratégie la plus prometteuse pour exploiter la science et la technologie à un niveau nanométrique. L'approche bottom-up représente de ce fait l'essentiel des travaux sur la nanoscience et les nanotechnologies.²

C. Les outils de la nanoscience

En 1960, Richard Feynman déclarait : « en l'an 2000, lorsque les gens regarderont un peu en arrière, ils seront stupéfaits de voir que nous avons attendu les années 60 pour commencer à se préoccuper des nanosciences ». Les années 60 ont vu le début de la miniaturisation qui a débouché sur la nanofabrication descendante (top down) mais il a fallu attendre l'an 2000 pour voir l'approche bottom up se développer. Pourquoi si longtemps après? Tout simplement parce que nous n'avions pas les outils nécessaires pour observer l'infiniment petit. Une telle exploration est devenue possible une fois que les microscopes électroniques ou à force atomique ont été mis au point. Aujourd'hui, ces outils permettent de mesurer et de manipuler la matière à l'échelle nanométrique, et c'est la raison pour laquelle les nanotechnologies prennent seulement leur essor maintenant.¹

Les instruments à balayage sont parmi les premiers outils à avoir été utilisés en nanosciences. L'idée s'est développée depuis les années 80 aux laboratoires IBM. Comme leur nom l'indique ces appareils permettent d'évaluer, par balayage de toute la surface, la topographie des matériaux nanostructurés. Différents appareils selon le type de la surface permettent de réaliser une cartographie de la surface par des mesures physiques : microscope à force atomique (AFM) par mesure la pression mécanique, microscope à effet tunnel à balayage (STM) par mesure électrique, microscope à force magnétique (MFM) par mesure magnétique...

Imaginé d'un point de vue théorique depuis 1935, les microscopes électroniques sont entrés en service en 1950. Leur principe est fondé sur le remplacement de la lumière des microscopes optiques classiques par un flux d'électrons. Ces électrons sont accélérés et traversent l'échantillon à observer. Les électrons non déviés par les noyaux atomiques ou les autres électrons permettent de récolter une image négative de l'objet. Théoriquement, on peut donc observer des atomes individuellement ; en réalité, le pouvoir de résolution des appareils les plus perfectionnés (HRTEM, High Resolution Transmission Electron Microscopy) se limite à des particules de l'ordre de 1 nm. Ces appareils permettent d'évaluer les structures physiques (empilement des plans atomiques, ...) mais pas les caractéristiques comme les champs magnétique ou électrique.

II. Application des nanotechnologies à la détection et imagerie biologiques

A. Introduction

Parmi les technologies de pointe développées de nos jours, les techniques de détection et d'imagerie biologiques figurent en bonne place. En effet, le souci de prolonger la vie et de lutter contre les maladies nécessitent des outils de diagnostics microscopiques et macroscopiques de plus en plus performants si on veut avancer le diagnostic et permettre un

traitement de la maladie en aval moins contraignant. La lutte contre le cancer en est l'exemple le plus parlant : le diagnostic et la prise en charge de la maladie à un stade précoce limiteraient ainsi considérablement les traitements nécessaires à la guérison. On remarquera aussi que si certains domaines voient les développements très vite freinés par une notion économique qui réduit singulièrement le panel des techniques et matériaux applicables. Les applications biologiques et thérapeutiques font partie des rares domaines avec les technologies de l'information à échapper en grande partie à cette règle.

Au niveau microscopique, la microscopie par fluorescence reste l'un des outils majeurs de la détection et de la caractérisation des cellules et organes. Son utilisation sur les puces ADN (biopuces) a permis en grande partie de décrypter le génome humain. Les outils actuels de la détection par fluorescence sont basés essentiellement sur le marquage par greffage d'un seul fluorophore organique sur l'entité biologique. Ces outils ont atteint leurs limites en terme de sensibilité et de stabilité et ne répondent pas aux exigences nouvelles de la détection et du ciblage biologique. En effet, ces molécules organiques fluorescentes possèdent des rendements quantiques et des taux d'extinction élevés qui justifient leurs utilisations, mais les interférences et les dégradations qui les affectent troublent grandement l'interprétation du signal lors d'une microanalyse. L'utilisation de molécules organiques fluorescentes est ainsi handicapée par des bandes d'absorption fines et d'émission larges, des chevauchements spectraux, des intermittences d'émission (blinking), ainsi que par les phénomènes de photoblanchiment (photobleaching) et surtout par la basse intensité du signal. Ils sont d'autre part très instables à température ambiante. L'amélioration du diagnostic en microanalyse (notamment celle de l'ADN) nécessite donc des fluorophores plus fiables avec un seuil de détection inférieur, la demande en fluorophores photostables et avec une haute intensité est donc importante. De nouveaux fluorophores ont ainsi été développés grâce à l'apport des nanotechnologies. Ces nouveaux outils possèdent outre une taille nanométrique (de 1 à quelques centaines de nm), des propriétés intrinsèques nouvelles liées à leur taille intermédiaire entre la molécule et le matériau massif. Dans le développement de la fluorescence, les matériaux très en vogue sont les quantum dots (cristaux nanoparticulaires) qui apportent une alternative intéressante aux fluorophores organiques. En effet, les quantum dots (QDs) présentent une bande d'absorption large et d'émission fine, une stabilité à température ambiante et surtout une forte intensité en luminescence. Cependant, une caractéristique gênante des QDs appelée clignotement génère toutefois une imprécision dans la mesure du signal. L'inconvénient majeur des QDs reste toutefois leur toxicité liée à leur composition à base de cadmium qui implique des conditions d'utilisation très sévères et empêche définitivement leur application biologique *in vivo* sur l'homme. Une autre approche dans l'amélioration de la détection par fluorescence à l'aide des nanotechnologies est basée sur l'utilisation des nanoparticules comme plate-formes pour la multi-fonctionnalisation par un ou plusieurs fluorophores et entités biologiques. En effet, ces nanoparticules offrent en surface de nombreux sites d'accrochage qui permettent le greffage d'un grand nombre de fluorophores multipliant d'autant l'intensité de luminescence. Des billes de silice encapsulant des fluorophores organiques ont ainsi été développées. Ces nanoparticules forment des fluorophores stables par la protection des molécules organiques dans la silice qui évite aussi la désorption et fait de ces nanoparticules des outils biocompatibles. Cependant, la limitation de leur application *in vitro* et *in vivo* est liée à la taille des nanoparticules de silice qui descend rarement en dessous des 50 nm ou alors avec une dispersité en taille élevée. En effet, de telles dimensions entraînent une reconnaissance du corps étranger par le système immunitaire et conduit à son élimination rapide par opsonisation (ANNEXE I). Une alternative séduisante aux QDs et aux billes de silice réside dans l'utilisation de nanoparticules d'or comme plates-formes pour le greffage en grand nombre de fluorophores ainsi que d'une ou plusieurs entités biologiques. Les nombreuses méthodes de synthèse permettent ainsi l'accès à des

nanoparticules homogènes et stables dans une large gamme de taille allant de 2 à 200 nm. Ces nanoparticules sont biocompatibles (l'or est connu pour sa non toxicité) et grâce à leur taille, elles permettent de plus l'endocytose dans les cellules pour des applications in vitro et évitent l'opsonisation (donc l'élimination trop rapide du corps) pour les applications in vivo. Ces nanoparticules permettent ainsi d'envisager sérieusement des fonctions de vectorisation médicale par ciblage actif et passif (ANNEXE I).

Dans la perspective d'une application à la détection macroscopique (anatomique) autrement dit l'imagerie, le temps de rétention dans le corps revêt une importance capitale dans la collecte du signal. Les nanoparticules d'or sont ainsi parfaitement adaptées. Parmi les méthodes d'imagerie actuellement disponibles, l'imagerie par résonance magnétique, grâce à sa technique non invasive et à sa cartographie en 3 dimensions, fait référence pour l'analyse des cas de détection les plus pointus (recherche de tumeurs cérébrales par exemple). Sa sensibilité est, dans certains cas insuffisante, et nécessite l'utilisation d'agents de contraste à base de chélates de gadolinium. Cependant, ces agents de contraste aux temps de rétention faibles et à la vitesse de rotation élevée s'avèrent encore inefficace dans les détections les plus complexes. La demande en agent de contraste est donc grande afin d'améliorer la sensibilité en IRM. Là encore, les nanotechnologies tentent de répondre à la demande avec l'élaboration de nanoparticules d'oxydes de fer (contraste négatif) et de nanoparticules porteuses de chélates de gadolinium (contraste positif). Ces nanoparticules obtiennent cependant des améliorations de l'efficacité du contraste mais avec des possibilités d'applications limitées. Aucune étude ne développe à ce jour, des nanoparticules d'or porteuses de complexes de gadolinium en nombre bien que les propriétés des nanoparticules d'or développées précédemment (taille, fonctionnalisation, biocompatibilité) semblent pourtant faire de ces dernières des candidates idéales pour l'application comme agents de contraste en IRM.

Dans cette étude bibliographique, nous présenterons donc l'éventail des nanoparticules développées pour la détection biologique avec un accent mis sur les nanoparticules d'or. Nous développerons ensuite les techniques de détection biologiques qui nous intéressent plus particulièrement, c'est-à-dire le décodage de l'ADN par biopuces et l'imagerie par résonance magnétique.

B. Des nanoparticules pour la détection et l'imagerie biologiques

1. Introduction : une élaboration en 3 étapes

La synthèse maîtrisée de nanoparticules a ouvert la voie vers de nouvelles applications grâce non seulement à leurs propriétés intrinsèques mais aussi par les propriétés qui peuvent leur être associées. Ces nano-objets aux caractéristiques nouvelles présentent un intérêt grandissant si elles sont associées à celles d'autres éléments organiques ou biologiques. En effet, les nanoparticules quelles qu'elles soient, offrent des possibilités intéressantes de greffage pour des molécules organiques. Ces matériaux hybrides organo-minéraux sont alors l'association des avantages des deux parties sans en retrouver les inconvénients de chacun. Le cœur minéral apporte une morphologie fixée avec une forme et une surface caractéristique ainsi que des propriétés magnétiques et optiques. Les composés organiques possèdent une chimie bien plus développée avec un nombre important de molécules commerciales aisément modifiables ou fonctionnalisables selon les besoins par un large éventail de réactions. Ces molécules organiques greffées en surface permettront le contrôle de la réactivité et de la stabilité en solution des nanoparticules, et assureront l'interface avec la biologie.

Le principe de l'élaboration des nanoparticules répond dans la majorité des cas à une stratégie en 3 étapes décrite ci-dessous et résumée dans la Figure 1.

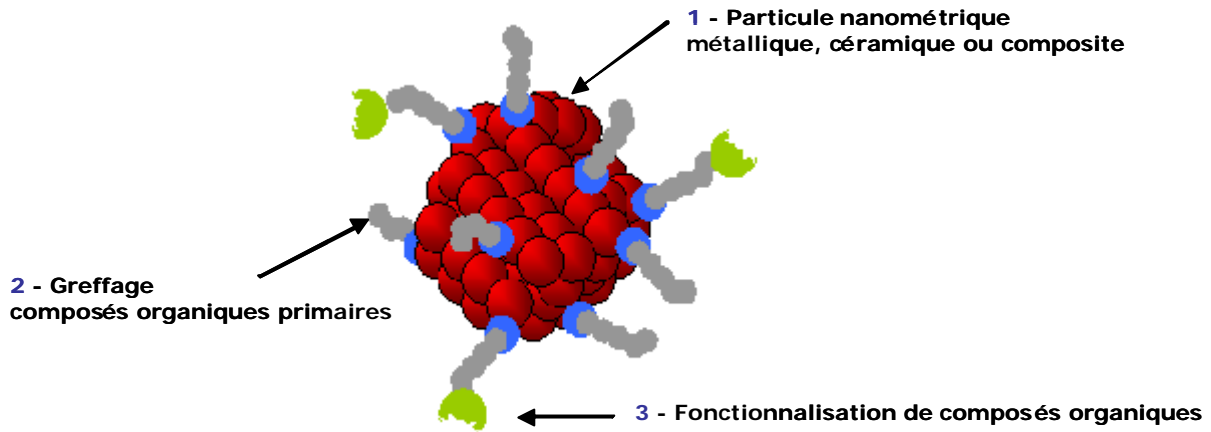


Figure 1 : nanoparticules hybrides : une élaboration en 3 étapes

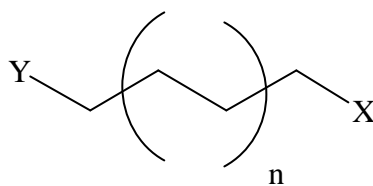
a) Synthèse de nanoparticules minérales

L'élaboration de nanoparticules hybrides passe dans un premier temps par la synthèse du cœur minéral. Les nanoparticules minérales répertoriées dans la littérature peuvent être de différents types. Quel que soit le type de nanoparticules, l'objectif est de synthétiser des particules adaptées aux futures applications essentiellement par leur taille mais aussi par leur structure et leur composition. La nanoparticule doit posséder une surface adaptée pour l'accrochage de molécules organiques de façon stable. On répertorie ainsi très peu de liaisons stables de ce type. Enfin, satisfaire aux conditions précédentes a amené à développer des nanoparticules à structure complexe du type core-shell ou des matériaux composites.

b) Greffage de composés organiques

Le greffage de molécules organiques en surface des nanoparticules va ouvrir la voie vers de nouvelles applications. Le large panel de molécules à notre disposition ouvre un large horizon à la création de nanoparticules hybrides, même si les liaisons métal-organique stables ne sont pas nombreuses, ce qui limite tout de même les possibilités de greffage en surface des nanoparticules. Les liaisons métal-composés organiques les plus répandues sont les liaisons or-thiol et argent-thiol, les liaisons par l'intermédiaire d'un siloxane ou d'un phosphonate. Les composés organiques dits primaires ont essentiellement pour fonction de stabiliser les nanoparticules ce qui explique leur utilisation in situ dès l'étape de synthèse afin de prévenir l'agglomération et maîtriser la taille des particules comme c'est le cas dans les synthèses de nanoparticules d'or élaborées par Brust. Dans ce dernier cas, les surfactants thiolés permettent aussi d'ajuster les caractéristiques de la nanoparticule notamment en terme de taille. Cette stabilisation prendra tout son intérêt lors des étapes d'extraction et de purification des nanoparticules et surtout lors de la fonctionnalisation par des molécules plus complexes pouvant nécessiter des conditions environnementales plus contraignantes pour la stabilité des nanoparticules (solvant, pH).

Outre sa fonction de protection de la nanoparticule, ces molécules organiques primaires doivent aussi être les intermédiaires vers la fonctionnalisation par des molécules complexes possédant des propriétés adaptées pour l'application visée. Elles doivent donc posséder des fonctions terminales réagissant avec celles du composé fonctionnalisant selon des méthodes de chimie organique classique. Le composé organique primaire sera donc de la forme :



X fonction formant une liaison stable avec la nanoparticule. (SH, SiOH₃)

Y fonction stabilisante vis à vis du milieu ou réagissant avec les fonctions de la molécule à greffer (NH₂, OH, halogènes).

c) Fonctionnalisation des composés organiques

L'intérêt des nanoparticules réside dans cette possibilité de greffer des molécules ayant des propriétés qui font des nanoparticules hybrides des objets avec des applications originales ou améliorées. Ces molécules apportent donc au noyau minéral des propriétés supplémentaires (dispersabilité, luminescence, fonctionnalisation biologique). La réaction entre le composé organique primaire et le composé organique complexe se fera selon des synthèses organiques classiques. La présence des particules minérales engendre cependant un encombrement stérique ainsi que des effets inducteurs. Les nanoparticules en suspension étant en très faible concentration, les réactions se dérouleront en milieu dilué. Il faudra aussi tenir compte de la présence des nanoparticules qui restent des objets encore fragiles et sensibles au milieu environnant et qui peuvent donc s'agglomérer. Cette sensibilité rendra les manipulations de séparation et de purification très délicates.

2. Nanoparticules de silice

La synthèse de nanoparticules encapsulant des fluorophores⁵ a été rapportée en s'inspirant des travaux de Stöber⁶ permettant l'accès à des nanoparticules monodisperses dans une gamme de diamètre de 5 à 2000 nm par la méthode sol-gel.⁷ Le mécanisme de formation de telles particules de silice a clairement démontré la faisabilité de l'incorporation de fluorophores hydrophiles et hydrophobes. La protection par une couche de silice permet ainsi une bonne biocompatibilité, tout en assurant la stabilité des molécules encapsulées. Ces nanoparticules appliquées comme biomarqueurs possèdent donc une excellente bio-spécificité avec une stabilité optique des luminophores. La surface de ces nanoparticules offre de plus des possibilités de greffage de sondes biologiques pour le ciblage thérapeutique.

3. Quantum dots

Les progrès dans l'élaboration de nanocristaux semi-conducteurs ont permis le passage d'objets à 2 dimensions (quantum wells) puis à 1 dimension (quantum wire) pour enfin aboutir à des points quantiques à 0 dimension (quantum dots) qui ont révélé des propriétés surprenantes. La variation de l'espacement des niveaux électroniques en fonction de la taille des quantum dots (QDs) ont ainsi été étudiées largement par les physiciens mais l'explosion

⁵ a) S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4988, b) S. Shibata, T. Taniguchi, T. Yano, M. Yamane, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **1997**, 10, 263.

⁶ W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, **1968**, 26, 62

⁷ D.L. Green, J.S. Lin, Y.-F. Lam, M.Z.-C. Hu, D.W. Schaefer, M.T. Harris, *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 266, 346.

des QDs a été provoquée par l'élaboration de solutions colloïdales aqueuses stables qui ont ouvert une voie prometteuse pour le développement d'une nouvelle génération de biomarqueurs luminescents.⁸ En 1998, les résultats obtenus conjointement par les équipes de Nie⁹ et Alivisatos¹⁰ ont ainsi démontré pour la première fois l'utilisation de solution colloïdale de QDs comme marqueurs biologiques. Récemment, le champ d'application des QDs s'est développé significativement. Les QDs colloïdaux sont des émetteurs de lumière robustes et stables et ils peuvent changer de couleur par simple variation de la taille.¹¹ De nombreuses méthodes de bio-conjugaison¹² sur les QDs ont été développées pour diverses applications : le marquage cellulaire,¹³ la recherche cellulaire,¹⁴ l'imagerie in vivo¹⁵ et la détection ADN.¹⁶ Il a été démontré que les QDs colloïdaux présentent une bande absorption plus large, une bande d'excitation plus fine et une intensité d'émission supérieure de plusieurs ordre de grandeurs à celle des fluorophores organiques conventionnels.¹⁷ Des solutions colloïdales de QDs sont désormais disponibles commercialement pour un large éventail de bio-conjugaison et avec un haut rendement quantique. Cependant, la majorité des QDs luminescents élaborés sont de type core-shell CdSe/ZnS ce qui quand on connaît la toxicité du cadmium limite leur application in vivo sur l'homme.

4. Nanoparticules d'oxydes de fer

Des nanoparticules magnétiques avec une taille finale après enrobage généralement comprise entre 20 et 60 nm ont été développées pour une application comme agents de contraste en IRM. Ces nanoparticules provoquent un large champ hétérogène autour d'elles qui se diffuse aux molécules d'eau et provoque des effets de relaxation prédominants en T₂. Ces colloïdes dénommés USPIO ou SPIO ((Ultra) Small Superparamagnetic Iron Oxide) sont constitués comme leur nom l'indique d'un cœur d'oxyde de fer (Fe₃O₄ ou γ-Fe₂O₃) recouvert d'une couche de macromolécules hydrophiles (dextran, carboxydextran, albumine etc.). Ces macromolécules permettent de limiter la taille des particules pendant la synthèse, de stabiliser les particules en solution aqueuse par répulsion stérique et de réduire l'opsonisation lors de l'application in vivo. Ces nanoparticules sont développées commercialement par plusieurs entreprises (Endorem[®], Feridex[®], Sinerem[®], Combidex[®]). Grâce à leur propriété magnétique, elles ont aussi été appliquées à l'hyperthermie qui provoque une lyse des cellules à proximité et pourrait donc permettre après ciblage des cellules cancéreuses, un traitement anti-cancéreux

⁸ P. Alivisatos, *Nature Biotech.*, **2004**, 22, 47.

⁹ W.C.W. Chan, S.M. Nie, *Science*, **1998**, 281, 2016.

¹⁰ M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science*, **1998**, 281, 2013.

¹¹ A.M. Smith, S. Nie, *Analyst*, **2004**, 129, 672.

¹² a) P.T. Tran, E.R. Goldman, G.P. Anderson, J.M. Mauro, H. Mattoussi, *Physica Status Solid B*, **2002**, 229, 427, b) D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 8861, c) W.J. Parak, D. Gerion, D. Zanchet, A.S. Woerz, T. Pellegrino, C. Micheel, S.C. Williams, M. Seitz, R.E. Bruehl, Z. Bryant, C. Bustamante, C.R. Bertozzi, A.P. Alivisatos, *Chem. Mater.*, **2002**, 14, 2113, d) S.P. Wang, N. Mamedova, N.A. Kotov, W. Chen, W. Studer, *Nanolett.*, **2002**, 2, 817, e) W. Guo, J.J. Li, Y.A. Wang, X. Peng, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 3125.

¹³ X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N.F. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 41.

¹⁴ W.J. Parak, R. Boudreau, M. Le Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C.M. Micheel, S.C. Williams, A.P. Alivisatos, C. Larabell, *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 882.

¹⁵ B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science*, **2002**, 298, 1759.

¹⁶ a) J.R. Taylor, M.M. Fang, S.M. Nie, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1979, b) H.X. Xu, M.Y. Sha, E.Y. Wong, J. Uphoff, Y.H. Xu, J.A. Treadway, A. Truong, E. O'Brien, S. Asquith, M. Stubbins, N.K. Spurr, E.H. Lai, W. Mahoney, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, E43.

¹⁷ a) C.A. Leatherdale, W.K. Woo, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 7619, b) D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, W.W. Webb, *Science*, **2000**, 300, 1434.

en complément des chimio et radio-thérapies. D'autres oxydes métalliques magnétiques que les oxydes ferreux ont aussi été développés pour l'hyperthermie (ZnFe_2O_4 , $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$,¹⁸ $\text{Y}_3\text{Fe}_{5-x}\text{Al}_x\text{O}_{12}$ ¹⁹).

5. Nanoparticules dendrimères

Les dendrimères sont des structures largement répandues dans la nature mais leur synthèse artificielle est aisément réalisable par la chimie des polymères.²⁰ Les dendrimères sont en plus d'être des molécules de large taille, structurellement bien définies, avec une faible polydispersité comparé aux polymères traditionnels. A un niveau moléculaire, les dendrimères sont des structures hyper ramifiées qui mènent à l'obtention de structures semi-globulaires ou globulaires, avec une haute densité de fonctionnalisation en surface pour un petit volume moléculaire. Les structures dendrimériques sont le résultat d'une élaboration en cascade par couches successives qui peuvent donc rendre leur synthèse fastidieuse. L'élaboration d'un dendrimère peut être réalisée à partir d'une large variété de ligands, tels que des polyamines, un mélange de polyamides et de polyamines, ou encore de poly(aryléthers) (Figure 2). Des études plus récentes ont développé des structures à base de carbohydrate²¹ ou de calixarène,²² ou contenant des éléments comme le silicium ou le phosphore.²³ (Figure 3). Les tailles des dendrimères disponibles commercialement sont de l'ordre de quelques nanomètres (2-7 nm).^{24,25} L'utilisation in vitro de dendrimères est complexe et nécessite une fonctionnalisation de surface adéquate (surface anionique) pour éviter la déstabilisation de la membrane cellulaire et par conséquent, la lyse de la cellule. La fonctionnalisation en surface par un brin ADN (oligonucléotide) leur permet notamment d'être moins toxiques, c'est pourquoi l'utilisation des dendrimères pour le traitement médicamenteux a essentiellement été basé sur des dendrimères porteurs d'oligonucléotides leur permettant d'atteindre le cœur des cellules. De plus, la structure des dendrimères leur permet d'exalter une même fonction en surface et ainsi d'augmenter la spécificité pour une interaction choisie en augmentant d'une part l'affinité pour un ligand spécifique et en diminuant d'autre part celle pour un ligand non spécifique. L'utilisation de dendrimères comme plates-formes pour le transport de molécules plus petites est un domaine de recherche qui a été largement exploré.²⁶ L'élaboration de particules dendrimériques porteuses de chélates de gadolinium a ainsi été développée pour des applications comme agents de contraste en IRM.^{27,28,29}

¹⁸ A.A. Kuznetsov, O.A. Shlyakhtin, N.A. Brusentsov, O.A. Kuznetsov, *Eur. Cell. Mater.*, **2002**, 3, 75.

¹⁹ F. Grasset, S. Mornet, A. Demourges, J. Portier, J. Bonnet, A. Vekris, E. Duguet, *J. Magn. Mater.*, **2001**, 234, 409.

²⁰ U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 43.

²¹ W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90, 231.

²² R. Roy, J. M. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 369.

²³ J. P. Majoral, A. M. Caminade, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 845.

²⁴ J. C. Roberts, M. K. Bhalgat, R. T. Zera, *J Biomed. Mater. Res.*, **1996**, 30, 53.

²⁵ F. Gröhn, B. J. Bauer, Y. A. Akpalu, C. L. Jackson, E. J. Amis, *Macromolecules*, **2000**, 33, 6042.

²⁶ F. Zeng, S.C. Zimmerman, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1681.

²⁷ S. Laus, A. Sour, R. Ruloff, E. Tóth, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 3064.

²⁸ G. M. Nicolle, E. Tóth, H. Schmitt-Willich, B. Raduchel, A.E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1040.

²⁹ J. Rudovsky, P. Hermann, M. Botta, S. Aime, I. Lukes, *Chem. Commun.*, **2005**, 2390.

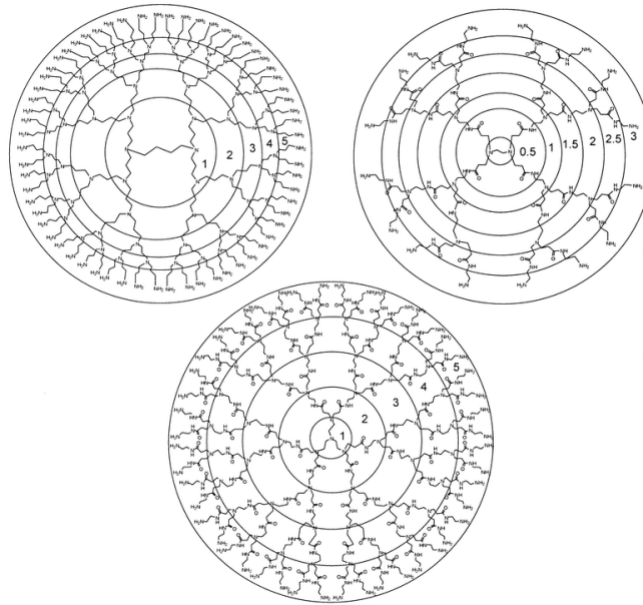


Figure 2 : dendrimères commerciaux. En haut à gauche : polypropylène imine. En haut à droite : polyamidoamine. En bas : polyamidoamine (Starbust™)

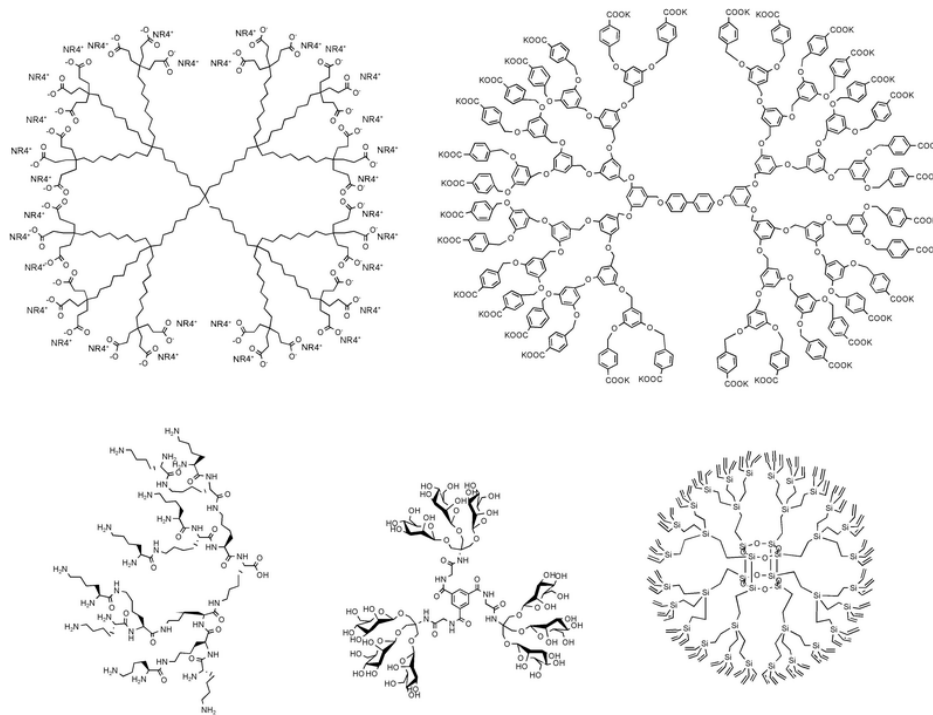


Figure 3 : différents types de dendrimères. En haut à droite : micelle unimoléculaire. En haut à gauche : polyarylether. En bas de gauche à droite : polylysine, dendrimer carbohydrate et dendrimer à base de silicium.

6. Liposomes, nanoparticules polymères, micelles

La recherche de nouveaux moyens de transport des médicaments dans le corps humain a été envisagée par l'élaboration de nanoparticules sous forme de liposomes ou de particules polymères.³⁰ L'élaboration de liposomes est basée sur l'utilisation de lipides polaires insolubles en milieu aqueux (phospholipides) qui s'arrangent de manière concentrique en présence d'un excès d'eau. Leur diamètre varie de 10 nm pour les plus petits composés

³⁰ C. Monfardini, F.M. Veroneses, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, 9, 418.

monocouches à plusieurs micromètres pour les composés multicouches. Le médicament peut être présent soit dans sa phase aqueuse intérieure soit sur le lipide selon son caractère hydrophile. Des particules polymères biodégradables ont par ailleurs été élaborées pour permettre la libération progressive de médicaments. Elles sont constituées d'une cavité centrale liquide (contenant l'agent actif) entourée d'un mur polymère solide. Leur diamètre varie entre 150 nm pour les polyalkylcyanoacrylate (PACA) et 200-300 nm pour les polyisobutylcyanoacrylate. L'étape d'encapsulation du médicament est généralement réalisée simultanément à la polymérisation. Le relargage de la molécule active est contrôlé par le taux de diffusion à travers la membrane polymère ou par érosion des matrices biodégradables. Enfin, des nanoparticules à structures micellaires sont rapportées pour l'élaboration d'agents de contraste pour l'IRM.^{31,32} Ces micelles sont composées de molécules polymères amphiphiles arrangées de façon concentrique formant ainsi des structures de taille nanométrique. La partie hydrophobe est constituée par une longue chaîne carbonée qui forme ainsi l'intérieur de la particule. La partie extérieure (hydrophile) est constituée par des dérivées polyaminocarboxylates (DOTA, DTPA) qui assurent non seulement le caractère hydrophile grâce à leurs nombreuses fonctions COOH mais aussi la complexation de manière stable des ions paramagnétiques Gd³⁺ pour la relaxation du signal IRM.

7. Nanoparticules d'argent

L'étude des nanocristaux de métaux nobles a démontré des propriétés électromagnétiques, optiques et catalytiques largement influencées par leur taille et leur forme.^{33,34,35} Ces observations ont conduit au développement de méthodes de synthèses permettant un meilleur contrôle de la morphologie et de la taille.³⁶ Des nanomatériaux ont alors été synthétisés par une large variété de méthodes allant de la décharge par arc électrique en phase solide-liquide³⁷ à la bioréduction³⁸ en passant par la synthèse en solution.³⁶ Parmi les nanomatériaux de métaux nobles, les nanoparticules d'argent ont reçu une attention considérable due à leurs propriétés physico-chimiques intéressantes. La résonance plasmon de surface fait des nanoparticules d'argent des candidates idéales pour la reconnaissance moléculaire en exploitant l'effet Raman de surface (en anglais SERS).³⁹ La forte toxicité de l'argent sous différentes formes chimiques et sur une large gamme de microorganismes est bien connue.⁴⁰ L'application des nanoparticules d'argent comme matériaux anti-bactérien et anti-virus a démontré des propriétés prometteuses.⁴¹ Cette toxicité empêche l'utilisation de l'argent pour un grand nombre d'applications biologiques et environnementales; c'est la raison pour laquelle les nanoparticules d'or ont reçu un intérêt bien plus vaste se traduisant par une

³¹ J.P. André, E. Toth, H. Fisher, A. Seelig, H.R. Mäcke, A.E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 2977.

³² A. Accardo, D. Tesauro, P. Roscigno, E. Gianolio, L. Paduano, G. D'Errico, C. Pedone, G. Morelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3097.

³³ P. Mulvaney, *Langmuir*, **1996**, 12, 788.

³⁴ L.M. Liz-Marzan, *Materials Today*, **2004**, 7, 26.

³⁵ C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, *Chem. Rev.*, **2005**, 1025.

³⁶ a) Y.Y. Yu, S.S. Chang, C.L. Lee, C.R.C. Wang, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 6661, b) Y. Sun, B. Mayers, T. Herricks, Y. Xia, *Nanolett.*, **2003**, 3, 955, c) N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 4065.

³⁷ Y. Zhou, S.H. Yu, X.P. Cui, Z.Y. Chen, *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 545.

³⁸ G. Canizal, J.A. Ascencio, J. Gardea-Torresday, M. Jose-Yacamán, *J. Nano. Res.*, **2001**, 13, 1389.

³⁹ S. Schultz, D.R. Smith, J.J. Mock, D.A. Schultz, *P.N.A.S.*, **2000**, 97, 996.

⁴⁰ a) A. Gupta, S. Silver, *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 888, b) S.Y. Liau, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell, *Lett. Appl. Microbiol.*, **1997**, 25, 279.

⁴¹ a) I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Coll. Int. Sci.*, **2004**, 275, 177, b) J. L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, M.J. Yacamán, *J. Nanobio.*, **2005**, 3, 6

augmentation exponentielle du nombre de publications ces dix dernières années, un engouement qui est lié à l'émergence des nanotechnologies.

8. Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont historiquement les nanoparticules qui ont lancé les nanotechnologies. L'intérêt pour les nanoparticules d'or reste encore vif aujourd'hui et représente une grande partie des travaux rapportés notamment dans le domaine des applications biologiques. Dans ce domaine, les nanoparticules d'or représentent en effet des objets parfaitement adaptés non seulement par leur non-toxicité mais aussi par leur gamme de taille qui leur confère une bonne biocompatibilité et biodisponibilité. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur cœur métallique mais aussi et surtout à leurs énormes capacités de fonctionnalisation (et de multifonctionnalisation) en surface par greffage de molécules soufrées (notamment biologiques). Les nombreuses méthodes de synthèses développées pour l'élaboration de nanoparticules d'or permettent tout d'abord l'accès à des particules stables et de taille adaptable en fonction de l'application sur une gamme de 2 à 200 nm. La stabilité et la taille de ces nanoparticules en solution aqueuse (pour des applications biologiques) sont essentiellement fonction du ou des différents ligands soufrés greffés en surface des nanoparticules qui possèdent des caractères hydrophiles. Les propriétés intrinsèques du noyau métallique (masse atomique élevée, taille) permettent notamment une détection en microscopie électronique à transmission (MET). Pour obtenir une image en MET, il est nécessaire d'utiliser des matériaux denses, ce qui n'est pas le cas des molécules biologiques. Les biologistes ont donc greffé des métaux lourds aux molécules sensibles : or, platine, *etc.*. La signature de ces métaux est différente au microscope électronique, on peut donc en utiliser plusieurs pour obtenir un marquage complexe. Les nanoparticules métalliques étant de masse élevée, la détection par microscopie électronique à transmission est l'outil de prédilection des nanotechnologies. Cette propriété a donc été appliquée au marquage *in vitro* de coupes cellulaires analysées en MET (Figure 4).

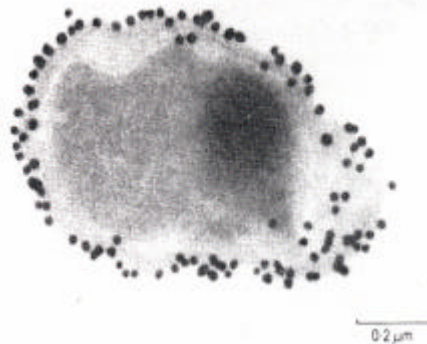


Figure 4 : utilisation des nanoparticules pour l'imagerie cellulaire par MET

La propriété intrinsèque la plus remarquable des nanoparticules d'or reste toutefois la résonance plasmon de surface (en anglais SPR). Cette oscillation collective des électrons du nuage électronique provoque en effet pour les solutions colloïdales une absorption (bande plasmon) autour de 520 nm. Cette propriété a ainsi permis l'utilisation des nanoparticules d'or comme agent de contraste pour l'imagerie optique par microscopie photonique. La SPR procure aux nanoparticules des propriétés d'applicables dans l'étude par diffusion de la lumière. La section efficace des nanoparticules d'or est ainsi largement supérieure à celle de nanoparticules polymères de la même taille, spécialement dans le rouge. Des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un anticorps permettent ainsi la détection en microscopie par

réflexion/transmission de protéines transmembranaires spécifiquement marquées (Figure 5).⁴² Ce ciblage reste cependant cantonné à la surface cellulaire.

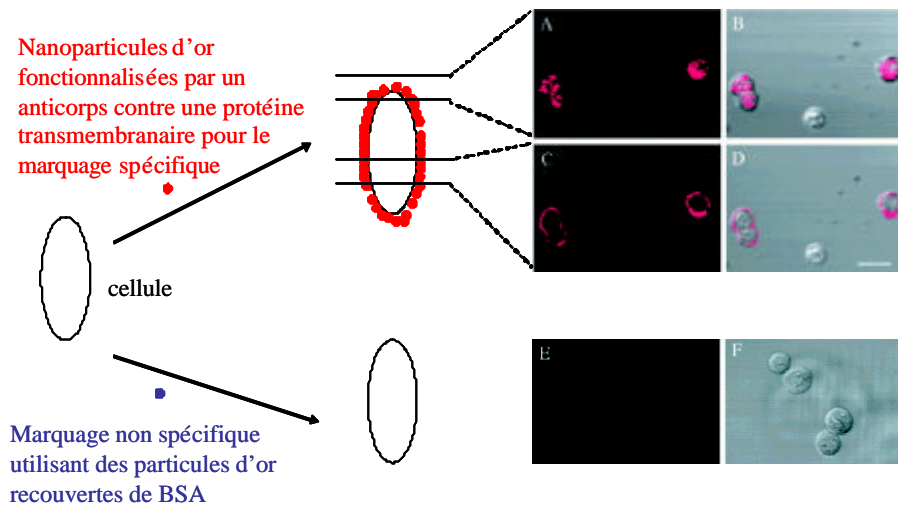


Figure 5 : imagerie cellulaire par marquage spécifique : utilisation de nanoparticules fonctionnalisées par un anticorps (microscopie confocale par réflexion (A, C, E) et réflexion/transmission (B, D, F)).

Ce ciblage du noyau cellulaire est un domaine qui soulève un intérêt encore plus important. Le noyau cellulaire est en effet une cible privilégiée car c'est à que réside l'information génétique de la cellule. Le diagnostic des maladies ou le traitement de ces dernières par de nouveaux médicaments pourraient donc être grandement améliorés par le transport de matériau au cœur de la cellule. Le ciblage nucléaire est donc un challenge intéressant mais qui requiert plusieurs conditions : (i) à commencer par entrer dans la cellule, par endocytose par exemple ; (ii) éviter les voies endosomales et lysosomales ; (iii) posséder un signal de localisation nucléaire (SLN) permettant d'interagir avec les complexes des pores nucléaires ; (iv) et être assez petit (<30 nm) pour passer la barrière membranaire.⁴³ L'utilisation de nanoparticules d'or de taille <30 nm fonctionnalisées en surface par des récepteurs d'endocytose (RE) et de SLN ont ainsi démontré des propriétés de ciblage nucléaire (Figure 6). Les nanoparticules sont repérées (en rouge/rose ci-dessous) par microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC) grâce à l'énorme extinction dans le visible qu'elles entraînent. Le phénomène de SPR a d'autre part permis la détection colorimétrique de l'hybridation pour la microanalyse de l'ADN sur biopuces, l'hybridation entraînant un décalage de la bande plasmon vers les grandes longueurs d'ondes. Les nanoparticules d'or ont d'autre part été utilisées en microanalyse de l'ADN sur biopuces pour les variations importantes qu'elles entraînent au niveau mécanique et électrochimique lors de l'hybridation.⁴⁴ La microanalyse de l'ADN sur biopuces a aussi été envisagée par la détection par fluorescence qui est l'une des techniques les plus employées pour ce genre d'analyse. Les nanoparticules d'or ne possèdent pas de propriétés intrinsèques de fluorescence (dans des conditions classiques d'expérimentation) mais leur propriétés de surface permettent néanmoins de greffer des molécules soufrées et d'ainsi apporter des molécules fonctionnelles multiples et nombreuses.

⁴² K. Sokolov, M. Follen, J. Aaron, I. Pavlova, A. Malpica, R. Lotan, R. Richards-Kortum, *Cancer Res.* **2003**, 63, 1999.

⁴³ A.G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. Glomm, J. Ryan, M.F. Anderson, S. Franzen, D.L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4700.

⁴⁴ a) N. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1547-1562, b) J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawd, R. Polsky, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5576, c) M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 2181.

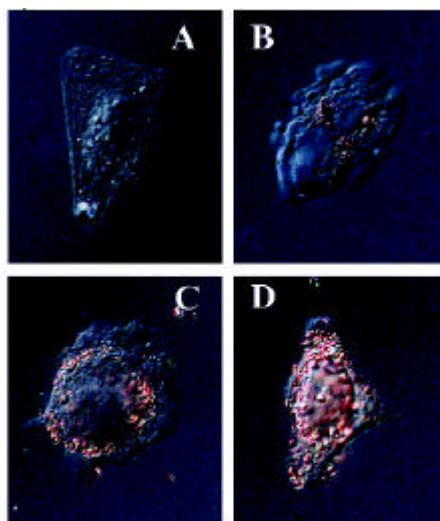


Figure 6 : Essais de Ciblage nucléaire par des nanoparticules porteuses de récepteurs SLN (A), de récepteurs RE (B), de fibres non-porteuses de récepteurs (C), de récepteurs RE et SLN (D).

Outre les biomolécules qui sont désormais largement développés commercialement sous forme de produits thiolés (oligonucléotides, streptavidine-biotine...) spécifiquement pour le greffage sur l'or, des oligonucléotides thiolés fonctionnalisés par un fluorophore (Alexa Fluor, streptavidine-cyanine) sont aussi apparus. Les études menées sur des nanoparticules d'or porteuses de ces oligonucléotides fluorescents ont donnés des résultats intéressants en détection par fluorescence de l'ADN sur biopuces.^{45,46} Une récente étude a réalisé la protection de ces fluorophores par encapsulation dans une coque de silice afin de garantir la stabilité de la fluorescence.⁴⁷

Ces différentes études ont démontré les nombreuses propriétés intrinsèques des nanoparticules d'or et leur facilité d'adaptation en fonction de l'application de détection biologique choisie. Les nanoparticules d'or par leur simplicité de synthèse et leurs possibilités de fonctionnalisation de surface semblent posséder tous les atouts nécessaires pour l'application à la détection biologique. Leur application à la détection par fluorescence (notamment sur biopuces), si elle semble prometteuse, a toutefois encore une large marge de progression. Leur application à l'IRM n'a quant à elle jamais été rapportée bien que ses possibilités de fonctionnalisation de surface offrent une opportunité de greffer des chélates de gadolinium. Ces nanoparticules pourrait ainsi développer des propriétés intéressantes comme agent de contraste pour la relaxation en T_1 .

Ce sont les raisons pour lesquelles des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des fluorophores et des chélates de gadolinium ont été développées respectivement pour l'abaissement du seuil de détection en luminescence et en IRM.

⁴⁵ B. Dubertret, M. Calame M., A. Libchaber, *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 365.

⁴⁶ D. Maxwell, J. Taylor, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 9606.

⁴⁷ X. Zhou, J. Zhou, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 5302.

III. Elaboration de nanoparticules hybrides à cœur d'or

A. Synthèses de nanoparticules d'or

1. Synthèses par méthodes chimiques

a) Généralités

Michael Faraday fut le premier à étudier la formation de colloïdes d'or.⁴⁸ La méthode qu'il utilisa était basée sur la réduction d'ions AuCl_4^- par un agent phosphoré. Depuis ces travaux, nombreuses furent les méthodes de synthèse d'AuNPs d'or décrites utilisant différents types de réducteurs et conduisant à des tailles et des morphologies différentes. Cette réduction aisée d'au (III) ou au (I) sous forme de sels en au (0) par différents types de réducteurs est due au fait que l'or est le plus électro-négatif des métaux de transition. Les méthodes utilisées ont permis d'obtenir des particules d'or monodisperses de 3 à 160 nm. Les différentes méthodes de synthèse de colloïdes d'or sont basées sur le contrôle de la réduction de l'au (III) en au (0). Ces méthodes utilisent généralement l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) mais varient considérablement dans la nature du réducteur, l'ordre de l'addition des réactifs, les paramètres physiques (concentration, température et vitesse d'agitation), et bien sûr la taille finale des nanoparticules. Le diamètre final est déterminé par le nombre de noyaux icosaédriques formés au début de la réaction comparé au taux d'augmentation de la taille des particules. L'utilisation d'un réducteur rapide (phosphore blanc, acide tannique) permet d'obtenir un grand nombre de noyaux, consomme donc beaucoup d' HAuCl_4 et limite de ce fait la quantité disponible pour la croissance des nanoparticules. Les colloïdes d'or sont composés d'un noyau d'or pur (0) entouré d'ions AuCl_2^- adsorbés en surface. Ce sont ces ions qui confèrent la charge négative aux colloïdes et protègent de l'agrégation par répulsion électrostatique (Figure 7). Toutes les synthèses de colloïdes d'or sont sensibles à l'anion (chlorure>bromure>iodure) qui compresse la double couche ionique et réduit donc les répulsions électrostatiques. La déstabilisation du système aboutit à une agrégation qui s'accompagne d'un changement de couleur de la solution et éventuellement d'une sédimentation de l'or.⁴⁹

De nombreuses méthodes de synthèse ont été élaborées en faisant varier la nature de sel d'or (HAuCl_4 , $\text{AuPC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ ⁵⁰) et surtout celle du réducteur employé ($\text{NaSCN}+\text{K}_2\text{CO}_3$,⁵¹ phosphore blanc,^{52,53} acide ascorbique + K_2CO_3 ,⁵⁴ PPh_3 ,⁵⁵ NaBH_4 , citrate de sodium). Parmi ces méthodes, nombreuses sont celles qui ont mené à des nanoparticules instables ou des protocoles complexes qui ont limité leur développement et leurs applications. La méthode de Brust développée en 1994 marque une véritable révolution dans la synthèse de nanoparticules d'or avec l'obtention de nanoparticules stables et redispersables par un protocole simple de mise en œuvre. De telle sorte que, l'essentiel des articles publiés depuis sur les nanoparticules d'or sont consacrés à des nanoparticules d'or élaborées par cette méthode. Parmi les autres

⁴⁸ M. Faraday, *Philos. Trans.*, **1857**, 147, 145.

⁴⁹ M.A. Hayat, *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*; **1989**, Academic Press: New York

⁵⁰ P.A. Bartlett, B. Bauer, S.J. Singer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 5085.

⁵¹ W. Baschong, J.M. Lucocq, J. Roth, *Histochemistry*, **1985**, 83, 409.

⁵² J. Roth, *Histochemistry J.*, **1982**, 14, 791.

⁵³ a) W.P. Faulk, G.M. Taylor, *Immunochemistry*, **1971**, 8, 1081, b) M. Horisberger, J. Rosset, *J. Histochemistry Cytochem.*, **1977**, 25, 295.

⁵⁴ M. Horisberger, M. Tacchini-Volanthen., *Histochemistry*, **1983**, 77, 37.

⁵⁵ a) W.W. Weare, S.M. Reed, M.G. Warner, J.E. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1280, b) M. Yamamoto, M. Nakamoto, *Chem. Lett.*, **2003**, 32, 452.

synthèses développées et utilisées de nos jours, la synthèse par réduction d' HAuCl_4 en présence de citrate de sodium rencontre un moindre succès dû à ses spécificités d'élaboration qui lui apporte pour certaines applications un avantage sur la méthode de Brust. Pour ces raisons, une description plus approfondie de ces deux méthodes majeures sera développée ci-après.

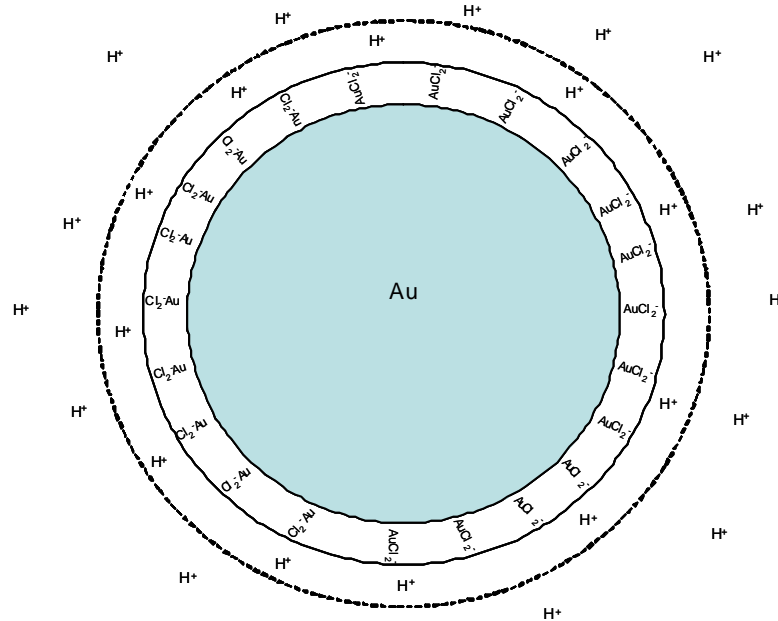


Figure 7 : Structure des nanoparticules d'or

b) Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols

Les thiols restent le type de stabilisant le plus employé pour les nanoparticules d'or de n'importe quelle taille du fait de la plus grande force de la liaison Au-S. La stabilisation de AuNPs par des thiols fut pour la première fois publiée en 1993 par Mulvaney et Giersig⁵⁶ qui démontraient la possibilité d'utiliser des thiols de chaînes carbonées de différentes longueurs. Les thiols sont liés de façon covalente par réaction avec la surface métallique. Deux mécanismes différents sont proposés pour la formation de cette monocouche thiolée à la surface des nanoparticules,⁵⁷ comme décrit dans les équations 1 et 2. Si on considère une couche supérieure d'oxyde à la surface des particules, la réduction par les thiols entraîne alors la formation d'eau. En l'absence d'oxydes, on suit l'équation 2 avec formation d'hydrogène. La formation d'une liaison or-thiolate en présence de disulfures est un procédé d'oxydo-réduction où la surface d'or est oxydée et la liaison S-S est rompue. (équation 3).



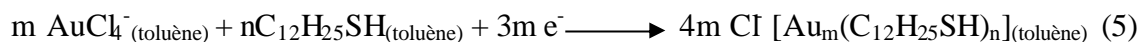
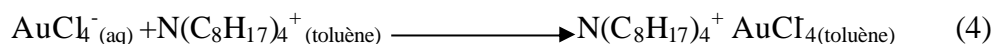
Trois facteurs doivent être pris en considération pour la réalisation d'une monocouche d'alcane-thiol stable : l'adsorption du groupement soufré à la surface de la particule, les

⁵⁶ M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir*, **1993**, 9, 3408.

⁵⁷ L.M. Liz-Marzàn, P.V. Kamat, *Nanoscale Materials*, **2003**, Kluwer academic publishers, Dordrecht.

interactions entre les chaînes alkylées et l'interaction entre le groupement de la fonction terminale et le milieu.

La technique utilisée se rapproche de la synthèse en deux phases de Faraday⁵⁸ et utilise des thiols fortement liés à l'or. HAuCl_4 est dissous dans le toluène en présence de bromure de tétraoctylammonium (agent de transfert de phase) et réduit par NaBH_4 en présence de dodécane-thiol



En 1994, Schiffrin et Brust publièrent une méthode de synthèse de AuNPs en présence d'alcanethiols qui révolutionna le monde des nanotechnologies.⁵⁹ En effet, les AuNPs obtenus par cette méthode simple étaient stables thermiquement et par rapport à l'air mais aussi d'une taille jamais obtenue jusque là (1,5 à 5,2 nm) ce qui permettait leur isolement et leur redispersion dans de nombreux solvants organiques sans agrégation irréversible ou décomposition. Cette stabilité augurait donc une grande facilité de manipulation et une grande variété d'application avec une grande flexibilité de caractérisation.

Brust étendit cette technique de synthèse avec la réalisation de nanoparticules stabilisées par le mercaptophénol en une seule étape (Figure 8), ce qui ouvrit la voie vers la synthèse de nanoparticules stabilisées par une grande variété de ligands thiolés.⁶⁰ Le rapport thiol/ AuCl_4^- contrôle la taille des particules, pour un rapport maximal de 1/6, on obtient des nanoparticules de l'ordre de 5,2 nm avec une dispersité de l'ordre de 10 %.

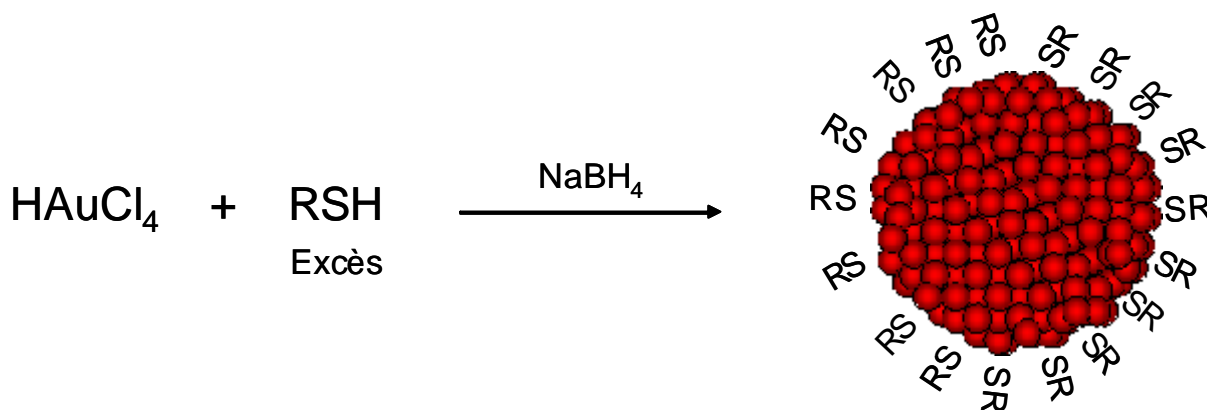


Figure 8 : synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH_4

Les ligands thiolés à la surface des nanoparticules synthétisées par la méthode de Brust possèdent la particularité de pouvoir subir une réaction d'échange avec d'autres ligands thiolés mis en solution. La cinétique de cet échange dépend de la concentration en ligands entrants et sortants. Le taux d'échange à la surface des nanoparticules décroît avec l'augmentation de la taille du ligand entrant et la longueur de la chaîne carbonée greffée à la surface des nanoparticules. Le greffage de nanoparticules à longue chaîne carbonée est ainsi préférable pour la stabilisation des AuNPs.⁶¹ Cet échange permet notamment de greffer en surface des molécules thiolées fonctionnalisées. En contre partie, l'équilibre et la répartition

⁵⁸ M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc.*, **1861**, 151, 183.

⁵⁹ M. Brust; M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin; R.J. Whyman, *Chem. Commun.*, **1994**, 801.

⁶⁰ a) M. Brust; J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. J. Kiely, *Chem. Commun.*, **1995**, 1655, b) S. Chen, *Langmuir*, **1999**, 15, 7551, c) S. Chen, R.W. Murray, *Langmuir*, **1999**, 15, 682.

⁶¹ M.J. Hostetler, A.C. Templeton, R.W. Murray, *Langmuir*, **1999**, 15, 3782.

de ces ligands à la surface des particules sont donc sensibles au milieu environnant. Des réactions d'échange avec des molécules thiolées porteuses d'une fonction hydrophile ont permis de rendre ces nanoparticules solubles en milieu aqueux et de ce fait, ont permis d'accéder à des applications biologiques.⁶²

Des nanoparticules solubles en milieu aqueux peuvent aussi être obtenues par réaction directe avec une molécule thiolée porteuse d'une fonction hydrophile (hydroxyl^{63,64}, acide carboxylique,^{60a,65} amine,⁶⁶ acide sulfonique,⁶⁷ acide boronique⁵⁶, acide phosphonique⁵⁶, thioetherocycle⁶⁸) permettant sa solubilité en solution. On a alors une équation de la forme :



La charge à la surface des particules est fonction de ce groupement et est caractérisée en mesurant le potentiel ϕ (-45,3 mV pour des AuNPs stabilisées par des dérivés acide carboxylique). La charge de surface est dépendante du pH, permettant ainsi un contrôle de la solubilité. Par exemple, les AuNPs fonctionnalisées par des molécules porteuses de groupements amines sont solubles en solution acide, tandis qu'avec une fonction acide carboxylique, elles sont solubles en milieu basique. Quand le pH change, il y a neutralisation de la charge de surface (potentiel $\phi \sim 0$), perte de solubilité et agrégation des particules.⁶⁹ Il a été ainsi démontré que les variations du potentiel ϕ correspondaient aux variations théoriques de la longueur de Debye et du potentiel de surface.⁷⁰

La liaison covalente établit par réaction entre une seconde molécule et un groupement de la première molécule greffée à la surface de l'or est une technique efficace pour fonctionnaliser une nanoparticule et obtenir des structures complexes. L'effet de l'encombrement stérique sur la réactivité à la surface de nanoparticules d'or a été étudié sur un mécanisme de substitution SN_2 .⁷¹ Le taux de réaction d'une SN_2 a été trouvé comme étant fonction de l'encombrement stérique du nucléophile substitué (la réactivité baisse quand l'encombrement augmente) et de la longueur de la molécule en surface (la réactivité augmente quand la taille augmente). Quoiqu'il en soit la réactivité reste proche d'une réaction classique en solution.

Les synthèses dérivées de celles de Brust en présence de ligands thiolés possèdent donc une grande stabilité et des capacités de fonctionnalisation importantes qui leur permettent d'accéder à une large gamme d'application. C'est la raison pour laquelle, elles représentent l'essentiel des publications sur les nanoparticules d'or.

c) Synthèse par la voie citrate

Parmi les méthodes conventionnelles de synthèse, si l'on excepte la réduction en présence de NaBH_4 , la plus répandue est la réduction d'un dérivé d'or au degré d'oxydation III (HAuCl_4) par le citrate de sodium dans l'eau. Ce procédé, mis au point par Turkevitch⁷² en 1951, permet l'obtention de AuNPs d'environ 20 nm. Le citrate et le produit de son oxydation (le

⁶² M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 293.

⁶³ C.S. Weisbecker, M.V. Merritt, G.M. Whitesides, *Langmuir*, **1996**, 12, 3763.

⁶⁴ K.S. Mayya, V. Patil, M. Sastry, *Langmuir*, **1997**, 13, 3944.

⁶⁵ S.R. Johnson, S.D. Evans, R. Brydson, *Langmuir*, **1998**, 14, 6639.

⁶⁶ A. Kumar, A.B. Mandale, M. Sastry, *Langmuir*, **2000**, 16, 6921.

⁶⁷ Y.-S. Shon, W.P. Wuelfing, R.W. Murray, *Langmuir*, **2001**, 17, 1255.

⁶⁸ N. Sandhyarani, T. Pradeep, *J. Mater. Chem.*, **2000**, 10, 981.

⁶⁹ J. Simard, C. Briggs, A.K. Boal, V.M. Rotello, *Chem. Commun.*, **2000**, 1943.

⁷⁰ K. Kimura, S. Takashima, H. Ohshima, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 7260.

⁷¹ A.C. Templeton, M.J. Hostetler, C.T. Kraft, R.W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 1906.

⁷² J. Turkevich, P.C. Stevenson, J.A. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55.

dicarboxylate d'acétone) agissent comme des agents protecteurs, cette méthode ne demande donc recours à aucun autre stabilisant comme c'est souvent le cas.

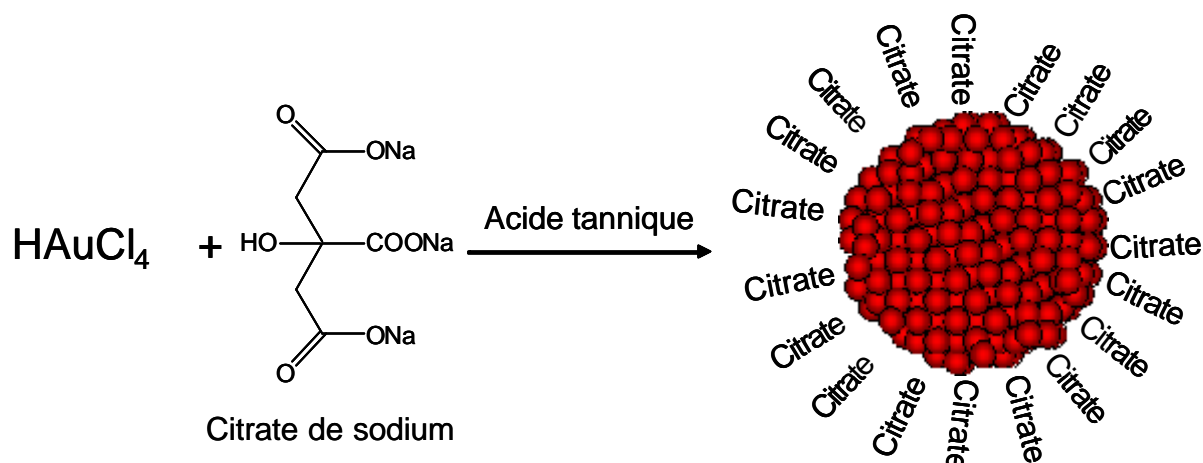


Figure 9 : Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique

Frens⁷³ reprendra en 1973 ce procédé et fera varier la taille de 16 à 147 nm en modifiant le rapport or/citrate de sodium. Ce procédé est aujourd'hui très souvent utilisé pour la préparation de matériaux AuNP-ligand exigeant une quantité contrôlée de ligands en surface. De plus récentes recherches dirigées par J.W. Slot ont permis l'accès à des AuNPs de taille inférieure à 10 nm en mettant en présence de l'acide tannique (macromolécule) lors de la synthèse des AuNPs (Figure 9).⁷⁴ Le diamètre final de la particule est inversement proportionnel à la quantité d'acide tannique utilisée. Cette méthode permet donc la préparation de solutions monodisperses de nanoparticules de taille très variable par simple modification du rapport acide tannique (réducteur rapide)/citrate de sodium (réducteur lent). Cependant, les ions citrates possèdent des liaisons trop faibles avec l'or pour permettre l'isolement des AuNPs en tant que matériau solide. L'addition de phosphanes et de thiols, qui possèdent des liaisons plus fortes avec l'or, ont permis l'accès à des AuNPs isolables sous forme solide et redispersibles dans les solvants appropriés.

d) Synthèse par d'autres ligands

D'autres ligands contenant du soufre, tels que des xanthates⁷⁵ et des disulfures,⁷⁶ des di-⁷⁷, tri-⁷⁸ et tétrathiols⁷⁹ ont été utilisés pour stabiliser des AuNPs. Les disulfures et les thioéthers ne

⁷³ G. Frens, *Nature Phys. Sci.*, **1973**, 241, 20.

⁷⁴ J.W. Slot, H.J. Gueuze, *Eur. J. Cell Biol.*, **1981**, 90, 533.

⁷⁵ O. Tzhayik, P. Sawant, S. Efrima, E. Kovalev, J.T. Klug, *Langmuir*, **2002**, 18, 3364.

⁷⁶ a) L.A. Jr Porter, D. Ji, S.L. Westcott, M. Graupe, R.S. Czernuszewicz, N.J. Halas, T.R. Lee, *Langmuir*, **1998**, 14, 7378, b) T. Yonezawa, K. Yasui, N. Kimizuka, *Langmuir*, **2001**, 17, 271, c) A. Manna, P.-L. Chen, H. Akiyama, T.-X. Wei, K. Tamada, W. Knoll, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 20, d) K. Torigoe, K. Esumi, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 2862.

⁷⁷ R. Resch, C. Baur, A. Bugacov, B.E. Koel, P.M. Echternach, A. Madhukar, N. Montoya, A.A.G. Requicha, P. Will, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 3647.

⁷⁸ N. Félidj, J. Aubard, G. Lévi, J.R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, F.R. Aussenegg, *Appl. Phys. Lett.*, **2003**, 82, 3095-3097. (b) Y. Tan, Y. Li, D. Zhu, *Langmuir*, **2002**, 18, 3392.

⁷⁹ R. Balasubramanian, B. Kim, S.L. Tripp, X Wang, M. Lieberman, A. Wei, *Langmuir*, **2002**, 18, 3676.

sont pas d'aussi bons stabilisants⁸⁰ que les thiols mais l'utilisation de polythioethers par Reinhoudt a astucieusement contourné ce problème⁸¹.

Les films minces d'isocyanates d'aryle présentent un potentiel d'application intéressant en tant que fils moléculaires, et des nanoparticules d'or recouvertes de 1,4-diisocyanates ont été formées en de larges agrégats qui examinés par spectroscopie IR et Raman montrent des liaisons carbone – or par la paire d'électrons libres.⁸²

Des nanoparticules d'or ont aussi été obtenues en utilisant l'acétone comme réducteur au lieu du citrate. Les nanoparticules obtenues sont stables en présence de BH_4^- ou d' HCl .⁸³ L'iode peut aussi remplacer les ions citrate à la surface des nanoparticules d'or par addition de KI, menant ainsi à la formation de superstructures.⁸⁴

e) Optimisation de la synthèse de nanoparticules d'or

La taille moyenne pour une synthèse donnée peut être modifiée de diverses manières, en jouant tout d'abord sur la quantité de réducteur (augmentation en réducteur pour réduire la taille), sur le volume (réduction du volume pour réduire la taille), sur la vitesse d'agitation durant l'étape de nucléation (augmentation de la vitesse pour réduire la taille), et sur la température de réaction (augmenter la température pour réduire la taille).

Une hétérogénéité en taille est souvent caractéristique d'un taux de nucléation irrégulier. Afin de réduire ces problèmes, les solutions utilisées doivent être fraîchement préparées et filtrées pour minimiser les impuretés. Dans la plupart des synthèses, la nucléation se déroule moins d'une seconde après l'addition du réducteur, c'est pourquoi, la solution réductrice doit être ajoutée rapidement avec une vitesse d'agitation suffisante pendant et après addition.

Pour les colloïdes de taille supérieure à 25 nm, on observe des altérations de la forme sphérique normale et l'apparition de formes géométriques (pentagonale, hexagonale, rhomboédrique), ces formes reflétant la nature cristalline des nanoparticules.

2. Synthèses par méthodes physiques

Outre les synthèses de nanoparticules par voie chimique, celles-ci peuvent être obtenues par des méthodes physiques. Ces synthèses partent souvent du même principe de génération d'atomes métallique en phase gazeuse poursuivi par une condensation contrôlée en nanoparticules.⁸⁵ Ces synthèses métal-vapeur sont réalisées dans un milieu dispersant adapté aux caractéristiques voulues pour la condensation et donc les nanoparticules.⁸⁶ De nombreuses modifications de cette technique ont été publiées dans le passé mais ne seront pas développées ici ; nous nous intéresserons donc uniquement aux procédés les plus récents et les plus prometteurs.

Parmi ces techniques, l'une des plus communément utilisées est l'ablation laser.^{87,88,89} Elle est réalisée par illumination UV au moyen d'un laser de particules de métal en suspension

⁸⁰ E.J. Shelley, D. Ryan, S.R. Johnson, M. Couillard, D. Fitzmaurice, P.D. Nellist, Y. Chen, R.E. Palmer, J.A. Preece, *Langmuir*, **2002**, 18, 1791.

⁸¹ X.-M. Li, M.R. de Jong, K. Inoue, S. Shinkai, J. Huskens, D.N. Reinhoudt, *J. Mater. Chem.*, **2001**, 11, 1919.

⁸² J. Chen, L.C. Calvet, M.A. Reed, D.S. Grushiba, D.W. Bennett, *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 313, 741.

⁸³ G. Li, M. Lauer, A. Schulz, C. Boettcher, *Langmuir*, **2003**, 19, 6483.

⁸⁴ W. Cheng, S. Dong, E. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 449.

⁸⁵ G. Schmid, B. Corain, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 3081.

⁸⁶ J. R. Blackborow, D. Young, *Metal Vapour Synthesis in Organometallic Chemistry*, **1979**, Springer Verlag, New York.

⁸⁷ M. S. Yeh, Y. S. Yang, Y. P. Lee, H. F. Lee, Y. H. Yeh, C. S. Yeh, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 6851.

⁸⁸ M.S. Sibbald, G. Chumanov, T.M. Cotton, *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 4672.

⁸⁹ F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, H. J. Sawabe, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 8333.

dans une solution adéquate ou sous forme de film trempé dans la solution. Cette illumination UV génère des électrons hydratés, les radicaux organiques réducteurs réduisent les ions métalliques, ce qui provoque des niveaux de valence inhabituels. Par exemple, les ions argent sont réduits en atomes en solution (équation 7) et coalescent ensuite pour former des particules plus grosses.⁹⁰



Cette méthode menait à ses débuts à une large distribution de taille de nanoparticules mais a été grandement améliorée par la réduction de taille par induction laser. Ce procédé est basé sur la résonance plasmon des nanoparticules d'or autour de 520 nm et permet de changer la taille et la morphologie des nanoparticules.^{91,92,93,94,95} Des nanoparticules de faible dispersité en taille ont ainsi pu être obtenues avec des diamètres de 1,7 nm et 3,4 nm par irradiation laser à 532 nm d'or métallique dans une solution diluée de dodécylsulfate de sodium.⁹⁶ Une autre méthode basée sur la dispersion d'atomes métalliques en solution a été publiée récemment.⁹⁷ Des atomes d'or sont générés à partir d'un morceau d'or dans un réacteur et ensuite congelé à 77 K dans l'acétone sous forme vapeur puis réchauffés afin de donner des colloïdes d'or. Ces nanoparticules réagissent ensuite avec du dodécane-thiol afin d'obtenir une stabilisation satisfaisante et une bonne dispersion dans le toluène.

IV. Application des nanoparticules d'or à la microscopie par fluorescence et aux puces ADN

A. Introduction à la microscopie par fluorescence

L'imagerie microscopique s'est perfectionnée avec l'évolution des microscopes. Le microscope photonique (ou optique) est le descendant des premiers microscopes inventés en Hollande au XVII^{ème} siècle et qui, sans cesse développés au cours des siècles, ont contribué si puissamment à notre connaissance du monde microscopique, dans tous les domaines des sciences expérimentales de la physique à la chimie, à la biologie. Au cours du dernier siècle, l'utilisation d'autres ondes que la lumière a permis la naissance du microscope électronique et du microscope à rayons X qui ont repoussé encore plus bas les « limites du visible ».

Le microscope photonique utilise les radiations du spectre visible (la lumière), le proche infrarouge ou l'ultraviolet. La propagation de ces radiations est déviée et focalisée par des lentilles de verre.

Un microscope traditionnel est constitué des principaux éléments suivants:

- une source de rayonnement lumineux et un dispositif d'éclairage de l'objet;
- une optique constituée de plusieurs lentilles assurant la fonction d'agrandissement;
- un détecteur permettant l'observation ou l'enregistrement de l'image (oeil, émulsion photographique, caméra et moniteur TV).

⁹⁰ A. Henglein, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 5457.

⁹¹ F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, H. J. Sawabe, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 9111.

⁹² P.V. Kamat, M. Flumiani, GV Hartland., *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 3123.

⁹³ H. Kurita, A. Takami, S. Koda, *Appl. Phys. Lett.*, **1998**, 72, 789.

⁹⁴ A. Takami, H. Kurita, S. Koda, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 1226.

⁹⁵ F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 9050.

⁹⁶ F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 7575.

⁹⁷ S. Stoeva, K. J. Klabunde, Ch. M. Sorensen, I. Dragieva, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2305.

Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

-soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.

-soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.

-soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie en fluorescence.

Parmi ces différentes techniques, la microscopie en fluorescence a permis une avancée importante dans la détection cellulaire. Cette variante exploite la capacité qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière quand on les éclaire avec une lumière de longueur d'onde inférieure. Dans son principe, la lumière émise par une source de lumière blanche est filtrée pour isoler la longueur d'onde qui va exciter la préparation puis focalisée sur la zone d'observation par l'objectif. La lumière émise est captée par l'objectif, filtrée pour isoler les longueurs d'ondes parasites qui pourraient brouiller le signal (comme la longueur d'onde d'excitation par exemple) puis observée (Figure 10).

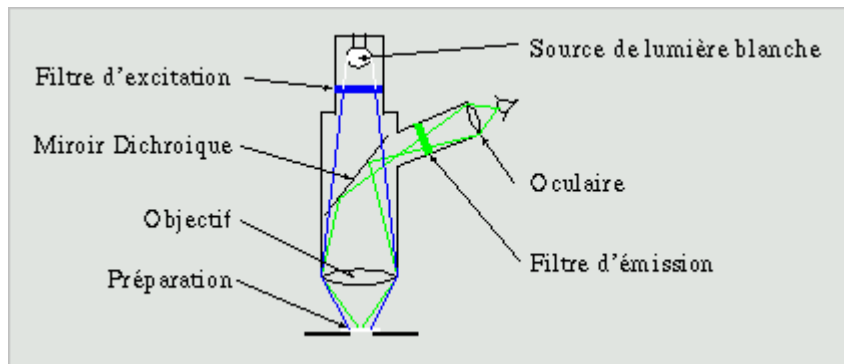


Figure 10 : montage de microscopie en fluorescence

L'image obtenue est l'inverse de celle obtenue en lumière directe, les objets observés se détachent en lumineux sur le fond sombre, le contraste final étant alors beaucoup plus élevé, comme le montre la Figure 11.

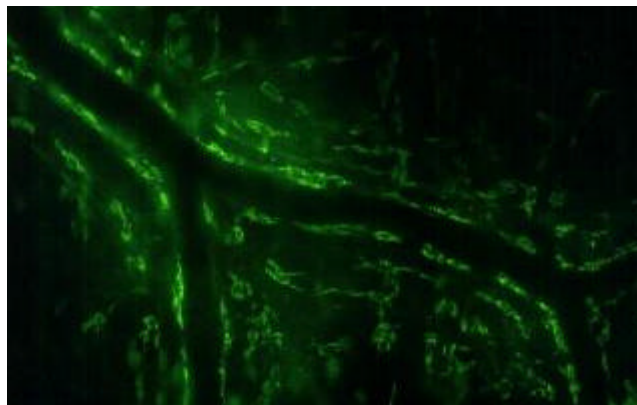


Figure 11 : image en microscopie par fluorescence⁹⁸

Dans cet exemple, une molécule fluorescente la fluorescéine isothiocyanate (FITC) qui fluoresce en vert quand elle est éclairée avec une lumière bleue est greffée à une molécule de BSA (Serum Albumine Bovine). La BSA-FITC est injectée dans la circulation sanguine. Elle est retrouvée dans certains tissus en dehors des vaisseaux. Ce genre de technique permet de

déterminer la répartition d'une substance dans l'organisme et la perméabilité vasculaire au niveau local (la fluorescence peut être dosée).⁹⁸

Afin d'améliorer le pouvoir de discrimination optique à travers l'épaisseur d'un échantillon transparent, le microscope confocal à balayage laser est apparu récemment sur le marché. Dans cet instrument, la source et le détecteur sont focalisés simultanément en un même point de l'échantillon par un jeu adapté de trous d'épingle (diaphragmes), de miroirs et d'objectifs communs (Figure 12). L'échantillon est éclairé et sondé point par point, de façon successive grâce à un mécanisme de balayage optique du faisceau.

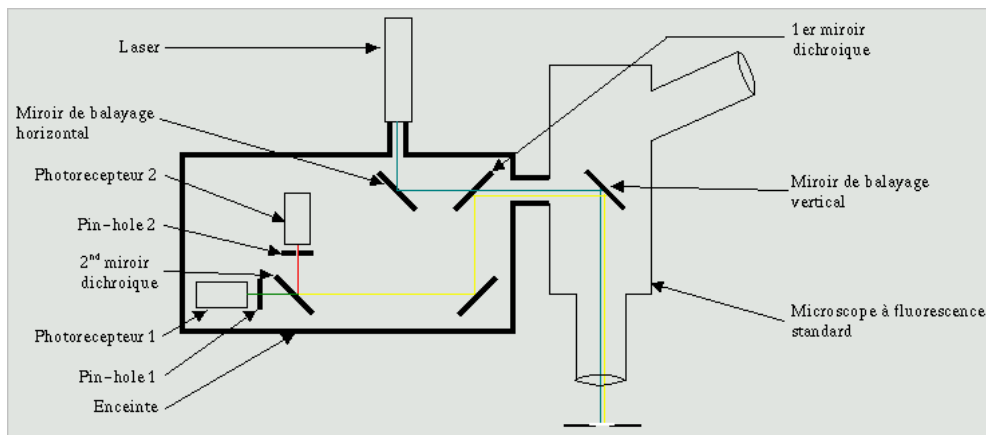


Figure 12 : montage de microscopie confocale par fluorescence⁹⁸

Ce principe permet d'éliminer totalement la lumière qui ne provient pas du plan de mise au point optique. Par conséquent, on a ainsi accès à un contraste amélioré, une très faible profondeur de champ (de l'ordre de $0,5 \mu\text{m}$) tout en conservant une résolution latérale de $0,2$ à $0,3 \mu\text{m}$ par utilisation d'objectifs à immersion de forte ouverture numérique. Ce microscope confocal, permettant de réaliser des observations tridimensionnelles avec une résolution submicronique dans les trois directions, représente le développement le plus important de la microscopie photonique au cours des dix dernières années, en particulier dans le domaine tissulaire et cellulaire lorsqu'il est utilisé avec des marqueurs fluorescents spécifiques.

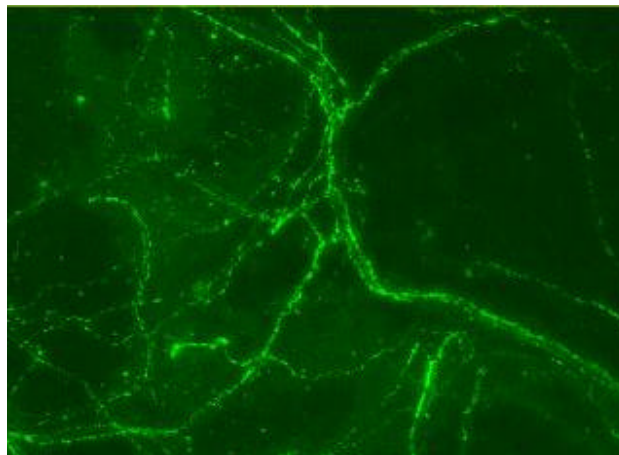


Figure 13 : image en microscopie par fluorescence⁹⁸

La Figure 13 montre un exemple d'image obtenue avec un microscope confocal. Ces fibres nerveuses sympathiques sont révélées par un anticorps anti tyrosine hydroxylase marqué par le FITC. L'image est la reconstitution par addition de 20 plans-images espacés de $0,6 \mu\text{m}$. On

⁹⁸ <http://webiologie.free.fr/techniques/microscopie/index.html>

peut constater par rapport aux images en fluorescence standard la netteté supérieure conservée pour toute la préparation malgré la forte épaisseur (12 μm) ce qui permet de voir des fibres continues.

L'utilisation de fluorophores nanoparticulaires a donc soulevé un intérêt grandissant dans le marquage cellulaire spécifique permettant ainsi la visualisation des cellules marquées. Les « quantum dots » (en particulier à base de CdSe) présentent ainsi, de par leur taille nanométrique et leurs propriétés de luminescence modifiables, des résultats intéressants pour la détection cellulaire par fluorescence.⁹ Les nanoparticules d'or ont par ailleurs été utilisées en tant qu'agent de contraste pour la microscopie confocale par réflexion et permettent une amélioration de la détection due à leur section efficace élevée.^{42,99}

B. Assemblage nanoparticule d'or-ADN : application aux biopuces

La recherche de séquences spécifiques d'ADN connaît actuellement un essor exponentiel, autant dans le domaine de la recherche médicale que dans la surveillance du domaine agro-alimentaire. Le champ d'application de la détection de séquences spécifiques est vaste et explique cet engouement de la communauté scientifique pour de nouveaux outils de détection plus performants ou plus pratiques. La méthode couramment employée est l'utilisation d'isotopes radioactifs (^{32}P , ^{35}S) comme marqueurs de l'hybridation moléculaire, mais cette technique de part son coût et sa difficulté de mise en œuvre reste cantonnée à des laboratoires spécialisés. C'est pour pallier à cette difficulté et étendre la technique au plus grand nombre que de nouvelles méthodes notamment à base de nanoparticules d'or sont développées.¹⁰⁰

Les outils de la détection de l'ADN les plus utilisés sont les biopuces (ou puces ADN) (Figure 14). Elles sont généralement constituées d'un support solide (plaque de verre en général) sur lequel sont fixés des oligonucléotides composés d'un seul brin constituant des sondes. Ces brins d'ADN sont donc complémentaires de séquences dites cibles et leur mise en présence entraînera la formation d'un double brin selon les mécanismes d'appariement définies par Crick et Watson (hybridation). Ce double brin possède alors une structure stable en double hélice. Les oligonucléotides cibles sont porteurs d'un marqueur sous forme d'un composé fluorescent ou radioactif permettant leur détection sur le support. Avant détection, le support est au préalable lavé afin que seuls les brins hybridés restent à la surface. La détection d'une séquence d'un brin inconnu de n bases nécessite donc de tester individuellement des sondes dont les séquences correspondent à toutes les combinaisons des n bases complémentaires. On détermine alors la séquence ADN analysée en fonction des recombinaisons. L'atout principal de ces biopuces est de pouvoir procéder sur un même substrat à l'ensemble de ces tests. Pour cela, on procède à des milliers de dépôts localisés (de quelques centaines de microns) de chaque molécule sonde, ce qui permet de limiter la quantité de produit nécessaire et la taille des puces à quelques cm^2 .

⁹⁹ S.A. Boppart, A.L. Oldenburg, C. Xu, D.L. Marks, *Journal of Biomedical Optics*, **2005**, 10, 041208.

¹⁰⁰ L. Malaquin, *Dispositifs ultra-sensibles pour le Nano-adressage électrique. Application à la détection de biomolécules*, Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier - Toulouse III, **2004**, n° d'ordre 30163.

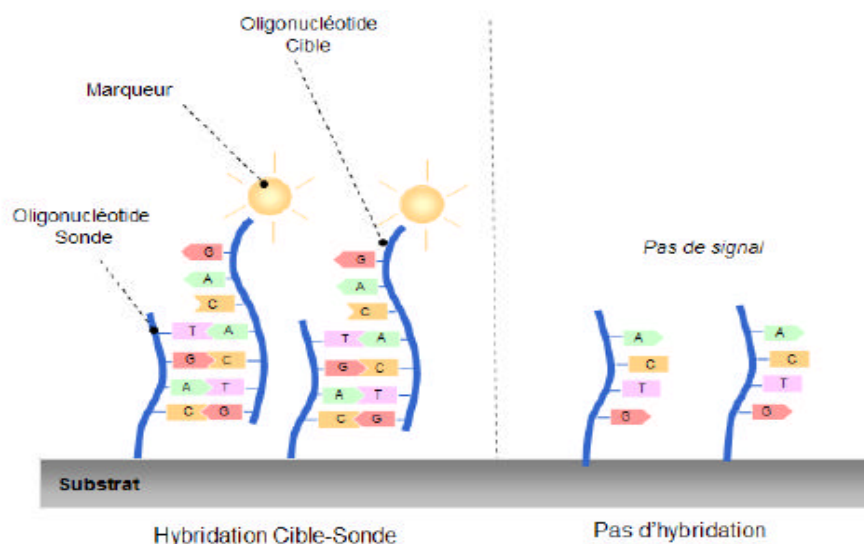


Figure 14 : représentation d'une biopuce

Les nanoparticules d'or de part leurs caractéristiques physiques et chimiques sont des candidats idéaux comme marqueurs d'oligonucléotides. En effet, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques totalement différentes de celles des matériaux massifs, ce qui permet de les utiliser dans la bio-détection. Ainsi, comme nous avons pu le voir précédemment, les nanoparticules d'or entre 5 et 20 nm présentent une bande d'absorption (plasmon) autour de 520 nm qui permettra leur détection. Leurs multiples possibilités de fonctionnalisation en surface grâce à leur affinité pour les groupements thiols permettent de greffer un large éventail de composés (silanes, polymères, protéines ou acides nucléiques) et ainsi d'ajouter des fonctionnalités pour leur détection (magnétisme, fluorescence). Les méthodes de détection de séquences d'ADN utilisant les nanoparticules d'or sont nombreuses. On peut les différencier en deux classes : les méthodes permettant une mesure directe de la reconnaissance biologique cible/sonde (méthodes optiques et colorimétriques) et celles nécessitant un transducteur permettant de traduire la reconnaissance par un signal électrique (méthodes mécaniques et électroniques).

Les nanoparticules d'or ont donc été largement utilisées pour la détection indirecte de l'hybridation grâce aux nombreuses variations physiques engendrées par leur immobilisation sur les biopuces (détecteurs calorimétrique,¹⁰¹ mécanique,¹⁰² voltamétrique,^{44a} électrochimique,^{103,104,105} et électrique^{44b,44c}). Cependant, la détection colorimétrique semble une technique plus séduisante pour une détection simple de l'hybridation. Du fait de l'importance des besoins potentiels en détection de séquences d'ADN spécifiques (disposant des qualités précédentes), les efforts de certains laboratoires se sont portés sur le développement de méthodes de détection colorimétriques.^{106,107,108} Ces dernières ont comme principal avantage de ne nécessiter aucun appareil de mesure complexe ou onéreux. La détection visuelle, se fait le plus souvent en solution et l'encombrement du dispositif

¹⁰¹ A. Gourishankar, S. Shukla, K.N. Ganesh, M. Sastry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 13186.

¹⁰² N. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1547.

¹⁰³ K. Kerman, Y. Morita, Y. Takamura, M. Ozsoz, E. Tamiya, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 510, 169.

¹⁰⁴ J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 500, 247.

¹⁰⁵ M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 2181.

¹⁰⁶ R. Elghanian, J. Storhoff, R. Mucic, R. Letsinger, C.A. Mirkin, *Science*, **1997**, 277, 1078.

¹⁰⁷ K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8102.

¹⁰⁸ R. Jin, G. Wu, Z. Li, C.A. Mirkin, G.C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 1643.

expérimental est minimal. Les nanoparticules employées pour ce type de détection colorimétrique sont constituées simplement de nanoparticules stabilisées par des alcanethiols et fonctionnalisées par un ou plusieurs oligonucléotides. L'utilisation des nanoparticules d'or pour la détection colorimétrique est liée à la variation de l'absorption de la bande plasmon en fonction de la distance interparticulaire. Cette méthode a été développée par différentes équipes en basant leur principe de détection sur l'agglomération des nanoparticules lors de la formation des complexes cible-sonde (passage du rouge au bleu/violet) (Figure 15).

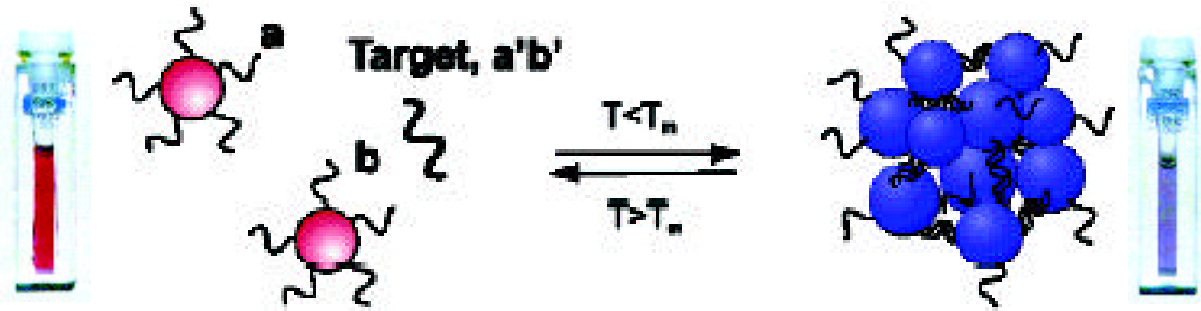


Figure 15 : détection colorimétrique par décalage de la bande plasmon de l'or du rouge vers le bleu.¹⁰⁸

L'aggrégation en réseau, c'est-à-dire la réduction des distances inter-particulaires par « attachement » des nanoparticules au moyen d'une hybridation cible-sonde, n'est pas la seule méthode pour déplacer la bande de résonance plasmon. En effet, d'autres travaux montrent que l'agglomération des nanoparticules peut être causée par les forces de London et de van der Waals.¹⁰⁷ Dans ce procédé, ce n'est pas le brin d'ADN cible qui réduit la distance entre les particules, provoquant leur aggrégation, mais la diminution des forces électrostatiques répulsives interparticulaires, provoquée par la formation d'un complexe cible-sonde. L'aggrégation est facilitée par une concentration relativement élevée en NaCl, qui contribue à écranter les forces répulsives. La formation de ce complexe, en neutralisant les charges négatives à la surface des particules, provoque leur agglomération par augmentation relative des forces électrostatiques attractives. La faible adsorption non spécifique des nanoparticules a par ailleurs été démontrée, indiquant ainsi la fiabilité de la détection (Figure 16).¹⁰⁷ L'expérience effectuée met ainsi en évidence la capacité de ce type de détection à mettre en évidence un défaut d'appariement sur le site terminal. On observe ici une précipitation quasi-complète des nanoparticules pour une hybridation normale (B) tandis qu'en présence d'un seul défaut d'appariement (C) les nanoparticules restent en solution.

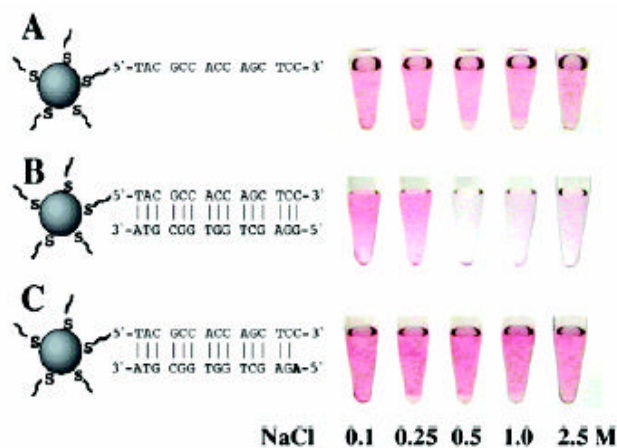


Figure 16 : mise en évidence de l'hybridation non spécifique (A) solution non hybridée, (B) solution après hybridation, (C) solution après hybridation sur particules porteuses d'oligonucléotides avec un défaut terminal.

Une étude sur la variation de la taille des nanoparticules a par ailleurs démontré que l'utilisation de nanoparticules de tailles différentes (50 et 100 nm) pouvait entraîner, après hybridation, une absorption respectivement dans le vert et l'orange,¹⁰⁹ permettant ainsi d'envisager des détections multicolores de différents brins ADN.

Alors que la grande majorité des méthodes de détection colorimétriques utilisent des nanoparticules d'or fonctionnalisées, de nouvelles méthodes mettant à profit les propriétés électrostatiques différentes des brins d'ADN simples et doubles (hybridés) se développent.^{106,107} L'emploi de nanoparticules d'or non modifiées devient alors possible, ce qui évite ainsi leur fonctionnalisation, parfois délicate. Lorsque l'on met en solution tampon NaCl des nanoparticules d'or non modifiées préparées par réduction par du citrate de sodium et des brins d'ADN sonde, ces derniers, grâce à leur structure flexible, peuvent se dérouler pour éloigner leur squelette phosphate des ions citrates adsorbés sur les particules d'or. Les forces attractives de van der Waals deviennent alors suffisamment importantes pour permettre l'adsorption de ces brins sur les particules. Cette adsorption stabilise les nanoparticules et les protège contre l'agrégation même à des concentrations en sel qui d'ordinaire écranteraient la répulsion causée par les ions citrates.¹¹⁰ Lorsque l'on ajoute des brins d'ADN cible, les doubles brins d'ADN obtenus par hybridation, du fait de leur géométrie stable en double hélice, exposent leur squelette phosphate aux ions citrates adsorbés. La répulsion électrostatique qui en résulte ne permet pas l'adsorption sur les particules d'or des brins d'ADN hybridés. Les nanoparticules ne sont alors plus protégées de l'agrégation. Elles s'agglomèrent, ce qui provoque une modification de la coloration de la solution, qui passe du rouge/rosé au bleu/violet, comme le montre la Figure 17.

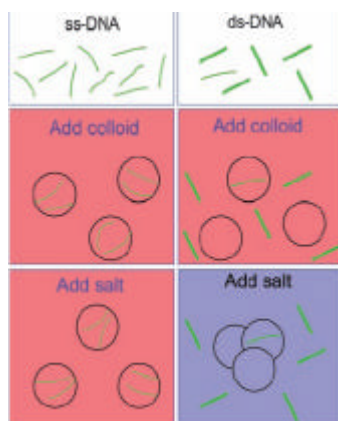


Figure 17 : Représentation schématique de la méthode de détection colorimétrique de l'ADN utilisant des nanoparticules d'or non modifiées¹¹⁰

Les méthodes basées sur l'agrégation des nanoparticules ont donc donné des résultats concluants dans la détection ADN sur biopuces. On peut cependant s'interroger sur la reproductibilité de ces mesures tant la stabilité (donc l'agrégation) des nanoparticules d'or est sujette à de nombreux paramètres (acidité, force ionique, concentration etc.). De plus, si cette technique convient à l'analyse ADN sur biopuces, son application à la détection de biomolécules est, par son système, limitée à la détection in vitro. Si la plupart des méthodes de détection colorimétriques développées actuellement se font en solution, une récente étude sur bandelette a donné des résultats intéressants et préfigure certainement des futures applications commerciales de ces méthodes.¹¹¹

¹⁰⁹ T.A. Taton, G. Lu, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5164.

¹¹⁰ H. Li, L. Rotherberg, *PNAS*, **2004**, 101, 14036.

¹¹¹ K. Glynou, P. Ioannou, T. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 4155.

A l'heure actuelle, l'utilisation de la fluorescence pour la détection de biomolécules constitue la méthode la plus fréquemment rencontrée en biologie. Le principe de la détection est basé sur le marquage des molécules étudiées par des molécules fluorescentes. Ces molécules sont caractérisées par une longueur d'onde d'excitation et d'émission. Les marqueurs luminescents sont nombreux sur le marché et couvrent une large gamme de longueurs d'onde. Les difficultés de cette méthode résident dans le marquage des molécules, les basses sensibilités et les pertes de fluorescence par les phénomènes de quenching et de photoblanchiment. Des études sur les nanoparticules d'or ont donc aussi essayé de résoudre ces problèmes notamment pour l'analyse ADN sur biopuces. Les nanoparticules d'or ne possèdent pas de propriété de fluorescence si l'on excepte de récents travaux qui révèlent leur fluorescence dans des conditions expérimentales très spécifiques (laser Ti/saphir, pulsation <100 fs, excitation à 790 nm).¹¹² Ces nanoparticules ont été utilisées comme plates-formes pour le transport combiné d'oligonucléotides et de molécules fluorescentes. L'emploi de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des molécules fluorescentes permet une détection plus simple par amélioration du signal émis bien que cela pose un nouveau problème : l'absorption par la particule du signal fluorescent émis, appelée extinction ou quenching. On peut néanmoins utiliser le phénomène de quenching pour ne rendre visibles que des brins d'ADN dans un état hybridé. Des méthodes ont ainsi été développées sur ce principe^{46,45,113} et utilisent des séquences d'oligonucléotides sondes possédant à une extrémité un groupement permettant le greffage sur la nanoparticule d'or (par exemple, un thiol) et à l'autre, un fluorophore (Figure 18).⁴⁶ La séquence sonde s'assemble à une nanoparticule d'or dans une conformation contrainte, ce qui provoque le quenching du fluorophore par la nanoparticule métallique, du fait de leur proximité. L'hybridation avec la séquence cible complémentaire provoque un changement de conformation qui rétablit la fluorescence du marqueur, comme le montre la Figure 18. Le marqueur, alors trop éloigné de la nanoparticule, ne subit plus le quenching, et l'hybridation, via la fluorescence, est aisément détectée. L'intérêt de cette technique est que l'emploi d'une molécule hybride bio-inorganique augmente considérablement la fluorescence du marqueur, tout en améliorant l'hybridation cible-sonde grâce à la conformation contrainte de cette dernière.

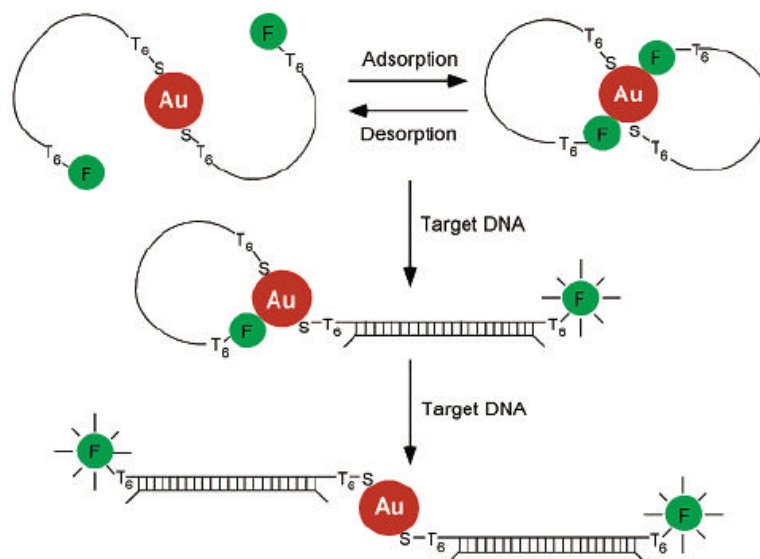


Figure 18 : Représentation schématique de l'emploi de molécules hybrides bio-inorganiques à conformation contrainte utilisant le quenching des brins non hybridés.⁴⁶

¹¹² R.A. Farrer, F.L. Butterfield, V.W. Chen, J.T. Fourkas, *Nanolett.*, **2005**, 5, 1139.

¹¹³ H. Li, L.J. Rotherberg, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 5414.

D'autres problèmes sont rencontrés avec l'utilisation de fluorophores. Il s'agit de phénomènes de photoblanchiment et de désorption de la surface des nanoparticules métalliques. On peut y remédier notamment en formant une coque de silice autour des nanoparticules d'or fonctionnalisées (Figure 19).⁴⁷ Zhou et Zhou décrivent ainsi un procédé multi-étapes, par lequel ils greffent dans un premier temps des oligonucléotides thiolés porteurs à leur autre extrémité d'un fluorophore de type cyanine puis réalisent en deux étapes une coque de silice par greffage de dérivés siloxanes et enfin greffent sur cette couche de silice un oligonucléotide pour la reconnaissance et l'hybridation du marqueur.

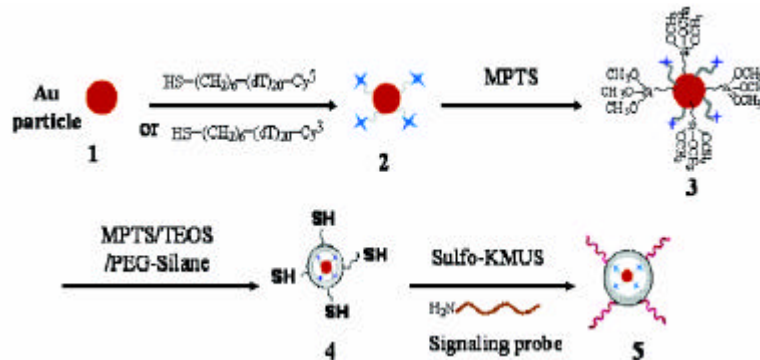


Figure 19 : protection des fluorophores greffés sur les nanoparticules d'or par une coque de silice.⁴⁷

Cette structure «core-shell» renfermant une centaine de fluorophores permet une meilleure stabilité des fluorophores dans le temps et révèle une augmentation de sensibilité d'un ordre de grandeur par rapport au fluorophore seul. Ces résultats encourageants montrent que l'utilisation de nanoparticules d'or comme plates-formes pour le greffage multiple de fluorophores et d'oligonucléotides permet d'augmenter significativement l'intensité de fluorescence. On peut cependant déplorer la complexité de la synthèse et le coût qu'elle implique si on ajoute à cela le prix exorbitant des fluorophores couplés aux oligonucléotides qu'elle utilise. De ce point de vue, leur application commerciale semble bien compromise. La recherche de nouveaux marqueurs fluorescents plus performants pour la microanalyse de l'ADN passe donc par des protocoles de synthèses plus simples et moins onéreux si ces études veulent être viables économiquement à terme.

V. Introduction à l'imagerie par résonance magnétique (IRM)

A. Historique et application de l'IRM

La résonance magnétique nucléaire est une technique en développement depuis une cinquantaine d'années. Le phénomène physique a été conceptualisé en 1946 par Bloch et Purcell,¹¹⁴ prix Nobel de physique en 1952. Cette technique a depuis été largement utilisée par les chimistes, puis les biologistes. Les premiers développements en Imagerie par Résonance Magnétique datent des années 70 ; Damadian en démontrant que les T_1 et T_2 des tissus normaux et cancéreux diffèrent, engendrent un engouement clinique pour cette technique.

¹¹⁴ a) E. U. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 37, b) F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 127.

Lauterbur réalise les premières images de deux capillaires puis d'un poivron en 1973.¹¹⁵ Les premières images chez l'homme ont été réalisées en 1976 par Moor et Hinsaw.¹¹⁶ Cette année là, Mansfield met au point une technique d'imagerie ultrarapide qui ne cessera de s'améliorer : l'échoplanar. Au début des années 80, l'IRM commence à se diffuser et à s'imposer en routine clinique, d'abord aux Etats-Unis puis dans le reste du monde, bouleversant plus encore que toutes les autres nouvelles techniques d'imagerie les protocoles d'examen radiologiques. Aujourd'hui, après 20 ans d'évolution, l'IRM est devenue une technique majeure de l'imagerie médicale moderne. Potentiellement, elle est appelée encore à des développements importants.

L'IRM étudie avec une grande précision de nombreux organes tels que le cerveau, la colonne vertébrale, les articulations et les tissus mous. Elle est d'une grande utilité lorsqu'une analyse très fine est nécessaire et que certaines lésions ne sont pas visibles sur les radiographies standards, l'échographie ou le scanner. Elle permet de faire des images en coupe dans différents plans et de reconstruire en trois dimensions la structure analysée. Elle recherche : au niveau du cerveau, des lésions infectieuses ou inflammatoires, des anomalies des vaisseaux, ainsi que des tumeurs ; au niveau de la colonne vertébrale, des hernies discales ; au niveau des articulations, des lésions ligamentaires ou méniscales. Elle utilise un champ magnétique (aimant) et des ondes radio. Aucune radiation ionisante n'est émise et elle est donc sans effets secondaires connus pour l'instant.

B. Principe de fonctionnement de l'IRM

L'IRM est une application de la résonance magnétique nucléaire et consiste donc à observer la réponse des noyaux des protons de l'eau soumis à l'excitation électromagnétique par un champ magnétique extérieur. Le corps est constitué de 80% d'eau et de graisse dont l'hydrogène est l'élément principal. Le proton ^1H étant très abondant et très sensible en résonance magnétique nucléaire (RMN) de part son spin de $1/2$, il rend la technique relativement précise. Placés dans un puissant champ magnétique, tous les atomes d'hydrogène s'orientent dans la même direction : ils sont alors excités par des ondes radio durant une très courte période (ils sont mis en résonance). A l'arrêt de cette stimulation, les atomes restituent l'énergie accumulée en produisant un signal qui est enregistré et traité sous forme d'image par un système informatique. Il s'agit donc d'une imagerie indirecte (comme le scanner, le doppler ou la scintigraphie) avec un algorithme de calcul permettant la reconstruction tomographique (par section) de l'image. L'idée est donc d'effectuer une section virtuelle de l'objet (en médecine, objet=patient). Pour cela, on enregistre la représentation de l'objet sous plusieurs angles de vue, et en combinant ces données, on reconstruit une coupe de l'objet à un endroit précis. L'intensité recueillie pour un élément de volume (voxel) dépend de la concentration d'eau (d'hydrogène) à l'endroit considéré, on obtient ainsi une image tridimensionnelle de la répartition d'eau dans le corps d'un patient. La quantité d'hydrogène libre est, en effet, différente selon les tissus (certains en contiennent beaucoup, comme la graisse et les tissus bien hydratés, d'autres beaucoup moins, comme l'os), entraînant des images bien différenciées. Par ailleurs, les fluides en mouvement (comme le sang) sont très bien individualisés des parties immobiles.

¹¹⁵ P.C. Lauterbur, *Nature, New Biol.*, **1973**, 242, 190.

¹¹⁶ W. Hinshaw, *Nature*, **1977**, 270, 722.

C. Magnétisme nucléaire

Le noyau de l'atome est constitué de protons et neutrons animés d'un mouvement collectif complexe comportant, pour chaque particule, une rotation individuelle autour d'un axe. Une particule qui tourne induit autour d'elle un moment cinétique ou spin (S) aligné sur son axe de rotation. Une charge qui tourne induit autour d'elle un champ magnétique appelé moment magnétique $\vec{\mu}$. Selon le modèle dit «en couche», au sein du noyau, les nucléons vont se répartir sur différentes couches d'énergie. Sur ces couches, les neutrons d'une part et les protons d'autre part s'apparient et leurs moments magnétiques s'annulent deux à deux. De ce fait, seuls les atomes à nombre impair de nucléons (ayant un nucléon isolé sur une couche externe) possèdent un moment magnétique «total» qu'on qualifie d'intrinsèque ou d'élémentaire. Seul l'atome d'hydrogène, formé d'un seul proton, joue un rôle important en imagerie. Ceci est lié au fait que l'hydrogène représentant $2/3$ des atomes de l'organisme, possède un moment magnétique élevé et donne donc lieu à un phénomène de résonance très net. La résonance magnétique nucléaire consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux sous l'action conjointe de deux champs magnétiques : un champ magnétique fixe et élevé \vec{B}_0 et un champ électromagnétique tournant \vec{B}_1 (radiofréquence).

En absence de champ, les moments magnétiques ne sont pas orientés. La somme des champs magnétiques est alors nulle et il n'y a pas de vecteur d'aimantation macroscopique ($\vec{M} = 0$). Après impulsion électrique de la radiofréquence \vec{B}_1 , le vecteur d'aimantation devient alors non nul, les protons alignés dans le champ magnétique sont alors représentés par un vecteur de magnétisation \vec{M} qui a deux composantes, la magnétisation longitudinale \vec{M}_z et la magnétisation transversale \vec{M}_{xy} . On parle de relaxation quand, après absorption de l'énergie électromagnétique fournie par \vec{B}_1 , les noyaux tendent à retrouver la distribution de Boltzmann (c'est à dire quand \vec{M} revient à sa position d'équilibre). On peut la décomposer en deux phénomènes, la relaxation longitudinale \vec{M}_z et la relaxation transversale \vec{M}_{xy} . C'est par la relaxation des protons que le phénomène de RMN devient observable. Les constantes de temps T_1 et T_2 correspondent respectivement au retour à l'équilibre énergétique des vecteurs \vec{M}_z et \vec{M}_{xy} . Elles dépendent en fait de la mobilité des atomes d'hydrogène ou de celle des molécules où ils sont engagés. On pourra ainsi différencier les organes en fonction de la nature des tissus qui les composent et des concentrations aqueuses qui les caractérisent (explications détaillées en ANNEXE II).

D. Les facteurs de qualité de l'image en IRM

En IRM, la qualité de l'image est un élément primordial dans le diagnostic. La qualité d'image dépend d'un grand nombre de paramètres dont certains (liés à l'appareillage) sont indépendants de l'opérateur ; d'autres sont accessibles lors de la programmation de la séquence. Il n'y a pas de combinaison «miracle» et l'image résultante est toujours un compromis où intervient l'ensemble de ces paramètres, la durée d'acquisition et bien évidemment la pathologie explorée. La qualité d'image est difficile à apprécier objectivement, certaines mesures physiques permettent néanmoins de l'évaluer :

- le rapport signal sur bruit ;
- le contraste ;
- la résolution spatiale.

Ces critères objectifs sont interdépendants et liés au temps d'acquisition de l'image. Pour résoudre un problème diagnostique donné, l'opérateur sera amené à privilégier l'un de ces critères.¹¹⁷

E. Les agents de contraste en IRM

Selon la méthode utilisée, le contraste entre deux voxels de nature différente peut être augmenté si les temps de relaxation des spins nucléaires (décrivant le retour à l'équilibre des noyaux après l'excitation) diffèrent dans les deux zones. Il est donc possible en théorie d'observer des altérations des tissus (telles que des tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation des protons de l'eau. Malheureusement, la différence entre tissus sains et altérés est bien souvent insuffisante pour produire une variation sensible d'intensité du signal, ce qui a donc motivé le développement de produits pharmaceutiques capables d'augmenter le contraste. Actuellement 35% des examens IRM sont pratiqués après injection d'un agent de contraste. Les agents de contraste ne sont pas des outils purement liés à l'avènement de l'IRM car les premiers agents de contraste ont été développés pour la RMN afin de séparer les différents pics du spectre en 2 dimensions.

Lauterbur, Mendoca-Dias et Rudin ont été les premiers à montrer la faisabilité d'agents paramagnétiques pour la différenciation des tissus sur la base de la différenciation des temps de relaxation des protons de l'eau. Les premières expériences sur les agents de contraste furent pratiquées sur des chiens avec des injections de solution de Mn (II) dans les tissus myocardiaux.¹¹⁸

1. Les agents de contraste : principe

Leur mécanisme d'action n'est pas direct, mais indirect : ils accélèrent la vitesse de relaxation des noyaux d'hydrogène les environnant. Ces agents ont des effets compétitifs sur le signal, à la fois positifs (rehaussement du signal) et négatifs (diminution du signal); ces effets sont différents selon la classe des produits : on distingue ainsi des agents paramagnétiques, globalement considérés comme des agents de contraste positifs et des agents de susceptibilité magnétique, globalement considérés comme des agents de contraste négatifs. Ces effets sont également variables avec la dose, sans toutefois que la relation effet-dose ne soit linéaire. Enfin on voit apparaître en IRM des produits qui, pour certains, sont des marqueurs d'autres territoires que les espaces extracellulaires : c'est le cas de la classe des agents de susceptibilité magnétique (magnétite captée par le système réticulo-endothélial (SRE) ou à tropisme lymphatique), mais également de certains produits paramagnétiques, du fait de la variété des complexes qui peuvent être utilisés et dont certains présentent une spécificité d'organe (captation hépatocytaire) ou de compartiment (secteur vasculaire). Parmi les nouveaux agents de contraste, on peut citer les particules d'oxyde de fer qui possèdent des propriétés superparamagnétiques ; ces produits sont fortement développés avec notamment des produits déjà commerciaux. De nombreux types de chélatants sont aussi au stade de développement et présentent un vif intérêt si l'on en croit la littérature existante.

¹¹⁷ B.Kastler, « comprendre l'IRM : manuel d'auto-apprentissage », Ed. Masson 2003, Paris, 103.

¹¹⁸ T.J. Brady, *Radiology*, 1982, 144, 343.

2. Les agents paramagnétiques

Leur principe consiste à utiliser des atomes au moment magnétique électronique très élevé car porteurs de nombreux électrons non appariés ; ils diffèrent ainsi de la plupart des atomes de l'organisme qui ne présentent pas de moment magnétique électronique, car ils ne possèdent pas d'électrons non appariés, et ils sont diamagnétiques. Ces produits agissent par un mécanisme d'interaction dipolaire avec le moment magnétique nucléaire des protons, quant à lui à la base du signal IRM et dont la valeur est beaucoup plus faible (d'un facteur de l'ordre de 680) que celle du moment magnétique électronique (Figure 20). Cette interaction dépend de la concentration du produit et de l'accessibilité de l'eau au produit. Cette interaction étant proportionnelle au carré du spin, plus les cations possèdent un grand nombre d'électrons non appariés et plus ils présentent d'intérêt pour cette application. Ces atomes, utilisés sous forme ionique, appartiennent à la classe des métaux de transition (chrome, manganèse, fer) ou des lanthanides (gadolinium, dysprosium). Le gadolinium Gd^{3+} possédant 7 e^- non appariés est le plus intéressant, suivent le fer Fe^{3+} et le manganèse Mn^{2+} avec 5 e^- non appariés. Malheureusement, ces cations présentent une grande toxicité pour le corps humain car ils entrent en compétition avec les cations biologiques ; ils ne peuvent donc être injectés tel quel au patient dans des doses suffisantes pour avoir de bons résultats. Il a donc été nécessaire de rendre inoffensif ces ions paramagnétiques en formant des complexes non toxiques, inertes et stables. Ces ions sont complexés sous forme de chélates, par une liaison qui n'est donc pas covalente. Cette complexation masque 8 des 9 sites de coordination de l'ion gadolinium mais prévient la précipitation de gadolinium sous forme de chlorure de gadolinium, et les risques inhérents à l'ion gadolinium libre : blocage du SRE et échanges avec les ions calcium endogènes (l'ion calcium étant nécessaire à la contractilité myocardique, à la coagulation, au fonctionnement des enzymes calcium dépendant, à la respiration mitochondriale et à la neurotransmission).

Les complexes de polyaminocarboxylates de gadolinium (III) se sont révélés comme étant les plus performants.^{119,120,121} Ces complexants sont appelés chélatants et sont actuellement utilisés et commercialisés dans le domaine médical. Il en existe une grande variété.

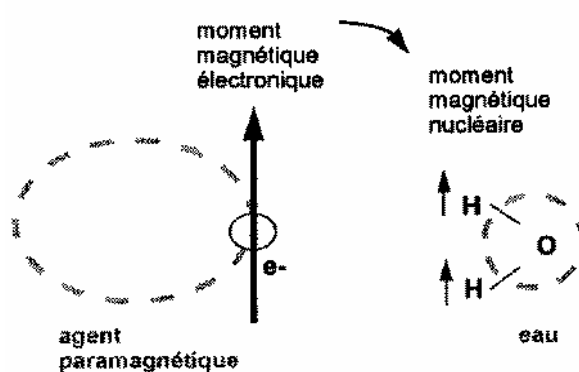


Figure 20 : interaction dipolaire entre les moments magnétiques électroniques et dipolaires

¹¹⁹ R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 901.

¹²⁰ R.C. Choppin, K.M. Schaab, *Inorg. Chim. Acta*, **1996**, 252, 299.

¹²¹ P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1999**, 2293.

a) Mécanisme

Les nombreux travaux sur les propriétés de relaxation du noyau en présence d'électrons non appariés en RMN^{122,123} ont permis une première approche dans la compréhension du phénomène en IRM. Les travaux de Lauffer¹¹⁹ ont permis de montrer que ces complexes paramagnétiques ont pour caractéristique d'augmenter les taux de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transverse $1/T_2$. Ces taux de relaxation se cumulent et donnent la relaxation observée $(1/T_i)_{\text{obs}}$ exprimée dans l'équation ci-dessous qui prend en compte la composante diamagnétique $((1/T_i)_d$ soit la relaxation en l'absence d'agent paramagnétique) et la composante paramagnétique $(1/T_i)_p$.

$$(1/T_i)_{\text{obs}} = (1/T_i)_d + (1/T_i)_p \quad i=1,2 \quad (8)$$

En l'absence d'interactions soluté - soluté, la relaxation est directement dépendante de la concentration $[M]$ en agent paramagnétique qui possède une relaxivité r_i qui lui est propre et est exprimée en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

$$(1/T_i)_{\text{obs}} = (1/T_i)_d + r_i[M] \quad i=1,2 \quad (9)$$

La relaxivité est fonction des interactions du complexe avec le milieu. La distance et le temps d'interaction sont donc les paramètres importants qui régissent l'intensité du phénomène. On distingue communément 3 types d'interactions (ANNEXE III) en fonction de ces critères.

b) Les agents de contraste paramagnétiques du gadolinium

Les premiers agents de contraste du gadolinium ont été introduits en 1988 aux Etats-Unis et 1989 en France (Gd-DTPA et Gd-DOTA). Depuis, plusieurs millions (>5) de doses ont été vendues à travers le monde.

(1) Le gadolinium

Au XVIII^e siècle, le chimiste finlandais J. Gadolin a consacré une bonne partie de sa vie à la chimie analytique et à la minéralogie. Il s'est beaucoup intéressé aux éléments du groupe des terres rares et le 64^e élément a été nommé gadolinium en son honneur.

À l'état pur, le gadolinium, élément blanc argenté au lustre métallique, ressemble à l'acier. Choisi pour son fort effet paramagnétique (10,8 magnétons de Bohr), le gadolinium existe sous forme de plusieurs isotopes stables, le plus abondant ayant la masse 158.

Comme le gadolinium est très peu répandu dans la nature, sa concentration physiologique dans les milieux biologiques est trop faible pour être détectée par les méthodes analytiques usuelles. De plus, il est très peu absorbé par le tube digestif.

Le rayon ionique de Gd^{3+} (1,02 Å) est très proche de celui du calcium (0,99 Å). Il entre en compétition avec les systèmes calcium dépendant du calcium et bloque le système

¹²² D.R. Burton, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1979**, 13, 1.

¹²³ G.N. La Mar, *NMR of paramagnetic molecules*, **1973**, Academic Press, New York

réticuloendothélial. Sous forme libre, l'ion Gd^{3+} est donc toxique. Le relargage d'ion gadolinium libre dépend théoriquement de l'affinité du chélate pour le gadolinium.

(2) Les complexes du gadolinium

La solution consiste à enfermer ces cations dans des ligands, linéaires ou cycliques pour former des complexes non toxiques, inertes et stables dans l'organisme.

Les polyaminocarboxylates de gadolinium (III) se sont révélés les plus appropriés et quatre d'entre eux sont actuellement utilisés dans le domaine médical (Figure 21):

1. $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ ou Gadopentétate de diméglumine (Magnevist[®], Schering[®])
2. $[Gd(DTPA-BMA)(H_2O)]$ (Omniscan[®], Nycomed Amersham[®])
3. $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$ ou Gadotérate de méglumine (Dotarem[®], Guerbet[®])
4. $[Gd(HP-D03A)(H_2O)]$ ou Gadotéridol (Prohance[®], Squibb[®])

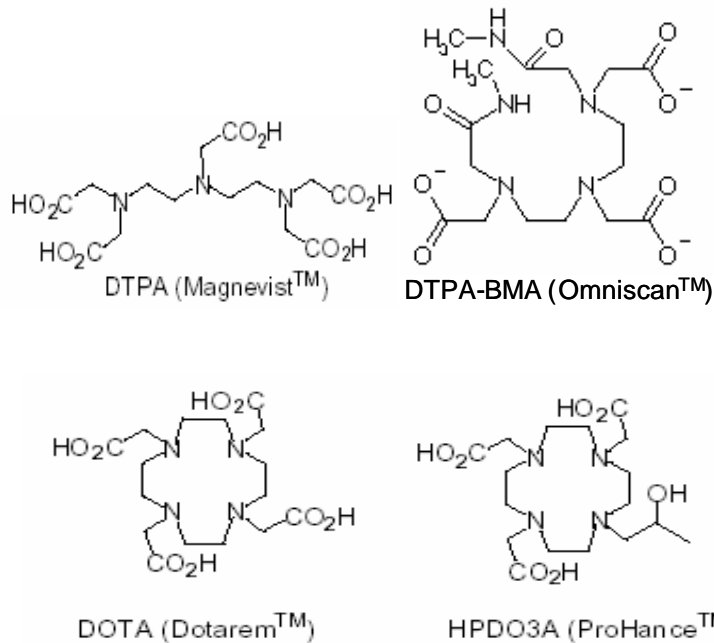


Figure 21 : agents de contrastes à base de complexes de polyaminocarboxylates de gadolinium

Les propriétés de renforcement de contraste sont sensiblement identiques pour ces quatre produits. Ils diffèrent surtout par le caractère macrocyclique ou linéaire du chélate et par le nombre de charges électrostatiques du complexe. Les caractéristiques des complexes du gadolinium sont développées en annexe IV.

3. Agents de susceptibilité magnétique

Les agents de susceptibilité magnétique sont des agents particuliers. Ils sont constitués de structures cristallines qui forment des volumes microscopiques ou domaines. En présence d'un champ magnétique, ceux-ci présentent une magnétisation beaucoup plus élevée que celle des produits paramagnétiques. Ils combinent un effet T_2 vrai, par interaction spin-spin du fait de leur forte relaxivité ρ , et de l'autre un effet T_2^* du fait d'une hétérogénéité du champ

magnétique liée à leur regroupement au sein des cellules du SRE qui les captent. Cet effet est plus particulièrement mis en évidence par l'utilisation de séquences en écho de gradient.

Le noyau cristallin de ces agents est constitué d'oxydes de fer (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) et est entouré d'un revêtement de dextran. Différents produits, distincts par la taille des particules et leur revêtement existent. Ces agents sont encore dénommés nanoparticules superparamagnétiques, en anglais : Superparamagnetic Iron Oxyde (SPIO) ou encore Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxyde (USPIO)

Du fait de la taille élevée de ces agents, ces produits subissent une capture par le SRE au niveau du foie, de la rate, des ganglions et de la moelle osseuse. Par conséquent :

- en terme de biodistribution ces produits ne sont plus des marqueurs des espaces extra-cellulaires mais des marqueurs du SRE avec pour première application clinique l'imagerie hépatique. La prise de contraste intéresse alors essentiellement le parenchyme normal, dont le signal s'affaïsse, alors que la zone pathologique ne prend pas ou peu le contraste et apparaît donc comme hyperintense au sein d'un parenchyme hépatique au signal effondré
- aucun des ces produits ne subit d'élimination rénale ;
- les particules les plus petites subissent un passage dans l'interstitium et une diffusion vers les cellules lymphatiques et les ganglions, en faisant des agents de lymphographie indirecte ;
- enfin sur le plan pharmacocinétique ces produits ont une demi-vie plasmatique de durée variable (20 à 40 min pour les plus grosses particules chez l'homme, et encore plus longue pour les USPIO) et surtout une très longue demi-vie d'élimination hépatique (11 jours chez le rat pour l'Endorem). La persistance de ces produits dans les cellules de Küpfer permet une imagerie différée, avant qu'ils ne soient biodégradés par les lysosomes de ces cellules, en 3 à 6 semaines, et que le fer libre ne soit intégré au pool de fer de l'organisme, et cela sans provoquer de surcharge aux doses utilisées.

Le premier produit à être commercialisé dans cette gamme est l'AMI 25 (Endorem[®]), constitué de particules de taille moyenne, d'environ 100 nm alors que la taille des USPIO est de l'ordre de 20 nm. Les doses préconisées sont de 0,075 mL/kg (de l'ordre de 15 $\mu\text{mol/kg}$ de fer) soit encore de 0,84 mg/kg. Ce produit est utilisé par voie intraveineuse, en perfusion lente, en utilisant un perfuseur muni d'un filtre permettant d'éliminer d'éventuels agrégats. Les réactions secondaires comportent notamment des douleurs lombaires, contemporaines de l'injection. L'imagerie est optimum entre 30 min et une heure après l'injection.

4. Effets des produits IRM sur les vitesses de relaxation et le signal

Les paramètres du contraste tissulaire en IRM relèvent des caractéristiques des tissus (densité protonique, valeur des T_1 et T_2) et de la pondération des séquences. Les produits de contraste diminuent les temps de relaxation T_1 et/ou T_2 , autrement dit ils accélèrent les vitesses de relaxation tissulaires $1/T_1$ et/ou $1/T_2$. Les vitesses de relaxation observées ($1/T_1$ et $1/T_2$) sont l'addition des vitesses intrinsèques des tissus et de l'accélération de la vitesse sous l'effet de l'agent de contraste :

$$1/T_{\text{observé}} = 1/T_{\text{intrinsèque}} + 1/T_{\text{produit de contraste}} \quad (10)$$

a) Relation concentration - vitesse de relaxation

L'efficacité de ces produits sur les vitesses de relaxation est proportionnelle à leur concentration. Cette relation permet de déterminer, pour un champ et une température donnés, leurs relaxivités r_1 et r_2 , définies par les pentes des droites des vitesses de relaxation $1/T_1$ et $1/T_2$ en fonction de la concentration $[AC]$ (Figure 22, équation 9).

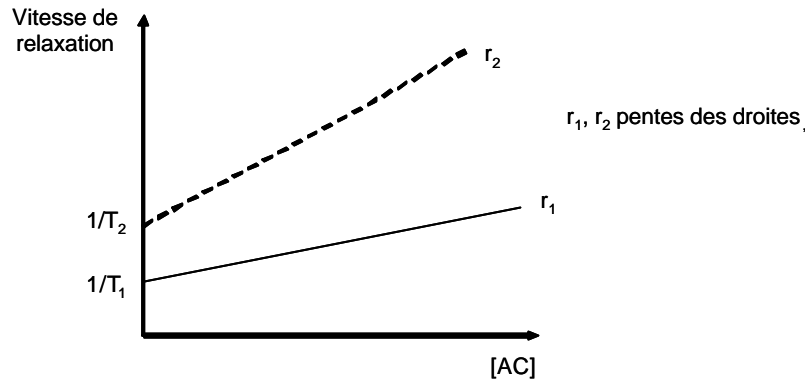


Figure 22 : variation de la vitesse de relaxation en fonction de la concentration

b) Relation entre valeurs respectives de r_1 et r_2 et classes de produits

Comme nous avons pu le voir précédemment, deux catégories de produits sont donc utilisées commercialement :

- les agents paramagnétiques, les plus courants (Gd-DTPA, Gd-DOTA) qui ont des relaxivités r_2 et r_1 du même ordre de grandeur
- les agents de susceptibilité magnétique (AMI-25) dont la relaxivité r_2 est élevée et prépondérante par rapport à la relaxivité r_1 .

Agents		r_1 (mM.s) ⁻¹	r_2 (mM.s) ⁻¹
- paramagnétiques	Gd-DTPA	4,5	5,9
	Gd-DOTA	3,8	5,8
- de susceptibilité magnétique	AMI25	23,9	98,3

Tableau 1 : relaxivité selon l'agent de contraste

c) Classes de produits et effets sur le T_1 et T_2

L'effet de ces deux classes de produits, aux doses usuelles, est globalement opposé : les agents paramagnétiques présentent un effet T_1 prépondérant ; en effet, dans la mesure où leurs relaxivités r_1 et r_2 sont du même ordre de grandeur, et les T_1 des tissus beaucoup plus élevés que les T_2 (de l'ordre de 10 fois), l'effet T_1 est prépondérant sur l'effet T_2 . Les agents de susceptibilité magnétique présentent un effet T_2 prépondérant ; la valeur très élevée de leur relaxivité r_2 , de l'ordre de 100 (mM.s)⁻¹, entraîne un tel déphasage qu'il s'exprime de façon prépondérante à tout effet T_1 .

d) Relation entre effet sur les T_1 et T_2 et effet sur le signal

Une diminution du T_1 (temps de relaxation longitudinale ou temps de repousse du signal de base après une excitation) aura pour effet, sur des séquences pondérées en T_1 , de rehausser le signal. Cet effet sera d'autant plus marqué que la pondération de la séquence en T_1 sera marquée. Les agents qui ont un effet prépondérant sur le T_1 , comme les agents paramagnétiques, sont dits agents de contraste positifs.

Une diminution du T_2 (temps mis par les protons pour se déphaser après avoir été excités) aura pour effet, sur des séquences pondérées en T_2 , mais également sur des séquences pondérées en T_1 , de diminuer le signal. Cet effet est donc moins dépendant de la séquence. Les agents qui ont un effet prépondérant sur le T_2 , comme les agents super-paramagnétiques, sont dits agents de contraste négatifs.

e) Relation concentration - effet sur le signal

La relation effet-dose, linéaire pour les vitesses de relaxation, ne se vérifie pas pour le signal IRM. En effet celui-ci est composite et fait intervenir de façon non linéaire le T_1 , le T_2 et les paramètres d'acquisition des séquences. Les calculs montrent, à faible concentration, un effet positif sur le signal, et à forte concentration, un effet négatif sur le signal. Aussi doit-on pondérer la notion que les produits de contraste paramagnétiques sont des agents de contraste positifs et les produits de susceptibilité magnétique des agents de contraste négatifs, par la concentration utilisée (Figure 23).

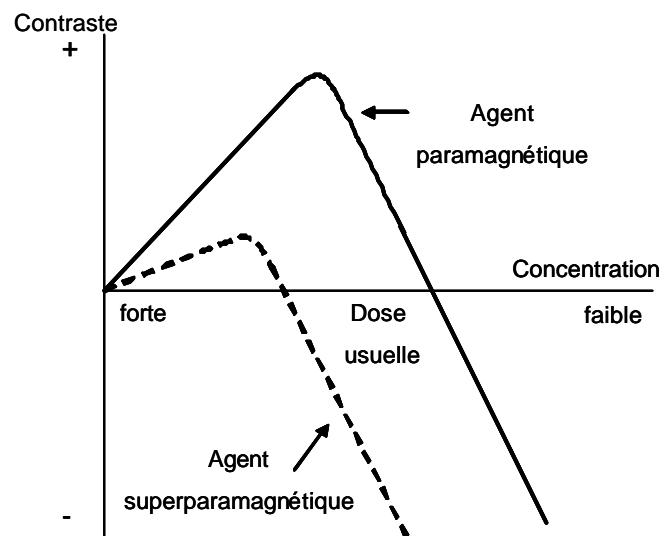


Figure 23 : Effet sur le signal selon la catégorie de l'agent de contraste et sa concentration

Ainsi, les chélates du gadolinium, agents de contraste habituellement positifs, entraînent un affaissement du signal dans les cavités excrétrices et la vessie, où il se concentrent. On peut de ce fait observer, au niveau de la vessie, sur une imagerie T_1 sur laquelle la vessie apparaît normalement en noir, un aspect en trois couches (Figure 24):

- inférieure : produit concentré et noir (effet T_2)
- intermédiaire, avec un rehaussement très marqué du signal, d'aspect blanc (effet T_1 maximum)
- supérieure, contenant une plus faible concentration de gadolinium, de couleur grise (effet T_1 intermédiaire).

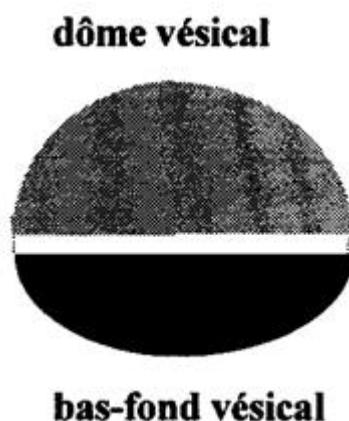


Figure 24 : contraste dans une vessie en fonction de la concentration en agent paramagnétique.

5. Développements

a) Introduction

D'autres agents paramagnétiques sont développés par l'utilisation de ligands qui offrent, soit une spécificité hépatique, et donc un rehaussement plus marqué et plus prolongé du foie sain et un rehaussement de l'arbre biliaire, soit une rémanence vasculaire, permettant d'offrir une imagerie de perfusion au premier passage, de marquer le compartiment sanguin et d'évaluer l'intégrité de la barrière capillaire. Un autre axe concerne l'utilisation, à la place du gadolinium, du manganèse, qui présente une spécificité hépatique. Globalement les développements vont soit vers des produits plus spécifiques, soit vers des produits mieux tolérés. Le risque zéro ne pourra pour autant jamais être garanti et la prise en compte du rapport risque-bénéfice sera toujours d'actualité. La complexité des synthèses organiques et les contraintes d'une recherche laissent peu de place à la diminution des coûts vers laquelle portent pourtant le poids des utilisateurs et les contraintes d'un marché concurrentiel. Le développement de nouveaux agents de contraste est donc lié aux différents paramètres évoqués précédemment qui évoluent selon la structure des complexes.

Différentes stratégies ont été développées au cours des dix dernières années pour synthétiser des agents de contraste plus efficaces à base de gadolinium : gadolinium supporté sur des macromolécules,^{124,125,126} des micelles,^{127,32} des liposomes,^{128,129} des nanoparticules^{130,131,132,133}

¹²⁴ G.-P. Yan, M.-L. Liu, L.-Y. Li, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 967.

¹²⁵ M.M. Hüber, A.B. Staubli, K. Kustedjo, M.H.B. Gray, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, 9, 242.

¹²⁶ S. Langereis, Q.G. de Lussanet, M.H.P. van Genderen, W.H. Backes, E.W. Meijer, *Macromolecules*, **2004**, 37, 3084.

¹²⁷ T.N. Parac-Vogt, K. Kimpe, S. Laurent, C. Piérart, L. Vander Elst, R.N. Muller, K. Binnemans, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 3538.

¹²⁸ W.J.M. Mulder, G.J. Strijkers, A.W. Griffioen, L. van Bloois, G. Molena, G. Storm, G.A. Konin, K. Nicolay, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 799.

¹²⁹ J.C. Frias, K.J. Williams, E.A. Fisher, Z.A. Fayad, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 16313.

¹³⁰ C. Platas-Iglesias, L. Vander Elst, W. Zhou, R.N. Muller, C.F.G.C. Geraldes, T. Maschmeyer, J.A. Peters, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 5121.

¹³¹ C.H. Reynolds, N. Annan, K. Beshah, J.H. Huber, S.H. Shaber, R.E. Lenkinski, J.A. Wortman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 8940.

¹³² Y.-S. Lin, Y. Hung, J.-K. Su, R. Lee, C. Chang, M.-L. Lin, C.-Y. Mou, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 15608.

¹³³ J.L. Turner, D. Pan, R. Plummer, Z. Chen, A.K. Whittaker, K.L. Wooley, *Adv. Funct. Mater.*, **2005**, 15, 1248.

mais aussi des nanoparticules d'oxyde de gadolinium et des gadofullerènes.¹³⁴ Ces nouveaux agents de contraste sont tous caractérisés par une augmentation du poids moléculaire et de la quantité de Gd^{3+} par agent de contraste. Le double objectif de ces agents de contraste est donc d'améliorer le contraste par l'augmentation de l'efficacité et de la concentration en gadolinium mais aussi par une augmentation du temps de rétention.

b) Agents de contraste de haut poids moléculaire

Le processus de relaxation paramagnétique est essentiellement fonction de 3 facteurs (Figure 25) :

- le temps de résidence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination du cation τ_M
- le coefficient de diffusion des protons de l'eau par rapport au centre paramagnétique τ_s
- le temps de corrélation rotationnel τ_R

Les deux premiers sont liés aux propriétés de la cage de coordination de l'ion gadolinium tandis que le temps de corrélation rotationnel peut être modulé par liaison avec des complexes de différentes dimensions.¹²¹ Des chélatants du Gd^{3+} porteurs de groupes réactifs (dérivés du DOTA ou du DTPA) ont donc été conjugués à des composés de haut poids moléculaire tels que des macromolécules,^{124,125,126} des protéines,^{135,136} des micelles, des dendrimères afin de ralentir leur vitesse de rotation et d'augmenter la relaxation.

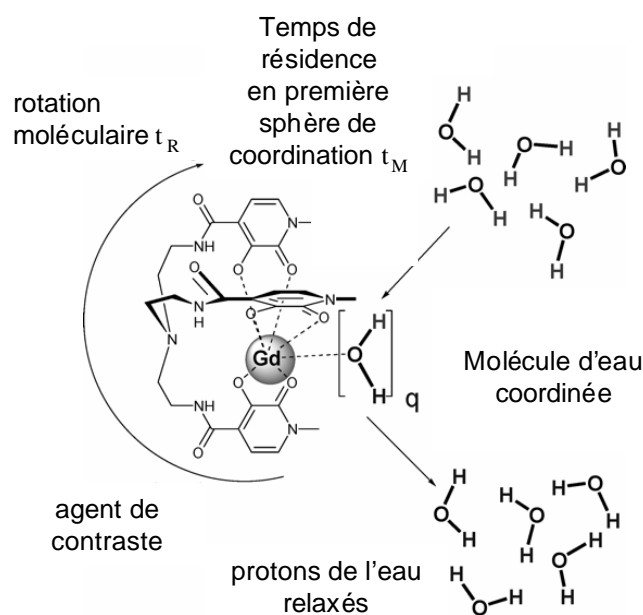


Figure 25 : paramètres influençant la relaxivité

Des macromolécules de type polymères ont donc été rapportées permettant une augmentation de la relaxivité par un facteur 2 à 3^{137,139} Ces polymères dont les nombreuses chaînes pendantes portent des entités dérivées du DTPA ont des mécanismes et des taux d'échange identiques à ces derniers, ce qui permet leur application dans des structures micellaires. Sur ce

¹³⁴ É. Tóth, R.D. Bolskar, A. Borel, G. González, L. Helm, A.E. Merbach, B. Sitharaman, L.J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 799.

¹³⁵ P. Caravan, J. M. Greenwood, J.T. Welch, S.J. Franklin, *Chem. Commun.*, **2003**, 2574.

¹³⁶ S. Aime, M. Botta, M. Fauso, E. Terreno, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 19.

¹³⁷ G.P. Yan, R.X. Zhuo, M.Y. Xu, X. Zhang, L.Y. Li, M.L. Liu, C.H. Ye, *Polym. Inter.*, **2002**, 51, 892.

même principe d'augmentation du temps de corrélation pour augmenter la relaxation, de nouvelles molécules amphiphiles porteuses de complexant du Gd ont été synthétisées afin d'obtenir des micelles comme agents de contraste pour le ciblage spécifique.^{31,32} Ces complexes montrent des résultats prometteurs supérieurs à des agents de contraste classiques (Tableau 2) avec encore de nombreuses possibilités d'évolution et de barrières à surmonter, que ce soit sur la nature et la taille du ligand ou sur la nature de la molécule bioactive pour adresser l'agent de contraste.

Les dendrimères sont, quant à eux, le résultat de synthèses multiétapes fastidieuses avec par conséquent des rendements peu élevés. Différentes équipes ont synthétisé des dendrimères à base de polyamidoamine relié à des complexants du gadolinium (DOTA ou DTPA)^{27,28,29} et ont obtenu des résultats en T₁ intéressants mais bien loin des relaxivités espérées (Tableau 2). Les études sur ces dendrimères indiquent cependant que les échanges de molécules d'eau à la surface du gadolinium sont lents ce qui est un facteur limitant pour atteindre une haute relaxivité.¹³⁸ Le taux de relaxation de ces complexes dendrimères est toutefois fortement dépendant du pH, ce qui peut être lié à la protonation des amines tertiaires du squelette PAMAM entraînant un allongement de la structure et donc une augmentation du temps de corrélation à pH bas.²⁷

	$k_{298}^{ex} [\times 10^6 \text{ s}^{-1}]$	$t_g^{298} [\text{ps}]$	$t_1^{298} [\text{ps}]$	S^2	$r_1 [\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ (20 MHz 37 °C)	Ref.
dendrimères						
Gadomer 17	1,0	3050	760	0,50	17,18	28
G5-(GdEPTPA) ₁₁₁ (pH 6.0)	150	4040	150	0,43	23,9	27
G5-(GdEPTPA) ₁₁₁ (pH 9.9)	180	2950	125	0,36	13,7	27
polymères linéaires						
[Gd(DTPA-BA)(CH ₂) ₁₀ (H ₂ O)]	0,66	2900	490	0,35	15,38 ^[a]	139
[Gd(DTPA-BA)(CH ₂) ₁₂ (H ₂ O)]	0,50	4400	480	0,35	19,55 ^[a]	139
[Gd(EGTA-BA)(CH ₂) ₁₂ (H ₂ O)]	2,2	3880	321	0,25	12,60 ^[a]	140
micelles						
[Gd(DOTAC12)(H ₂ O)]	4,8	1600	430	0,23	17,20 ^[b]	141
[Gd(DOTAC14)(H ₂ O)]	4,8	2220	820	0,17	17,83	141
[Gd(DOTASAC18)(H ₂ O)]	4,8	2810	330	0,28	15,63 ^[c]	141

Tableau 2 : Comparaison du taux d'échange, des paramètres rotationnels et de relaxivité pour différents systèmes macromoléculaires analysés par le modèle de Lipari-Szabo. ([a] 35°C ; [b] 25°C ; [c] 18 MHz)^{139, 140, 141}

Des zéolithes classiques dopées avec des lanthanides (surtout Gd³⁺) peuvent aussi servir d'agents de contraste pour des études gastro-intestinales. En effet, ces matériaux sont stables thermiquement et chimiquement. Ils sont aussi connus depuis longtemps pour leur non-toxicité ce qui a permis leur utilisation comme additifs alimentaires. Cependant, aucune étude sur le relargage de l'ion dopant n'est parue à ce jour mais la taille des pores exclut la plupart des ligands biologiques susceptibles d'entrer en compétition. Des zéolithes NaY dopés Gd³⁺

¹³⁸ É. Tóth, D. Pubanz, S. Vauthey, L. Helm, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1996**, 2, 1607.

¹³⁹ É. Tóth, L. Helm, K. E. Kellar, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 1202.

¹⁴⁰ F. A. Dunand, É. Tóth, R. Hollister, A. E. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 247.

¹⁴¹ G. M. Nicolle, É. Tóth, K. P. Eisenwiener, H. R. Mäcke, A. E. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 7, 757.

sont rapportées. Elles forment des structures microporeuses d'aluminosilicates basées sur des cages sodalites (octaèdre tronqué) : 8 cages forment une large cavité (supercage) d'un diamètre de 12,5 Å et de diamètre intérieur 7,6 Å.¹⁴² L'ion Ln^{3+} hydraté repose dans cette supercage et non pas dans la structure de la zéolithe. En suspension aqueuse, l'augmentation de la relaxation peut être décrite par un mécanisme à deux étapes. La première étape est la réalisation d'échanges entre l'ion lanthanide et les molécules d'eau de la sphère interne dans la cavité. Dans la seconde étape, ces molécules d'eau s'échangent avec celles du milieu (Figure 26).¹⁴³

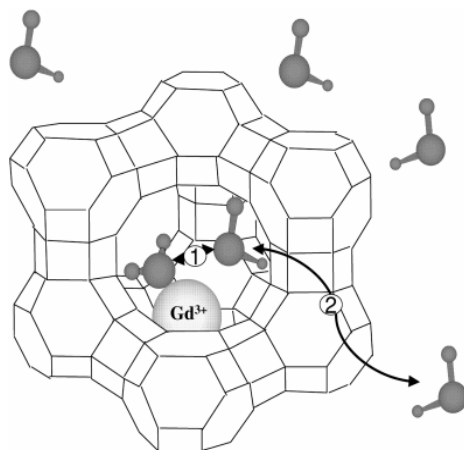


Figure 26 : représentation schématique du mécanisme en deux étapes expliquant la relaxivité des zéolithes dopées Gd^{3+} en milieu aqueux

Ces suspensions ont un potentiel comme agent de contraste en T_1 à bas champ et en T_2 à haut champ. D'autres types de zéolithes incorporant le lanthanide à la structure ont été étudiés. L'avantage de ces matériaux est qu'ils ne contiennent pas d'aluminium et que le relargage d'ions Ln^{3+} est rendu difficile du fait de leur incorporation à la structure mais ils ne sont pas efficaces comme agent de contraste en T_2 à haut champ.¹⁴² Ces matériaux contenant un grand nombre d'ions Gd^{3+} par unité de poids, ils pourraient donc trouver des applications comme agents de contraste ciblés. Malheureusement, les tentatives dans ce sens ont pour l'instant abouti à des complexes instables thermodynamiquement et donc non inertes, ce qui ne permet pas d'application in vivo.

L'élaboration de nanoparticules de silice de 10 nm contenant une quantité variable de Gd (de 1,6 à 6,8 % en masse) ont été rapportées et donnent des résultats en relaxation en T_1 qui s'apparentent à ceux obtenus pour les nanoparticules de zéolithes GdNaY .¹³² Ces nanoparticules de silice sont toutefois de formes irrégulières et s'agrègent facilement ; on peut de plus s'interroger sur la bonne immobilisation du Gd. Tous ces paramètres semblent donc limiter leurs applications in vivo.

Des nanoparticules polymères de taille et de morphologie mieux contrôlées ont par ailleurs été synthétisées.¹³¹ Ces nanoparticules de l'ordre de 120 nm sont de type core-shell. Le cœur polymère est constitué de monomères de dérivés acrylate formant des complexes stables avec le gadolinium et encapsulé dans une coquille polymère permettant un échange rapide des molécules d'eau. Enfin, des liposomes de l'ordre de 50 nm élaborés à partir de phospholipides de complexes de gadolinium (DTPA) ont donné une relaxivité r_1 deux fois supérieure à celle du DTPA:Gd.¹²⁹ L'originalité de ces nanoparticules réside dans la présence supplémentaire de fluorophores sous forme de phospholipides de N-benzoxadiazol. Ces liposomes permettent

¹⁴² G.A. Peireira, D. Ananias, J. Rocha, V.S. Amaral, R. N. Muller, L. Vander Elst, E. Tóth, J.A. Peters, C.F.G.C. Geraldes, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 3832.

¹⁴³ É. Csajbók, I. Bányai, L. Vander Elst, R. N. Muller, W. Zhou, J. A. Peters, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 4799.

ainsi une double détection des agents de contraste par IRM et par fluorescence. Ce type d'étude sur l'élaboration de nanoparticules pour la double détection par fluorescence et IRM a aussi été rapporté pour des nanoparticules d'oxydes de fer.¹⁴⁴ Ces nanoparticules, utilisant des fluorophores absorbant dans le proche infrarouge, pourraient ainsi permettre une détection pré-opératoire des tumeurs cérébrales par IRM et une détection optique intra-opératoire par fluorescence.

¹⁴⁴ M.F. Kircher, U. Mahmood, R.S. King, R. Weissleder, L. Josephson, *Canc. Res.*, **2003**, 63, 8122.

VI. Objectifs

Les nombreuses études menées sur l'application des nanoparticules d'or à la détection et l'imagerie *in vitro* et *in vivo* ont démontré les immenses capacités d'adaptation de ces dernières dans ce domaine. Du point de vue de l'imagerie (ou détection) microscopique, la microscopie par fluorescence semble être la technique la plus efficace et la plus prometteuse, tandis que du point de vue de la détection anatomique, l'IRM semble avoir une distance d'avance sur les autres techniques (scanner, échographie). Ces techniques n'en demeurent pas moins en demande de nouveaux agents de détection afin d'améliorer la précision du diagnostic. Ce progrès passe essentiellement par un abaissement du seuil de détection.

Deux études ont donc été menées successivement.

Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à développer des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des fluorophores afin d'abaisser le seuil de détection en microscopie par fluorescence sur des puces ADN. Le postulat de départ est d'améliorer la fluorescence pour chaque monobrin d'ADN cible en remplaçant un fluorophore seul par une nanoparticule d'or porteuse d'un nombre conséquent de fluorophores (Figure 27).

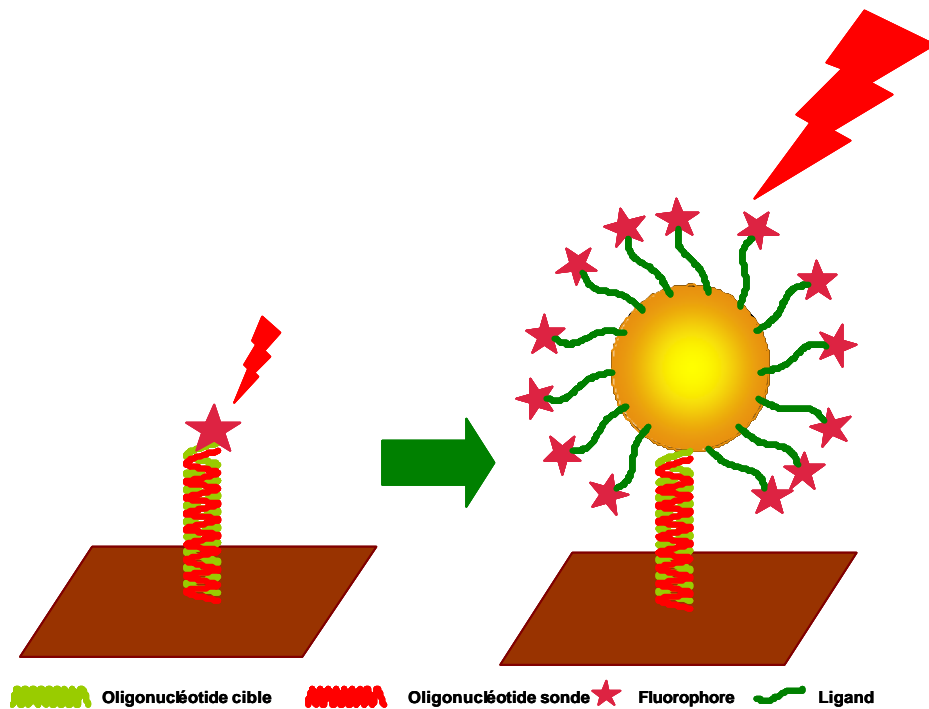


Figure 27 : exaltation de la fluorescence sur biopuces

Une étude basée sur le même principe a été menée pour l'amélioration du contraste en IRM. Les nanoparticules sont alors utilisées comme plates-formes pour l'immobilisation d'agents de contraste sous forme de chélates de gadolinium à base de polyaminocarboxylate. Ces nouveaux agents de contraste sont susceptibles d'augmenter la concentration en chélate de gadolinium et le temps de rétention dans le corps, permettant ainsi une amélioration du contraste (Figure 28).

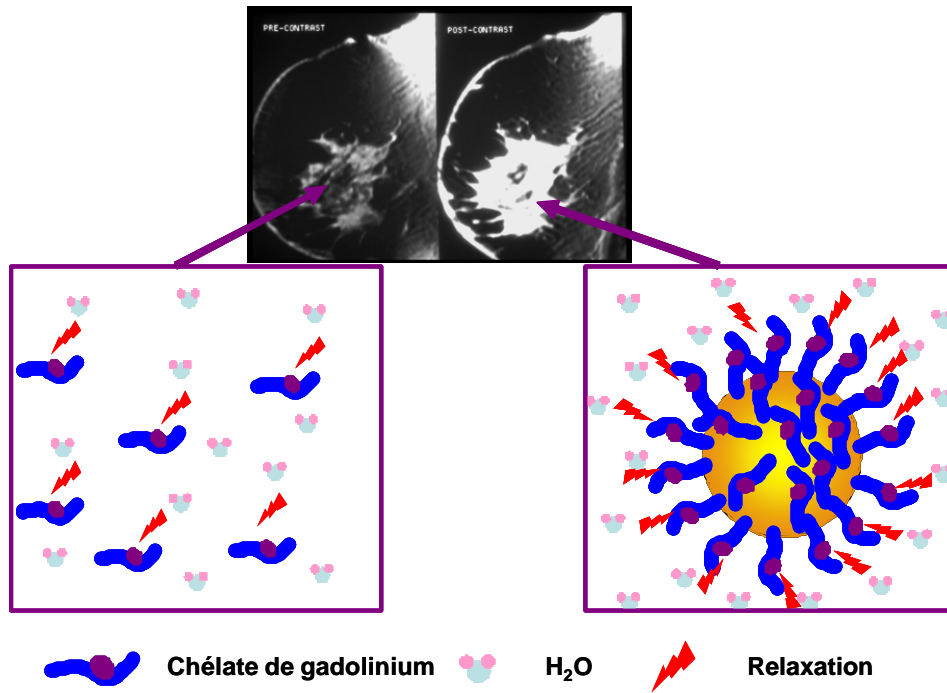


Figure 28 : Amélioration du contraste en IRM

L'élaboration de nanoparticules d'or stables s'est appuyée sur les deux méthodes principales de synthèse c'est-à-dire la méthode NaBH_4 et la méthode citrate. La fonctionnalisation a quant à elle été basée sur l'élaboration de composés thiolés greffables en nombre sur les particules d'or. Ces deux études ont donné des résultats prometteurs qui seront discutés en détail dans la partie expérimentale.

Partie expérimentale I :

I.	ELABORATION D'UN NANOHYBRIDE FLUORESCENT.....	55
A.	Objectif.....	55
B.	Elaboration de nanoparticules d'or stables	56
1.	Introduction.....	56
2.	Synthèse par la voie NaBH ₄	57
3.	Synthèse par la voie citrate.....	58
4.	Le choix de la méthode citrate	58
C.	Stabilisation et fonctionnalisation de la nanoparticule.....	59
1.	Choix du fluorophore	59
2.	Stabilisation par des molécules organiques.....	61
3.	Greffage de la lissamine rhodamine B (LRSCB).....	61
II.	MODE OPERATOIRE	68
A.	Généralités	68
B.	Stratégie par greffage indirect de la LRSCB	69
1.	Synthèse de nanoparticules d'or nues	69
2.	Stabilisation et fonctionnalisation.....	69
3.	Dosage des fluorophores greffés.....	70
C.	Stratégie par greffage direct de la rhodamine thiolée	70
1.	Synthèse de rhodamine thiolée (Rhoda-SH)	70
2.	Tests sur puces ADN	70
III.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	71
A.	Stratégie par greffage indirect de la LRSCB	71
1.	Synthèse	71
2.	Propriétés optiques des nanoparticules recouvertes de fluorophores.....	74
3.	Une procédure spécifique et originale pour le dosage des fluorophores sur la nanoparticule	74
B.	Greffage direct : Modification de fluorophores organiques pour le greffage	78
1.	Modification de la lissamine rhodamine B (LRSCB)	78
2.	Tests sur puces ADN	80
C.	Conclusion.....	84
D.	Perspectives.....	84

I. Elaboration d'un nanohybride fluorescent

A. Objectif

La fluorescence est largement utilisée en biologie avec le développement de nouveaux matériels électroniques^{145,146} ou de nucléotides fluorescents comme les puces ADN^{147,106,148}. La plupart des images et analyses microscopiques sont basées sur l'utilisation de la fluorescence émanant de composés organiques. Cependant, l'utilisation de composés organiques est handicapée par les problèmes liés au photoblanchiment, aux basses intensités du signal, aux phénomènes de chevauchements spectraux et d'intermittence d'émission (blinking). Les fluorophores organiques sont d'autre part aussi très instables à température ambiante notamment les dérivés cyanine et «Alexa Fluor» qui font partie des fluorophores les plus performants.¹⁴⁹ Ces interférences et dégradations affectent de manière importante l'uniformité et la reproductibilité des résultats d'analyses microscopiques sur l'ADN. La demande en composés fluorescents photostables possédant une haute intensité de signal est donc importante pour la microanalyse biologique. De plus, les quantités disponibles pour les analyses génétiques étant très limitées (de l'ordre du μL au nL), il est important de développer des méthodes d'analyses microscopiques ultra-sensibles et sélectives.

Parmi les différentes approches, de nouvelles techniques comme la spectroscopie Raman de surface (SERS),^{150,151} et de nouveaux composés comme les fluorophores proche-IR,¹⁵² les nanoparticules dopés par des fluorophores^{153,47} et les quantum dots (QDs)^{154,14,9} ont reçu un intérêt considérable. Les QDs ont prouvé qu'ils étaient des matériaux luminescents stables et qu'ils possédaient des capacités d'application en microanalyse, mais leur utilisation en méthode de routine est sujette à contre verse. En effet, outre les problèmes liés à la haute toxicité d'un composé comme le cadmium, les propriétés des quantum dots sont hautement dépendantes de leurs tailles et de leurs formes. Ces caractéristiques ajoutent des difficultés supplémentaires à la détection de l'hybridation quand les QDs sont de différentes couleurs (donc de différentes tailles ou formes). Une approche alternative consiste à greffer plusieurs molécules fluorescentes sur une même nanoparticule qui portera aussi un brin complémentaire à l'oligonucléotide cible à détecter. Cette approche possède tout d'abord un avantage majeur pour l'application comme marqueur fluorescent en microanalyse. Un grand nombre de fluorophores excités à la surface des nanoparticules produirait un signal de fluorescence important. De fait, quand un brin ADN est marqué par une seule nanoparticule

¹⁴⁵ M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, P.A. Alivisatos, *Science*, **1998**, 281, 2013.

¹⁴⁶ U. Kreibitz, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, **1995**, Springer Series in Material Science 25, Springer, Berlin.

¹⁴⁷ S. Chen, R.S. Ingram, M.J. Hostetler, J.J. Pietron, R.W. Murray, T.G. Schaaff, J.T. Khoury, M.M. Alvarez, R.L. Whetten, *Science*, **1998**, 280, 2098.

¹⁴⁸ J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science*, **2003**, 300, 87.

¹⁴⁹ T.L. Fare, E.M. Coffey, H.Y. Dai, Y.D.D. He, D.A. Kessler, K.A. Kilian, J.E. Koch, E. Leproust, M.J. Marton, M.R. Meyer, R.B. Stoutghton, G.Y. Tokiwa, Y.Q. Wang, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 4672.

¹⁵⁰ K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, 78, 1667.

¹⁵¹ S. Nie, S. Emory, *Science*, **1997**, 275, 1102.

¹⁵² E. Waddell, Y. Wang, W. Stryjewski, S. McWhorter, A.C. Henry, D. Evans, R.L. McCarley, S.A. Soper, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5907.

¹⁵³ R. Tapeç, X.J.J. Zhao, W.H. Tan, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2002**, 2, 405.

¹⁵⁴ D. Gerion, W. J. Parak, S.C. Williams, D. Zanchet, C. M. Micheel, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*; **2002**, 124, 7070.

fluorescente, il est attendu que le signal soit largement amplifié par rapport à un seul fluorophore, rendant possible une détection ultra sensible de l'ADN. Cette technique permettrait donc une augmentation de la sensibilité de détection par le nombre de composés fluorescents greffés ou adsorbés sur la nanoparticule.

Parmi les différentes nanoparticules développées, l'or semble à bien des égards être le meilleur candidat. Depuis les travaux de Brust en 1994,^{60a} ces nanoparticules ont fait l'objet d'un intérêt grandissant et un grand nombre de méthodes de synthèse sont maintenant disponibles. Les nanoparticules d'or représentent des supports biocompatibles et permettant la fonctionnalisation pour d'autres applications complémentaires ou supplémentaires. Cette multifonctionnalisation est rendue possible par le greffage de molécules thiolées porteuses de différentes propriétés sur les surfaces d'or. Ainsi, l'élaboration de nanoparticules d'or avec en surface des oligonucléotides et des fluorophores adsorbés ou greffés par des thiols peut être sérieusement envisagée.^{155,156,157} Cette possibilité a récemment été rendue plus réaliste encore depuis qu'il a été démontré que la chimisorption de molécules organiques fluorescentes sur des particules de taille nanométriques était possible dans de larges proportions sur des particules agrégées¹⁵⁸ ou immobilisées sur un substrat.¹⁵⁹ L'hypothèse d'un greffage direct sur des nanoparticules en solution a donc été rapportée.^{160,161} Cependant, ces études concernent soit des particules d'or trop petites pour porter plus de quelques fluorophores¹⁶⁰ soit des molécules fluorescentes qui perdent leur luminescence au contact de la particule¹⁶¹ soit des molécules fluorescentes greffées par l'intermédiaire d'oligonucléotides. Cette étude est donc l'une des premières à considérer la possibilité de greffer des molécules fluorescentes sur des nanoparticules d'or pour augmenter la sensibilité de détection de puces ADN.

B. Elaboration de nanoparticules d'or stables

1. Introduction

L'élaboration de nanoparticules d'or peut être réalisée par un large panel de méthodes qu'elles soient chimiques ou physiques. Nous nous sommes pour notre part concentrés sur les méthodes chimiques de synthèse. Toutes les approches pour préparer les colloïdes d'or stables impliquent la réduction d'un sel d'or en présence d'un stabilisant. Deux méthodes sont apparues clairement comme les plus intéressantes et les plus répandues, il s'agit de la méthode NaBH₄ (Brust) et la méthode citrate. Ces deux méthodes menant à des nanoparticules aux caractéristiques différentes, il nous a donc fallu choisir en fonction des applications visées. Nous développerons donc ces deux méthodes et expliciteront les raisons de notre choix.

¹⁵⁵ A.P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M.P. Bruchez, P.G. Schultz, *Nature*, **1996**, 382, 610.

¹⁵⁶ S. Santra, P. Zhang, K.M. Wang, R. Taped, W.H. Tan, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4988.

¹⁵⁷ X.J. Zhao, R. Taped-Dytioco, W.H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 11474.

¹⁵⁸ N. Chandrasekharan, P. V. Kamat, J. Hu, G. Jones, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 11103.

¹⁵⁹ S.A. Levi, A. Mourran, J.P. Spatz, F.C. van Veggel, D.N. Reinhoudt, M. Möller, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 3808.

¹⁶⁰ A.C. Templeton, D.E. Cliffler, R.W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 7081.

¹⁶¹ V. Makarova, A.E. Ostafin, H. Miyoshi, J.R. Norris, D. Meisel, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 9080.

2. Synthèse par la voie NaBH₄

La littérature présente un grand nombre de synthèses dérivées de celle de Brust.^{59,162,163,164,165,166,167} Par cette méthode, il est possible de synthétiser en une étape des nanoparticules d'or greffées par un type de dérivé thiolé selon la réaction suivante :

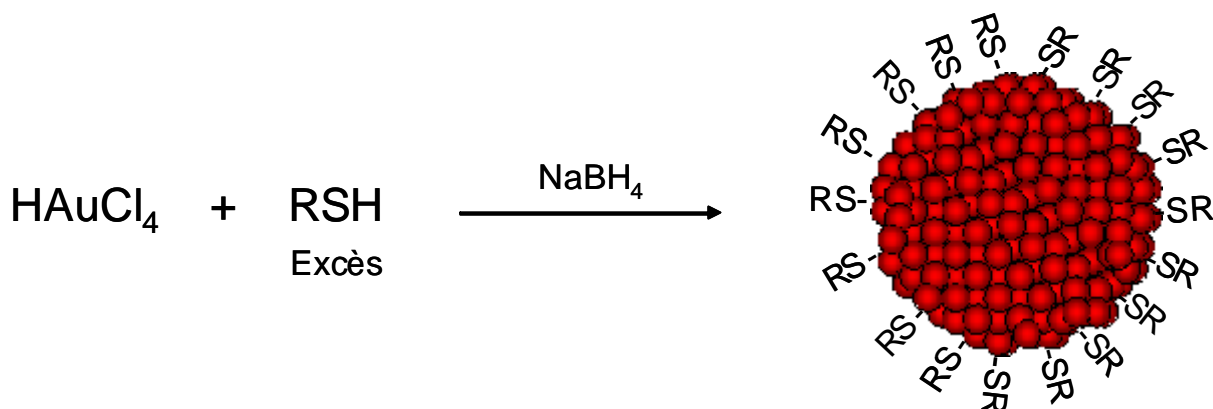


Figure 29 : Synthèse de nanoparticules d'or par voie NaBH₄

Le dérivé thiolé joue alors un double rôle :

- il assure une bonne homogénéité de taille des nanoparticules en jouant thermodynamiquement sur la croissance des particules ;¹⁶⁸
- il assure la dispersion du sol en jouant le rôle d'espaceur entre les nanoparticules métalliques, empêchant ainsi les risques de frittage.

Le dérivé thiolé permet donc d'assurer la monodispersion des sols. Les nanoparticules formées auront alors les caractéristiques suivantes :

- elles seront totalement recouvertes par un unique dérivé thiolé ;
- leur diamètre sera faible (quelques nanomètres) et imposé par le choix du thiol.^{76b,65}
- leur dispersion dans un solvant donné dépendra de la nature des thiols adsorbés.
- elles sont isolables sous forme de poudre rendant ainsi leur caractérisation aisée.

¹⁶² M. Hostetler, S. Green, R. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 4212.

¹⁶³ R. Nuzzo, D. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4481.

¹⁶⁴ M. Hostetler, S. Green, R. Murray, *Langmuir*, **1996**, 12, 3604.

¹⁶⁵ R. Terrill, E. Samulski, R. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 12537.

¹⁶⁶ A. Badia, L. Reven, *Langmuir*, **1996**, 12, 1262.

¹⁶⁷ K. Sarathy, G. Kulkarni, C. Rao, *Chem. Commun.*, **1997**, 537.

¹⁶⁸ D. Leff, P. Ohara, W. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 7036.

3. Synthèse par la voie citrate

Cette méthode développée par Turkevich en 1951 est basée sur la réduction de l'or sous forme HAuCl_4 (Au^{3+}) en Au^0 par le citrate de sodium.⁷² On obtient alors des nanoparticules protégées à leur surface par les citrates qui empêchent l'agglomération (Figure 30). Cette stabilisation par les citrates est cependant fragile et ne permet pas le séchage et la redispersion.

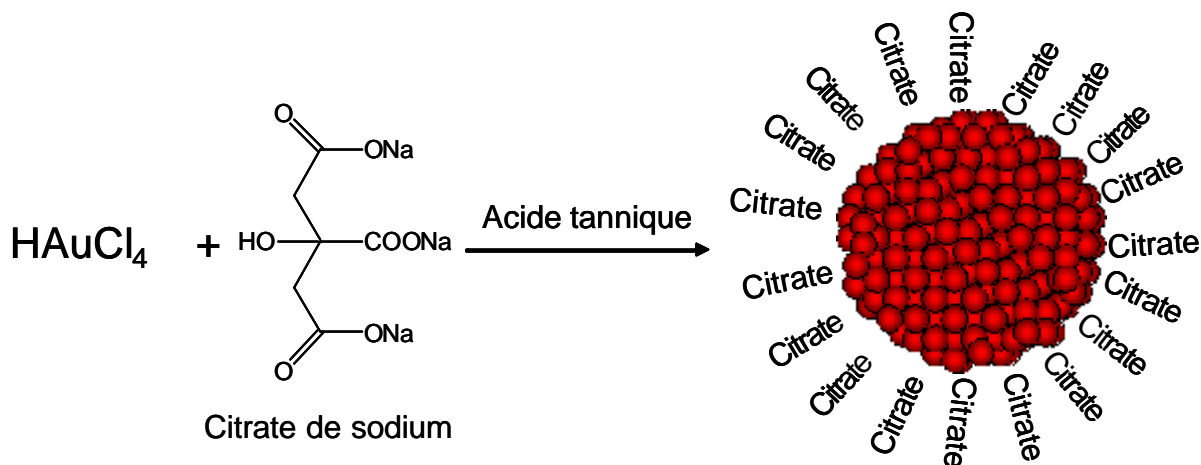


Figure 30 : synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate

Les nanoparticules obtenues par cette méthode sont qualifiées de nues, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas de molécules thiolées à leur surface. Leur taille peut varier de 16 à 147 nm de diamètre d'après les travaux de Frens.⁷³ Cette taille a pu être diminuée grâce aux travaux de Slot qui durant la synthèse a ajouté de l'acide tannique qui est une molécule à longue chaîne carbonée qui augmente donc les répulsions stériques entre particules et permet l'accès à des particules de plus petite taille.⁷⁴

4. Le choix de la méthode citrate

La réduction par le borohydrure de sodium mène donc à des nanoparticules autour de 5 nm de diamètre^{60a} mais présente des désavantages comme la perte d'accessibilité des sites de greffage après la réduction du métal. La seconde méthode utilisant le citrate de sodium permet d'obtenir des particules de diamètre plus élevé (15 nm)⁷³ qui peut être diminué en présence d'acide tannique (Figure 31).⁷⁴ La reproduction de ces deux types de synthèses nous a permis d'obtenir des particules de taille contrôlée et dispersées dans les deux cas. Cependant, la voie citrate est plus adaptée au greffage de différents thiols en quantité ajustable sur la même particule. Avec la voie NaBH_4 , le quantité de thiols en solution est généralement en large excès par rapport au nombre de ceux greffés,¹⁶⁹ de telle sorte que le greffage dépend d'une réaction d'échange dynamique entre les thiols en excès en solution et les thiols greffés en surface. Dans ce cas, la quantité de molécules adsorbées peut varier très significativement de celle en solution.^{170,171} Le contrôle de la multifonctionnalisation de la nanoparticule par différents thiols devient alors très difficile. Ce problème est moins probable pour la voie

¹⁶⁹ M.J. Hostetler, A.C. Templeton, R.W. Murray, *Langmuir*, **1999**, 15, 3782.

¹⁷⁰ C.D. Bain, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 3665.

¹⁷¹ C.D. Bain, G.M. Whitesides, *Science*, **1988**, 240, 62.

citrate, car la quantité de thiols généralement introduite est inférieure à celle qui peut potentiellement être adsorbée. C'est la raison pour laquelle, la méthode par la voie citrate a été choisie. Cette voie mène cependant à des solutions moins concentrées.¹⁷² Ceci ne présente aucun problème dans la mesure où les applications biologiques ne nécessitent que de faibles concentrations. On peut par ailleurs remarquer que, par rapport à la voie NaBH_4 , la voie citrate est bien moins répandue dans la littérature. Ce constat est certainement lié au fait qu'à de telles concentrations, la caractérisation de la liaison or/thiol est, par manque de sensibilité, difficilement réalisable par des méthodes classiques (spectroscopies IR, RMN). Des nanoparticules d'or « nues » ont donc été synthétisées suivant la méthode or/citrate et la méthode or/citrate/acide tannique afin d'obtenir des particules de taille inférieure.

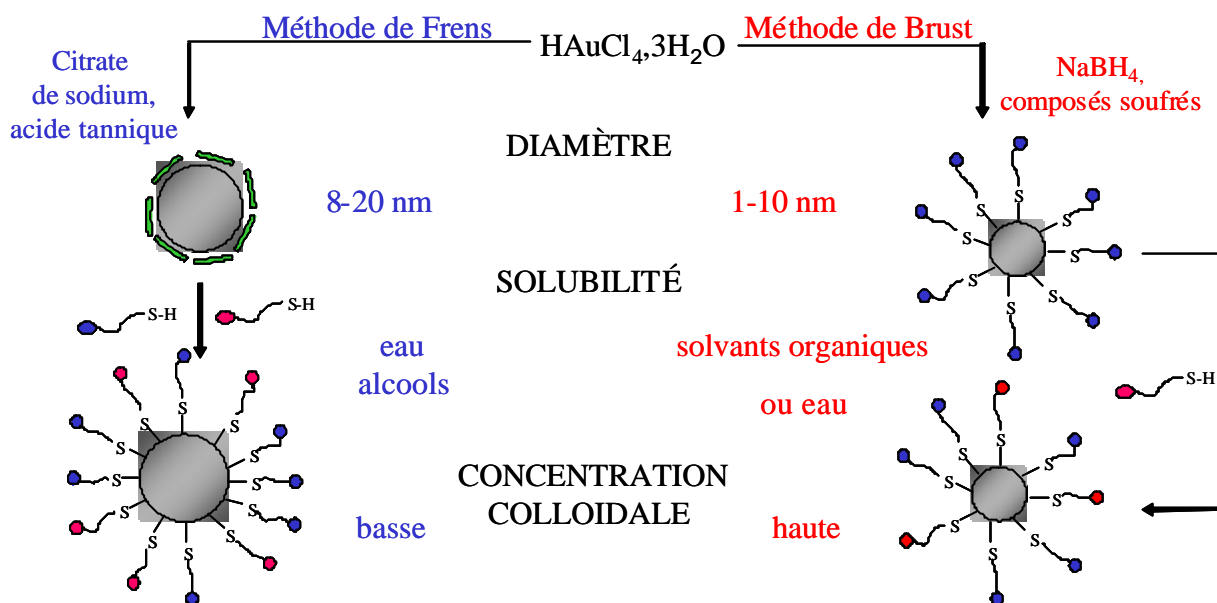


Figure 31 : schéma comparatif des méthodes « citrate » et « NaBH_4 ».

C. Stabilisation et fonctionnalisation de la nanoparticule

1. Choix du fluorophore

Le Tableau 3 présente de façon non exhaustive un panel des fluorophores organiques disponibles commercialement. Notre choix s'est donc fait selon un cahier des charges lié aux applications visées et à des notions beaucoup plus basiques et mercantiles. L'application visée étant l'imagerie médicale, le fluorophore utilisé doit donc être non toxique ; les composés sélectionnés ont donc été repérés parmi les molécules utilisées en biologie. Le greffage sur des colloïdes Au/citrate nécessite la solubilité même très faible en milieu aqueux afin de pouvoir réaliser la réaction tout en préservant la solubilité des particules après greffage. Enfin, la présence d'une fonction réactive sur le composé est essentielle afin d'introduire une fonction thiol pour greffer le fluorophore sur les nanoparticules comme nous le verrons ci-après. Les caractéristiques physiques des fluorophores remplissant ces conditions ont alors orienté notre choix.

La longueur d'onde d'absorption et surtout d'émission est un élément prioritaire dans le choix du fluorophore. En effet, la présence du plasmon de l'or autour de 520 nm (pour une nanoparticule de 10 nm) élimine les composés qui émettraient à ces longueurs d'onde, la

¹⁷² T. Yonezawa, T. Kunitake, *Coll. Surf. A*, **1999**, 149, 193.

majorité de la fluorescence étant de ce fait réabsorbée. On peut donc éliminer la fluorescéine isothiocyanate qui émet à 518 nm. Le greffage d'un composé aux performances en fluorescence les plus élevées possibles est recherché. La fluorescence est fonction de deux paramètres essentiels que sont le rendement quantique et le coefficient d'extinction. Le coefficient d'extinction relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution ($M^{-1}.cm^{-1}$) tandis que le rendement quantique reflète l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation (= nombre de photons émis / nombre de photons absorbés). Les dérivés dansyl bien moins fluorescents sont de ce fait très peu intéressants. Les fluorophores les plus performants sur le marché à l'heure actuelle sont les dérivés Cyanine (Amersham) et les Alexa fluor (Molecular probes) avec des coefficients d'extinction de l'ordre de 150 à 250000, améliorant ainsi largement les performances de fluorophore classique comme les dérivés rhodamine (maximum 100000). Toute innovation technique étant monnayée, ces molécules sont extrêmement coûteuses (Tableau 3) ce qui limite donc leur utilisation lors de l'expérimentation. Aussi avons-nous travaillé sur les dérivés rhodamine qui ont été très largement utilisés dans la littérature et dont les performances faisaient jusqu'il y a peu référence. Les lissamine rhodamine B sulfochlorure (LRSCB), tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), et carboxytetramethylrhodamine succinimide ester (TAMRA-SE) possédant une fonction réactive et des performances de luminescence quasi-similaires, nous avons orienté notre choix sur la LRSCB qui pour des raisons de disponibilité et de prix était la mieux placée. En effet, cette dernière possède un rendement quantique proche de 1 (0,99) et un coefficient d'extinction de 90000. Enfin, la présence de la fonction chlorure de sulfonyle sur la LRSCB permet la substitution d'une amine ou d'un alcool. Ces derniers si ils sont porteurs d'une fonction thiol ou disulfures permettront le greffage à la surface des nanoparticules d'or.

produit	formule	Ex (nm)	Em (nm)	coef d'extinction	solubilité	prix en €50 mg	fournisseur
Dansyl chloride		380	475	4600	H ₂ O	1	aldrich
Didansylcystine		328	563	8400	pH7	47	probes
fluorescein isothiocyanate (FITC)		494	518	77000	pH >6, DMF	35	fluka
lissamine rhodamine B sulfochlorure		568	583	88000	DMF, MeCN	13	probes
1-tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate (5(6)-TRITC)		544	572	84000	DMF, MeCN	10	sigma
carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester (5(6)-TAMRA, SE)		546	576	95000	DMF, DMSO	182	fluka
Alexa fluor 633 maléimide A 20342	NC	622	640	143000	H ₂ O, DMSO	11150	probes
Cy 3 NHS ester		550	570	150000		8640	amersham
Cy 5 NHS ester		649	670	250000		8530	amersham
Cy 7		747	776	200000		9000	amersham

Tableau 3 : molécules fluorescentes disponibles commercialement

2. Stabilisation par des molécules organiques

Comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographique, la stabilisation dans le temps et vis-à-vis de l'environnement nécessite le greffage de molécules hydrophiles afin d'éviter les agrégations irréversibles lors de la réaction de fonctionnalisation. Les stabilisants choisis sont donc deux molécules thiolées porteuses de fonctions hydrophiles : le 2-mercaptoéthane sulfonate (MS) et l'acide thiomaléique (AT) (Figure 34). Le MS et l'AT permettent tous deux d'améliorer la solubilité des nanoparticules dans le milieu réactionnel aqueux grâce à leur caractère hydrophile. Ils possèdent aussi et surtout un rôle protecteur à la surface des nanoparticules en évitant leur agrégation.

3. Greffage de la lissamine rhodamine B (LRSCB)

a) Deux modes de greffage

La fonctionnalisation d'une nanoparticule d'or peut se faire suivant 2 méthodes différentes : directe et indirecte. La méthode directe consiste à greffer une molécule thiolée porteuse d'une fonction chimique ou physique. Ces molécules sont cependant rares commercialement et leur obtention exige donc souvent une synthèse préalable. Les procédés utilisés pour la synthèse de ces dérivés thiolés nécessitent une réaction chimique entre la molécule fonctionnelle et une molécule thiolée par des mécanismes de type substitution nucléophile. La méthode indirecte diffère très peu de la méthode directe. Dans la méthode indirecte, cette réaction au lieu d'être réalisée en amont de la synthèse des nanoparticules, est réalisée en solution colloïdale (Figure 32 et Figure 33). Pour cela, une molécule thiolée qu'on qualifiera de « primaire » est greffée dans un premier temps à la surface des nanoparticules puis conjuguée à la molécule fonctionnelle. Cette molécule primaire doit donc être porteuse d'une fonction réactive ; il s'agit donc d'une molécule de type HS-R-X (X fonction réactive).

Dans notre cas, le greffage de la lissamine rhodamine B peut être réalisée par réaction d'une amine¹⁷³ ou d'un alcool¹⁷⁴ sur la fonction chlorure de sulfonyle en milieu basique. Ce type de réaction sur la LRSCB est par ailleurs décrit dans la littérature soit sur des amines^{175,176,177,178,179,180} ou des alcools non thiolés,¹⁸¹ soit sur des amines thiolées mais greffés préalablement à la surface de particules d'or. On ne trouve toutefois dans la littérature aucune conjugaison de LRSCB directement sur un alcool ou une amine thiolés.

Nous élaborerons donc des nanoparticules d'or recouvertes de fluorophores LRSCB selon les deux types de stratégies de greffage (directe et indirecte). Le greffage indirect sera donc effectué en 2 étapes en passant par l'intermédiaire de nanoparticules d'or porteuses d'un ligand thiolé réactif puis d'une réaction de couplage de la LRSCB (Figure 32) tandis que le greffage direct nécessitera la synthèse d'un dérivé thiolé de la LRSCB (Figure 33).

¹⁷³ Vogel's, fifth edition, 1989, Longman Scientific and Technical, 879.

¹⁷⁴ Vogel's, fifth edition, 1989, Longman Scientific and Technical, 886.

¹⁷⁵ J.E.T. Corrie, C.T. Davis, J.F. Eccleston, *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12, 186.

¹⁷⁶ S. Marchesini, S. Gatt, V. Agmon, M.L. Giudici, E. Monti, *Biochem. Int.*, 1992, 27, 545.

¹⁷⁷ E. Monti, A. Preti, A. Novati, M.F. Aleo, M.L. Clemente, S. Marchesini, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1124, 80.

¹⁷⁸ S. Marchesini, A. Preti, M.F. Aleo, A. Casella, A. Dagan, S. Gatt, *Chem. Phys. Lip.*, 1990, 53, 165.

¹⁷⁹ D. Hess, G. Isenberg, *FEBS Letters*, 1999, 445, 279.

¹⁸⁰ G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1996, academic press, New York.

¹⁸¹ Q. Lu, J.H. Callahan, G. E. Collins, *Chem. Commun.*, 2000, 1913.

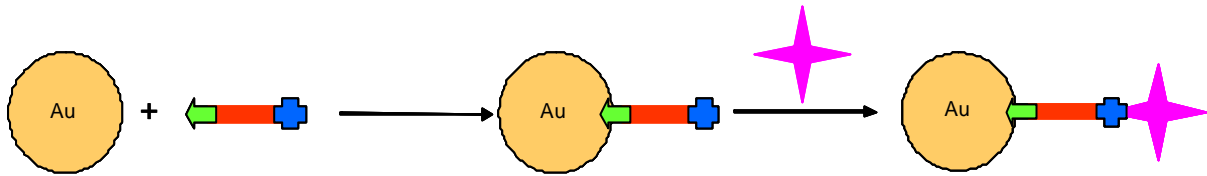


Figure 32 : fonctionnalisation indirecte : *étape 1* : greffage d'un ligand thiolé porteur d'une fonction réactive; *étape 2* : réaction de couplage de la LRSCB sur le ligand

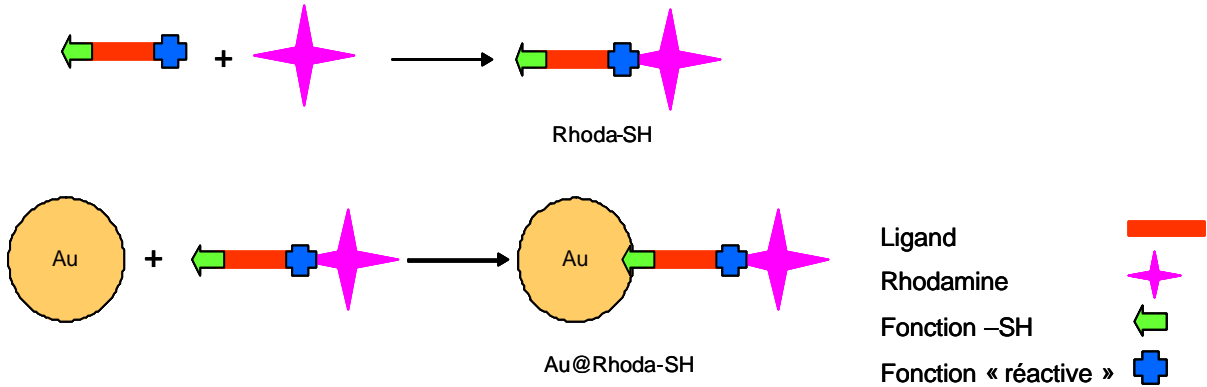


Figure 33 : fonctionnalisation directe de la nanoparticule d'or par un dérivé thiolé de la rhodamine (Rhoda-SH)

b) Stratégie par greffage indirect

(1) Choix du ligand

La stratégie par greffage indirect nécessite donc la présence d'un ligand du type HS-R-X (X fonction réactive) en surface des nanoparticules. La LRSCB par l'intermédiaire de son groupe chlorure de sulfonyle peut réagir avec des amines ou des alcools. Le composé thiolé recherché est donc du type HS-R-NH₂ ou HS-R-OH. Parmi les molécules disponibles commercialement, les conditions de synthèse en solution colloïdale imposaient au thiol, d'être soluble dans l'eau, d'être suffisamment réactif et de posséder une chaîne carbonée assez longue pour permettre une bonne accessibilité et donc une bonne réactivité. Les molécules de ce type munies d'une chaîne carbonée linéaire perdant leur caractère hydrophile avec l'allongement de la chaîne, notre choix s'est orienté sur le 4-mercaptophénol qui est soluble en milieu aqueux, possède une taille moléculaire satisfaisante et permet une substitution nucléophile (estérification/tosylation) (Figure 34).

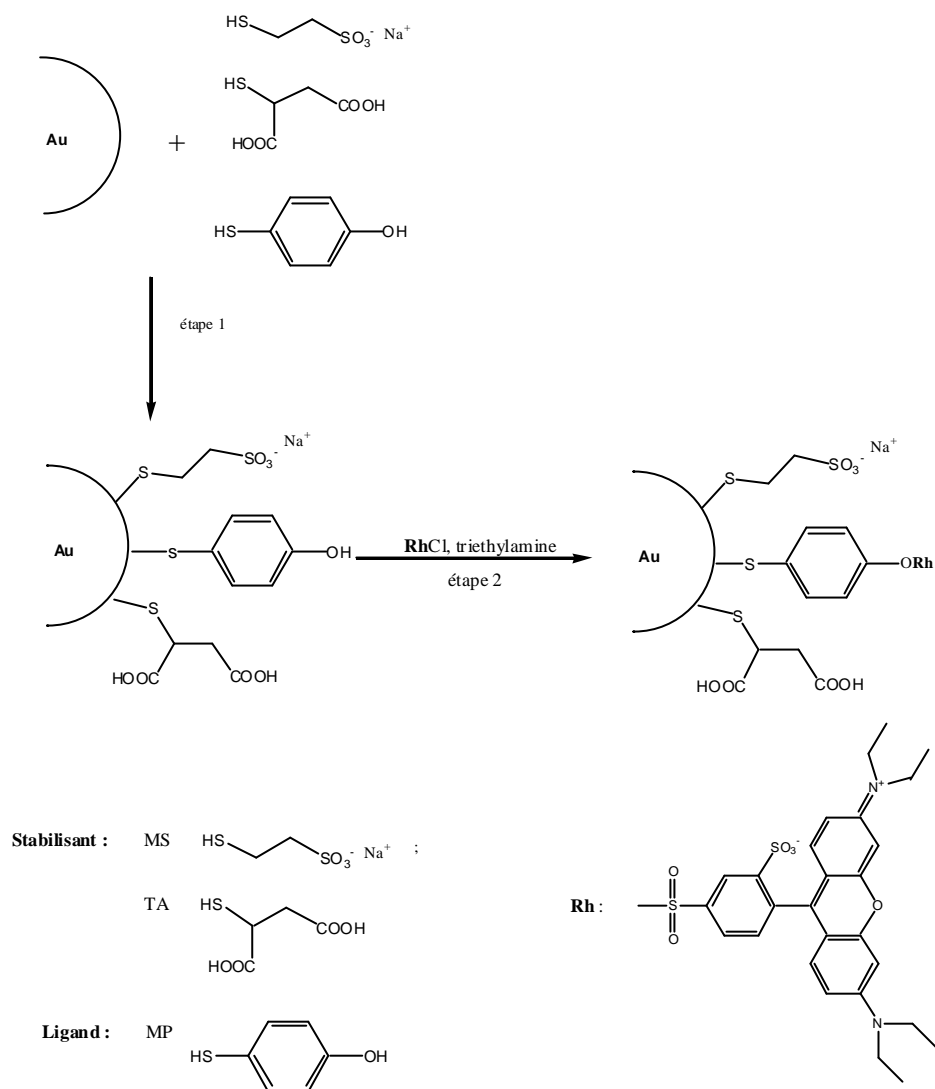


Figure 34 : Schéma de greffage en 2 étapes. étape 1 : greffage des 2 stabilisants (2-mercaptoéthane sulfonate et acide thiomaléique) et du ligand (4-mercaptophénol). Etape 2 : greffage de la lissamine rhodamine B sur le ligand.

(2) Elaboration d'une méthode de dosage

La synthèse par la voie citrate ne permet pas de caractérisation par des méthodes classiques (IR, RMN) en raison de l'agrégation irréversible des colloïdes lors du séchage et des faibles concentrations mises en jeu. Il est donc nécessaire d'évaluer l'efficacité du greffage de la LRSCB par une méthode de dosage adaptée. Une méthode de dosage spécifique basée sur la détection de la LRSCB par spectrométrie UV-visible et fluorescence a donc été élaborée. Son principe est d'évaluer la quantité de fluorophores adsorbés en surface des nanoparticules en mesurant l'absorption et la fluorescence résiduelle après précipitation des nanoparticules suivant un mode opératoire qui sera décrit plus précisément dans la partie « résultats et discussions » (Figure 46). Cette agrégation/précipitation des nanoparticules d'or est obtenue par augmentation de la force ionique par ajout de sel (NaCl). Le résultat (en absorption ou en fluorescence) obtenu sur le surnageant (I_{sur}) est alors comparé à celui obtenu pour une solution contenant une concentration équivalente de rhodamine initiale dans des conditions

identiques (I_0). La différence ($I_{\text{Ads.}}$) nous permet ainsi de déduire la quantité de LRSCB adsorbés en surface des nanoparticules.

$$I_{\text{Ads.}} = I_0 - I_{\text{sur.}} \quad (11)$$

Il convient toutefois de différencier les fluorophores adsorbés physiquement et chimiquement. En effet, les molécules organiques peuvent rester adsorbées à la surface des nanoparticules par des liaisons faibles de type Van der Waals, c'est-à-dire physisorbées. Les molécules greffées par des liaisons fortes (liaisons covalentes), c'est-à-dire dans notre cas celles ayant réagi avec la fonction alcool du mercaptophénol sont dites chimisorbées. On obtient donc les équations simples suivantes où l'on différenciera les intensités recueillies (absorption ou fluorescence) liées aux fluorophores physisorbés ($I_{\text{Phys.}}$) ou chimisorbés ($I_{\text{Chim.}}$).

$$I_{\text{Ads.}} = I_{\text{Phys.}} + I_{\text{Chim.}} \quad I_{\text{Chim.}} = I_{\text{Ads.}} - I_{\text{Phys.}} \quad (12) \quad (13)$$

$$n_{\text{Chim.}} \cdot i_{\text{LRSCB.}} = n_{\text{Ads.}} \cdot i_{\text{LRSCB.}} - n_{\text{Phys.}} \cdot i_{\text{LRSCB.}} \quad (14)$$

$$n_{\text{Chim.}} = n_{\text{Ads.}} - n_{\text{Phys.}} \quad (15)$$

La quantité de fluorophores physisorbés est donc évaluée par dosage après précipitation sur une solution contenant le fluorophore en présence de nanoparticules ne portant pas de ligands et donc aucun fluorophore chimisorbé. On en déduit alors la quantité de fluorophores chimisorbés.

c) Greffage direct

(1) Synthèse de la lissamine rhodamine B thiolée

Comme dans le cas de la stratégie indirecte, la synthèse d'un dérivé thiolé de la LRSCB a été réalisée par réaction sur la fonction hydroxyl du 4-mercaptophénol permettant ainsi de comparer les deux stratégies (Figure 35). Les conditions opératoires de cette réaction ont été inspirées par les travaux de Q. Lu *et al.* reportant le couplage de la LRSCB sur la fonction hydroxyl d'un calix[6]arène en présence de triéthylamine¹⁸¹ et ceux de Reinhoudt *et al.*¹⁵⁹ Le produit brut obtenu a nécessité une purification sur colonne chromatographique d'après les conditions décrites par J.E.T. Corrie *et al.*,¹⁷⁵ cette étude étant menée sur un couplage avec des amines de taille moléculaire et de solubilité plus comparables à celles du 4-mercaptophénol.

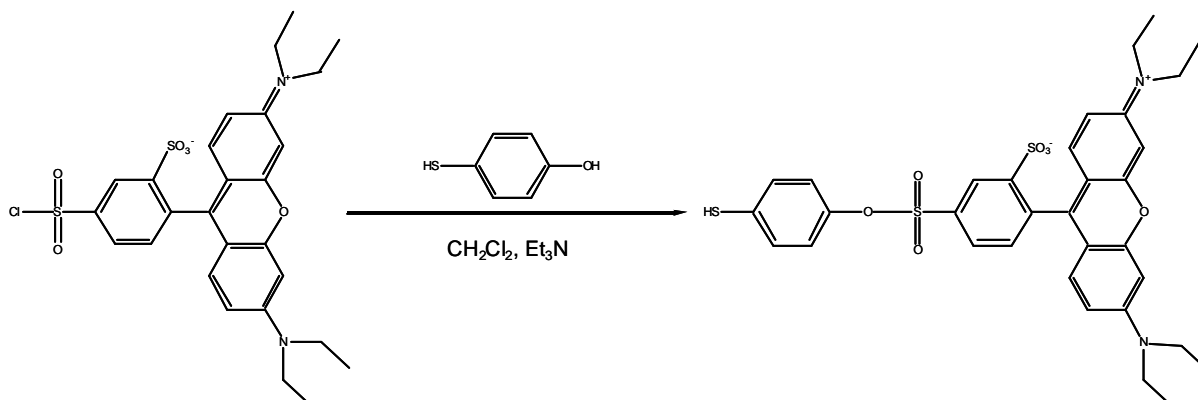


Figure 35 : synthèse d'un dérivé rhodamine thiolé (Rhoda-SH)

(2) Application aux puces ADN

Les nanoparticules élaborées par la stratégie du greffage direct ont été utilisées dans le cadre d'une étude préliminaire sur l'élaboration de biopuces. Comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographique, la fluorescence est l'une des techniques de détection les plus utilisées pour les puces ADN ou biopuces. La fluorescence des puces ADN est généralement assurée par un simple fluorophore organique greffé à l'extrémité d'un oligonucléotide. Quelques biopuces existent aussi sous forme de nanoparticule d'or utilisant les effets de quenching ou de déplacement de la bande plasmon pour détecter l'hybridation.^{46,182} Des nanoparticules porteuses d'une multitude de fluorophores organiques ainsi que d'un nucléotide permettraient donc potentiellement d'assurer l'hybridation et d'intensifier le signal de fluorescence (Figure 36).

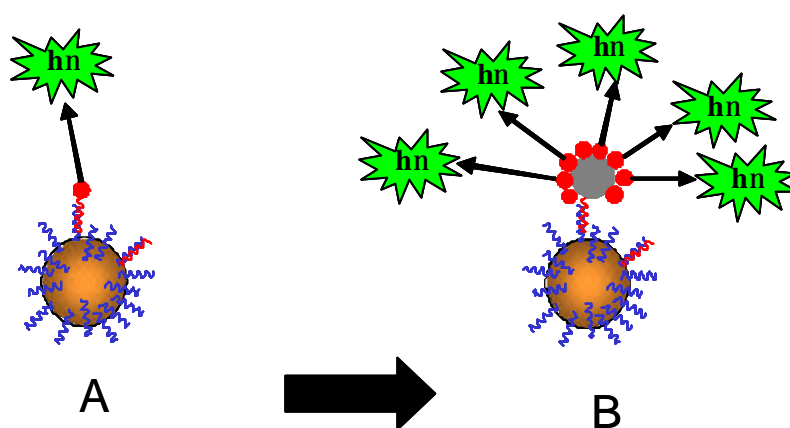


Figure 36 : abaissement du seuil de détection à l'aide de nanoparticules.
 A) biopuce « classique » oligonucléotide + fluorophore
 B) biopuce « originale » oligonucléotide + nanoparticule + n fluorophores

Chaque nanoparticule préalablement recouverte de fluorophores sera donc fonctionnalisée par un oligonucléotide. Le greffage d'oligonucléotide sur des nanoparticules d'or est par ailleurs connu¹⁸³ et largement répandu dans la littérature.

L'élaboration de telles biopuces nécessite tout d'abord une homogénéité et une reproductibilité des analyses. De ce fait, les cœurs nanoparticulaires d'or doivent donc posséder une taille reproductible avec une faible dispersité. Les solutions utilisées pour la détection biologique des brins d'ADN étant fortement diluées, les solutions colloïdales diluées obtenues par la méthode citrate ne présentent donc pas d'inconvénients. L'utilisation de colloïdes or/citrate présente aussi l'avantage majeur de pouvoir moduler la quantité de fluorophores à la surface des nanoparticules afin d'affiner les propriétés de luminescence. Enfin les oligonucléotides permettant l'hybridation sur un brin ADN complémentaire conditionnent du même coup la faculté de greffage sur les nanoparticules donc la capacité de détection des brins ADN. Leur quantité à la surface des nanoparticules peut donc être une variable toute aussi importante. Les réactions d'échange de molécules thiolées à la surface des nanoparticules d'or étant connues, la polyfonctionnalisation de nanoparticules par des fluorophores thiolés et des oligonucléotides sera donc potentiellement sujette à ce phénomène.

¹⁸² E. Hutter, M.-P. Pileni, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 6497-6499

¹⁸³ J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawd, R. Polsky, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5576.

L'ordre de greffage des surfactants peut donc revêtir une importance considérable notamment en présence d'oligonucléotides de grands encombrements stériques. En fonction de ces paramètres, différentes stratégies ont donc été élaborées afin de connaître les conditions optimales pour l'élaboration de ces biopuces.

La première stratégie consiste donc à faire varier la quantité d'oligonucléotides sur des nanoparticules porteuses d'une quantité fixe de luminescents, l'ordre de greffage présentant alors les différentes options. La quantité de fluorophore a été fixée arbitrairement à 100 rhodamines thiolées (Rhoda-SH) par particule (ANNEXE VI), cette valeur semblant correcte pour obtenir une amélioration de fluorescence sans hypothéquer le greffage des oligonucléotides thiolés (ON-SH). La taille des nanoparticules d'or/citrate utilisées étant de 12 nm, la quantité d'atomes d'or de surface accessibles est de l'ordre de 2400 par particule, on peut donc sans trop de risque d'encombrement greffer 100 fluorophores par particule. La quantité d'oligonucléotides par particule a été ajustée de 0,2 à 5. Un rapport inférieur à 1 implique la présence de particules non fonctionnalisés par au moins 1 oligonucléotide, cependant la présence de ces particules ne génère pas d'erreur d'interprétation. Ces particules étant éliminées au moment des lavages des biopuces car elles sont incapables de s'immobiliser par hybridation. Un rapport de 5 oligonucléotides par particule semble quant à lui, une quantité largement suffisante pour l'hybridation de toutes les particules. L'ordre de réalisation de ces biopuces pouvant influencer sur les rapports surfaciques entre les différents thiols mais aussi sur les capacités d'hybridation, différentes options sont possibles. Les premières options consistent donc à réaliser des nanoparticules fluorescentes porteuses d'un ou plusieurs oligonucléotides en greffant en premier soit l'oligonucléotide (option a Figure 37) soit le fluorophore (option b Figure 38) puis les immobiliser sur les biopuces par hybridation (Figure 39). Une autre alternative consiste à greffer dans un premier temps uniquement l'oligonucléotide thiolé puis à le fixer par hybridation sur les biopuces. Dans un deuxième temps, les molécules fluorescentes thiolées sont alors greffées sur ces nanoparticules fixées sur les biopuces. (option c Figure 40)

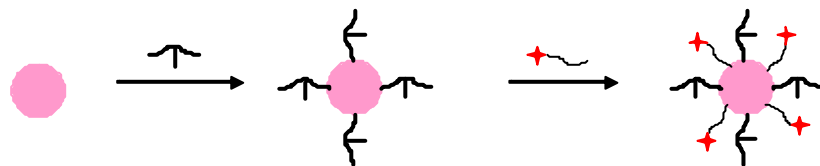
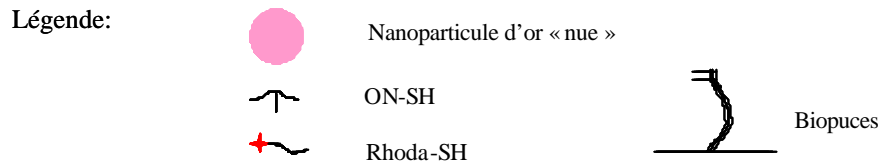


Figure 37 : Stratégie 1 option a :

- Greffage de l'oligonucléotide thiolé (ON-SH) sur l'or : 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 5 ON-SH par particule d'or.
- Greffage de 100 Rhoda-SH par particule d'or.

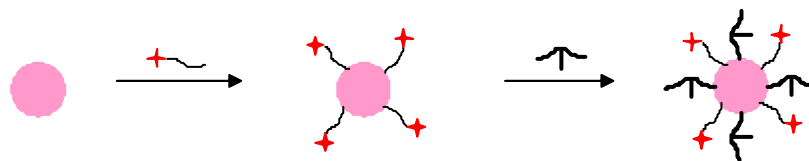


Figure 38 : Stratégie 1 option b :

- Greffage de 100 Rhoda-SH par particule d'or.
- Greffage de l'oligonucléotide thiolé (ON-SH) sur l'or : 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 5 ON-SH par particule d'or.

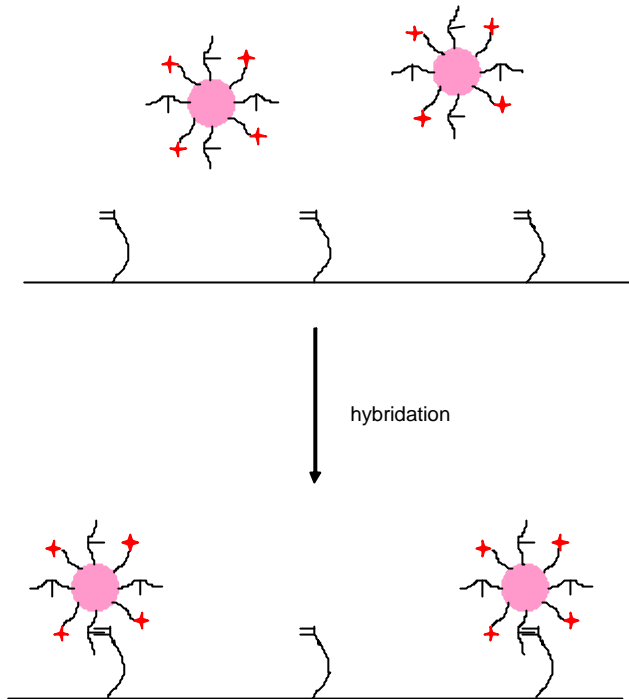


Figure 39 : stratégie 1 options a et b ; immobilisation sur la biopuce par hybridation

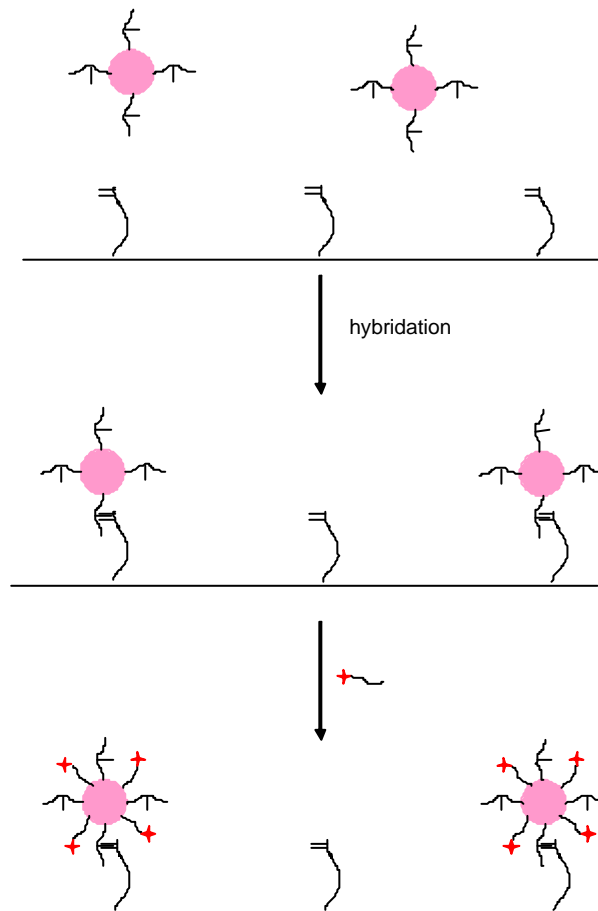


Figure 40 : Option c :

- Greffage de l'oligonucléotide thiolé (ON-SH) sur l'or : 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 5 ON-SH par particule d'or.
 - Immobilisation sur la biopuce (par hybridation)
 - Greffage de Rhoda-SH sur les particules d'or immobilisées

Une seconde stratégie consiste à greffer dans un premier temps uniquement les fluorophores à la surface des nanoparticules d'or et à les immobiliser sur les biopuces par réaction avec les SH terminaux des oligonucléotides déjà hybridés sur leurs brins complémentaires.

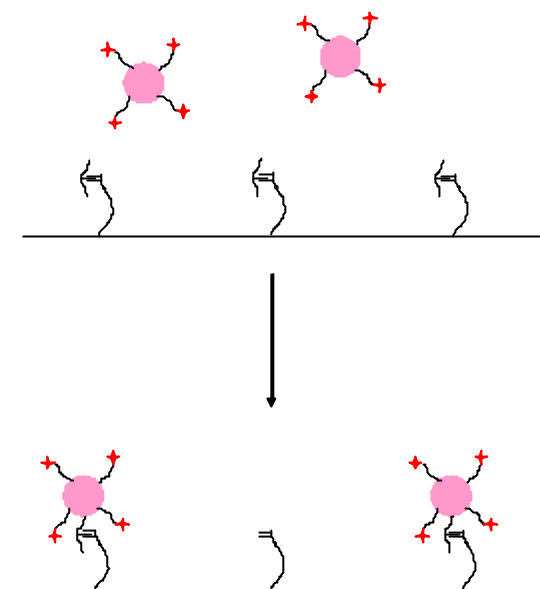


Figure 41 : Stratégie 2 :

- Greffage de Rhoda-SH sur l'or Immobilisation des nanoparticules sur la « biopuce hybridée » par ON-SH.

L'évaluation de la quantité optimale de fluorophores à greffer sur les nanoparticules d'or doit être réalisée par la suite selon la stratégie et le rapport oligonucléotide/nanoparticule retenu.

II. Mode opératoire

A. Généralités

Les réactifs utilisés sont fournis par Sigma-Aldrich, Flucka et Molecular Probes (pour la LRSCB).

Les spectres UV-visible sont enregistrés à température ambiante sur un spectrophotomètre Shimadzu UV-2401 PC permettant de mesurer l'absorption des fluorophores sur une gamme de 400 à 800 nm.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés sur un spectromètre Bruker AM 300. Les spectres FT-IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer spectrum one.

Les spectres de masse sont obtenus par technique electrospray sur un appareil API 165 PE SCIEX.

La fluorescence est mesurée à 585 nm à température ambiante avec une excitation centrée à 290 nm et une largeur à mi-hauteur de 8 nm sur un spectrofluorimètre expérimental. Ce dernier est composé d'une source d'excitation munie d'une lampe au xénon de 450 W couplée à un monochromateur Jobin-Yvon H10D. La fluorescence est collectée par fibre optique, dispersée par un TRIAX 320 Jobin-Yvon avec une grille de 300 fentes par mm et détectée sur CCD refroidie par air.

La microscopie électronique par transmission (haute résolution) est réalisée sur un microscope JEOL 2010 opérant à 200 kV avec une résolution de 1,2 Å.

B. Stratégie par greffage indirect de la LRSCB

1. Synthèse de nanoparticules d'or nues

L'élaboration des différentes méthodes de synthèse or/citrate a nécessité, dans un premier temps, des mises aux points des modes opératoires à partir de ceux décrits dans la littérature. Ces travaux ont été réalisés par mes prédécesseurs (T.Clerc, C. Hilleriteau), sur les synthèses par voie citrate et citrate/acide tannique. (ANNEXE V)

Synthèse par la voie citrate : dans un ballon de 500 mL équipé d'une colonne réfrigérante, 115 mg ($1,43 \cdot 10^{-4}$ mol) d'acide tétrachloroaurique trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sont dissous dans 200 mL d'eau distillée et chauffés à reflux. Dans un autre ballon de 500 mL, 260 mg ($8,75 \cdot 10^{-4}$ mol) de citrate de sodium dihydrate sont dissous dans 10 mL d'eau distillée puis ajoutés au premier ballon. Le mélange est agité magnétiquement à vitesse modérée et chauffé à reflux durant 30 minutes puis refroidi à température ambiante en maintenant l'agitation. La solution initialement jaune change progressivement de couleur pour devenir rouge-bordeaux indiquant ainsi la formation de colloïdes d'or.

Synthèse par la voie citrate/acide tannique : dans un ballon de 500 mL équipée d'une colonne réfrigérante, 10 mg ($1,24 \cdot 10^{-5}$ mol) d'acide tétrachloroaurique trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sont dissous dans 80 mL d'eau distillée. Dans un autre ballon de 100 mL, 40 mg ($1,35 \cdot 10^{-4}$ mol) de citrate de sodium dihydraté et 10 mg ($5,9 \cdot 10^{-6}$ mol) d'acide tannique sont dissous dans 20 mL d'eau distillée. Ces deux solutions sont chauffées à 60°C puis la seconde est ajoutée à la première. La solution passe alors instantanément du jaune au rouge indiquant la formation des colloïdes. La solution est alors agitée magnétiquement durant 1 heure à 60°C puis 1 heure à reflux (110°C) afin d'homogénéiser la taille des particules.

2. Stabilisation et fonctionnalisation

Le greffage des différents thiols (2-mercaptoéthane sulfonate (MS), acide thiomaléique (AT), 4-mercaptophénol (MP)) se fait par ajouts successifs sur la solution de nanoparticules d'or.

Sur 30 mL de solution colloïdale à $1,67 \cdot 10^{-8}$ M de nanoparticules, on ajoute successivement les différentes solutions aqueuses de thiols à des intervalles de 30 min. pour chaque espèce de thiol. L'ajout d'une quantité exacte de molécules est mesuré par addition d'un volume défini d'une même solution mère, en fonction de la quantité de chaque composé thiolé désirée. Les solutions mères utilisées ont une concentration molaire de $1,22 \cdot 10^{-5}$, $1,22 \cdot 10^{-5}$, $2,44 \cdot 10^{-5}$ mol/L respectivement pour le MS, l'AT et le MP (les différents thiols étant ajoutés dans cet ordre). La nature et la concentration de thiols en solution sont ajustées en fonction du nombre de sites de greffage sur les nanoparticules d'or (calcul en annexe VI). Typiquement on introduit une quantité nécessaire pour occuper 40% des sites de surface.

Greffage de la LRSCB sur le 4-mercaptophénol : sur 30 mL de solution de nanoparticules préparées comme précédemment, on ajoute à température ambiante et à l'abri de la lumière 10 mL de triéthylamine, et, 1 mL d'une solution de LRSCB dissoute dans un mélange méthanol/eau (1/99 en volume). La concentration en fluorophore est variable en fonction de la quantité de chromophores désirée sur les nanoparticules (de 1 à 1800 par particule). Après 48h d'agitation à température ambiante, l'agitation est arrêtée.

3. Dosage des fluorophores greffés

Sur des échantillons de 5 mL de solution colloïdale stabilisée, on ajoute des quantités variables de chromophores en fonction de la quantité désirée (de 1 à 1800). Des ajouts en concentration identique en fluorophores sont réalisés sur des solutions d'eau distillée et des solutions colloïdales ne portant pas de mercaptophénol.

Précipitation des nanoparticules : 0,2 g de NaCl sont ajoutés à température ambiante sur des solutions colloïdales de 5 mL. Après agitation mécanique durant 1 heure, la solution est centrifugée pendant 5 min à 700 tours/min. La solution surnageante est prélevée en partie à l'aide d'une pipette Pasteur pour les analyses en spectroscopie UV-visible et fluorescence. Les colloïdes obtenus sont soit utilisés immédiatement, soit stockés pour une étude de taille dans les jours suivants.

Aucun signe de décomposition n'est observé sur une période de plusieurs mois.

C. Stratégie par greffage direct de la rhodamine thiolée

1. Synthèse de rhodamine thiolée (Rhoda-SH)

Dans un ballon de 100 mL tricol, on dissout 30 mg ($5,2 \cdot 10^{-5}$ mol) de LRSCB (Flucka 99%) et un large excès de mercaptophénol (63,2 mg ; $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol) dans 20 ml de dichlorométhane (HPLC grade). On ajoute ensuite 1 ml de triéthylamine et on met sous atmosphère d'azote à température ambiante pendant une nuit. La solution est alors évaporée à sec sous pression réduite, puis redissoute dans CH_2Cl_2 , lavée avec HCl 1N (100 mL) puis NaHCO_3 1N (100 mL) et 100 mL de solution saturée en NaCl afin d'éliminer la triéthylamine.

Le produit est alors purifié sur colonne silice (40-63 μm) de 30 cm avec un éluant méthanol/ CH_2Cl_2 (1/9 en volume). La solution récupérée est évaporée à sec puis redissoute dans un minimum d'éthanol auquel on ajoute 10 volumes d'éther. La solution est alors filtrée sur fritté. On récupère 20 mg d'une poudre violette.

2. Tests sur puces ADN

Elaboration de biopuces

Les biopuces sont préparées par dépôt de gouttes de 1,2 nL de solution à l'aide d'un BioChip Arrayer BCA1 (PerkinElmer). Les solutions déposées sont préparées en mélangeant 100 μL d'une solution aqueuse composée de glycérol à 2,5%, de NaCl à 0,05 M et de 10 μL d'une suspension aqueuse d'oligonucléotides (RH24K 1% m/v). Chaque gamme est composée de 16 taches (4x4) qui sont déposées à la surface d'une structure en PVC 3D constitué de 24 rectangles ($L \times l \times h = 5\text{mm} \times 5\text{mm} \times 1\text{mm}$). Après dépôt, les taches sont transférés dans un film en PDMS en versant un mélange de précurseur et d'agent de séchage (10:1) sur la structure en PVC et en laissant séché à 90°C pendant 5 min. La préparation des biopuces est alors terminée par décollage du film en PDMS.

La structure en 3 dimensions ainsi obtenue possède 24 microcuves de 20 μL avec en leur fond 16 taches. Chaque étape d'incubation ou de lavage sera ensuite réalisée avec 20 μL de solution dans chaque cavité.

Les différents tests de préparation de marqueurs fluorescents sont élaborés à partir d'une même solution colloïdale de nanoparticules d'or nue obtenue par la voie citrate/acide tannique et caractérisées par MET à un diamètre moyen de 12 nm.

Etude du nombre optimum d'oligonucléotides par particule

Les oligonucléotides du type d(T)₂₂-S-S-R (APIBIO) sont coupés au niveau du pont disulfure afin de former R-SH et un oligonucléotide d(T)₂₂-S-H. Ces derniers sont purifiés sur colonne chromatographique et détectés en sortie par spectroscopie UV-visible. La solution obtenue est de l'ordre de 2,33 mL avec une concentration de 29,6 µM.

3 µL de solution de rhodamine thiolée à une concentration de $1,67 \cdot 10^{-4}$ M sont ajoutés à des échantillons de 1 mL d'une solution colloïdale à $4,96 \cdot 10^{-9}$ M de particules soit 100 rhoda-SH par particule. Une quantité variable de solution d'oligonucléotides à 29,6 µM correspondant à l'ajout de 0,2 à 10 oligonucléotides par nanoparticule est ensuite ajoutée à l'aide d'une micropipette. Selon l'option choisie, les ajouts des fluorophores et des oligonucléotides sont inversés chronologiquement. Ces solutions sont complétées au même volume avec de l'eau déminéralisée afin d'obtenir les mêmes concentrations en particules pour chaque échantillon.

Chaque échantillon est ensuite dilué entre 10^{-12} et 10^{-9} M dans une solution tampon A à pH 8,5 (30mM Veronal (diethylbarbiturate de sodium), 30 mM de KCl, 30 mM de NaCl, 0,1% de tween et 1% de BSA) et laissé à incuber pendant 30 min. Les cavités sont ensuite lavées avec une solution tampon B à pH 8,5 (30 mM Veronal, 30 mM KCl, 0,2 M NaCl).

Les plaques sont ensuite introduites dans système de détection de luminescence par caméra CCD (Intelligent Dark Box II, Fuji Film) et intégrées pendant 10 min. Les photos des biopuces obtenues sont quantifiées par un programme d'analyse d'images (Image Gauge 3.12, Fuji Film).

Etude du nombre optimum de fluorophores

Sur des échantillons de 1 mL de solution colloïdale est ajouté dans un premier temps une quantité variable de Rhoda-SH correspondant à un rapport molaire Rhoda-SH/nanoparticule de 1 à 2000. Des solutions de Rhoda-SH à $1,67 \cdot 10^{-6}$ M et $1,67 \cdot 10^{-4}$ M sont utilisées respectivement pour les rapports de 1 à 50 et de 100 à 2000. Ces ajouts sont effectués à l'aide de micropipettes de manière lente et progressive afin d'éviter les brusques changements d'environnement. A chacun de ces échantillons sont ajoutés 3,35 µL d'une solution à 29,6 µM de d(T)₂₂-SH soit une quantité correspondant à un rapport particule/oligonucléotide de 5. Ces solutions sont complétées au même volume avec de l'eau déminéralisée afin d'obtenir les mêmes concentrations en particules pour chaque échantillon.

Des billes de Sépharose[®] d'un diamètre de 100 µm sont pré-activées par accrochage de l'oligonucléotide complémentaire d(A)₂₂ par introduction des billes de Sépharose dans une solution aqueuse de d(A)₂₂. La solution de nanoparticules d'or fonctionnalisées est ensuite ajoutée à ces billes de sépharose pré-activées. Les nanoparticules non hybridées sont éliminées par lavage des solutions par précipitation forcée et remplacement du surnageant. Cette opération est répétée plusieurs fois. Les photos sont obtenues sur un microscope à fluorescence équipé d'une caméra CCD.

III. Résultats et discussions

A. Stratégie par greffage indirect de la LRSCB

1. Synthèse

Comme schématisé dans la Figure 34, le greffage de la LRSCB a été réalisé en 2 étapes : la première consistant à greffer des thiols primaires avec d'une part des stabilisants, le 2-

mercaptoéthane sulfonate (MS) et l'acide thiomaléique (AT) et d'autre part un ligand, le 4-mercaptophénol (MP); la seconde consistant à greffer la lissamine rhodamine B sur le ligand fixé précédemment. Cette méthode a donc été préférée dans un premier temps à un protocole en une seule étape avec un greffage direct d'une rhodamine thiolée sur les particules d'or parce qu'elle permet de résoudre séparément les difficultés de purification. Dans la première étape, la quantité de stabilisants MP et AT peut être ajustée pour l'obtention de suspensions colloïdales stables. Dans la seconde étape, le greffage de la rhodamine ou d'un autre fluorophore peut être optimisé.

Étape 1

Dans un premier temps, la nature et la quantité des ligands, sur lesquels la LRSCB allait être greffée, ont été déterminées en étudiant des nanoparticules avec une taille de 16,2 nm (MET Figure 42). Ce greffage primaire est réalisé par simple mélange des thiols avec les nanoparticules d'or en solution aqueuse. Contrairement à l'élaboration par voie NaBH_4 , la quantité de thiols peut être ajustée avec la voie citrate.

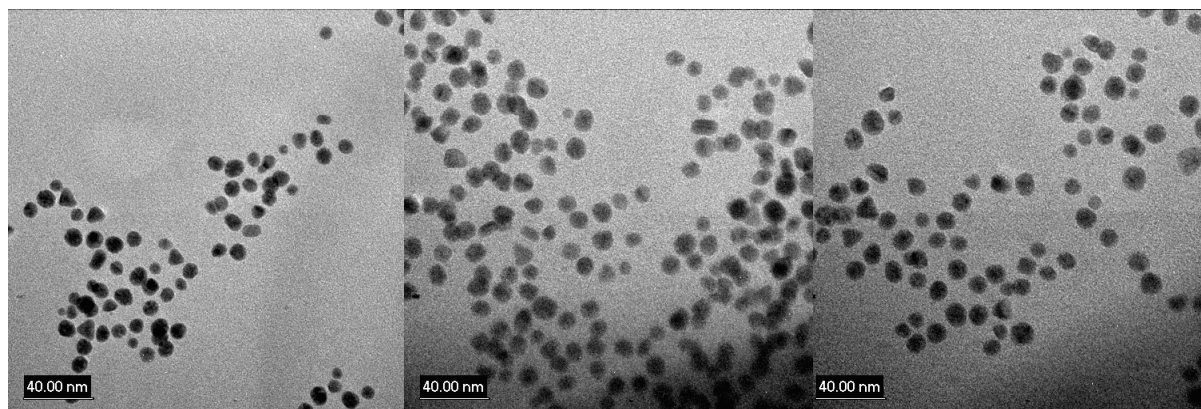


Figure 42 : images MET sur nanoparticules or/citrate, diamètre moyen de $16,2 \pm 2,1$ nm

Avec la voie NaBH_4 , il y a une adsorption compétitive entre les thiols. Avec la voie citrate, il est possible de choisir la quantité de thiols adsorbée en surface en déficit (sans saturation) de tel sorte que chaque thiol est lié en surface de façon durable. De plus, une fois la taille des particules connue, la quantité de ligands peut être rapportée à la surface (nombre par nm^2) ou à la particule (nombre par particule). Il est intéressant de comparer ces quantités aux quantités théoriques correspondant au greffage complet sur tous les sites possibles. Ce calcul est effectué en considérant que pour chaque thiol adsorbé sur une nanoparticule d'or, la même surface c'est-à-dire 3 atomes d'or est occupée.¹⁸⁴ Cette aire est évaluée à $0,197 \text{ nm}^2$ (c'est-à-dire ~ 5 thiols/ nm^2) en appliquant ce calcul à l'aire d'un atome d'or de surface avec la densité des atomes d'or dans un réseau cubique faces centrées (CFC) ($59 \text{ atomes}/\text{nm}^3$).¹⁸⁵ Cette rectification est nécessaire car un recouvrement maximal n'est observé que pour les clusters de très petites tailles pour lesquels il existe une large proportion d'atomes d'angle. Les études récentes montrent que, sur une particule de 2,2 nm, les thiols occupent une surface équivalente à 1,75 atome d'or.¹⁸⁶ Comme observé dans la littérature,^{158,159} la présence de ligands (MP) peut conduire à d'éventuelles agglomérations. Pour exemple, la stabilité des colloïdes 2 mois après l'addition des ligands est effective uniquement pour des densités de

¹⁸⁴ L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1992**, 43, 437.

¹⁸⁵ M.M. Alvarez, J.T. Houry, T.G. Schaaff, M.N. Shafiqullin, I. Vezmar, R.L. Whetten, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3706.

¹⁸⁶ M.J. Hostetler, J. E. Wingate, C.J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M. R. Clark, J.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glush, M.D. Porter, N.D. Evans, R.W. Murray, *Langmuir*, **1998**, 14, 17.

ligands inférieures à $0,75 \text{ ligand/nm}^2$ soit moins de 15% des sites de surface occupés par le 4-mercaptophénol. Le greffage d'une quantité significative de molécules fluorescentes est donc conditionné par le greffage d'une quantité suffisante de surfactants. Cette stabilité a donc été obtenue par le greffage de deux dérivés thiols préalablement utilisés,¹⁸⁷ MS et AT, comme stabilisants de surface dans des proportions déterminées par différents tests. L'objectif étant de greffer 1 ligand par nm^2 (soit $\sim 20\%$ des sites de surface), une proportion de greffage constitué de (0,5 MS, 0,5 AT, 1 MP) par nm^2 représente le rapport minimal pour l'obtention de solutions colloïdales stables pendant plusieurs mois (Tableau 4).

Densité de greffage de l'acide thiomaléique / 2-mercaptoéthane-sulfonate/ 4-mercaptophénol par nm^2	0/0/1	0,5/0,5/1	
		Sans acide tannique	Avec acide tannique
Taille moyenne des particules après 1 heure	16,2 nm	16,2 nm	7,3 nm
Taille moyenne des particules après 2 mois	Agrégats	22,9 nm	8,4 nm

Tableau 4 : évolution de la taille des particules en fonction des surfactants thiolés

Un greffage de ce type correspond à une occupation de 40% des sites disponibles de surface, les autres sites de surfaces restent donc majoritairement non thiolés.

Dans un second temps, ce protocole a été modifié en ajoutant de l'acide tannique au citrate de sodium lors de la synthèse.⁷⁴ Le diamètre des particules est ainsi réduit mais la quantité de thiols ajoutée est ajustée afin de conserver les densités déterminées précédemment (Tableau 4). Des nanoparticules de dimensions inférieures sont effectivement obtenues ; la caractérisation par microscopie électronique montre la présence de particules de 7,3 nm avec une déviation standard de 1,3 nm : elles sont polycristallines avec une structure CFC (Figure 43). Chaque particule possède une surface de l'ordre de $168 \pm 15 \text{ nm}^2$ de telle sorte que 168 ± 15 ligands/particules sont donc introduits en solution. Ces ligands (MP) constituent alors les sites de greffage pour le fluorophore.

La valeur moyenne obtenue pour les solutions analysées par MET est de $8,0 \pm 2 \text{ nm}$ (moyenne sur 4 essais et 200 particules par essai).

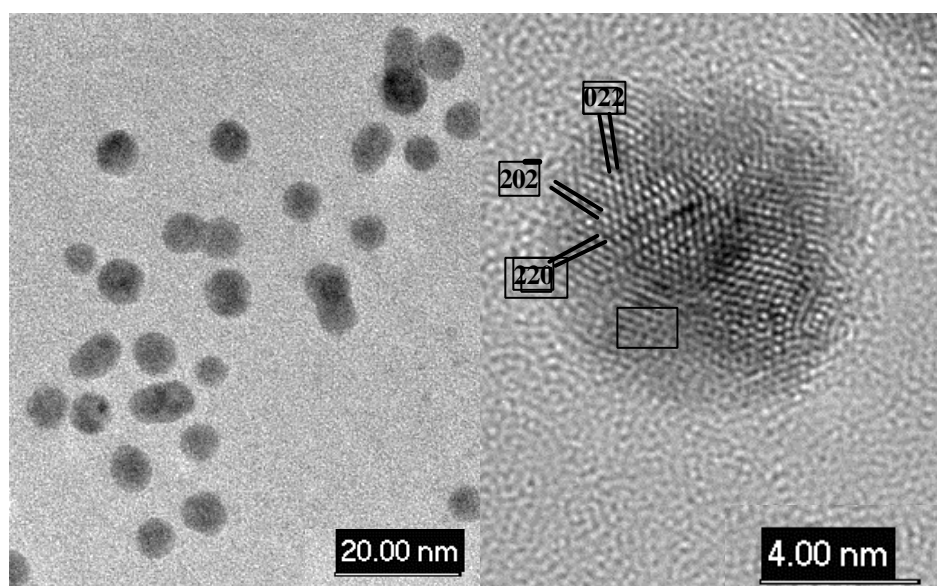


Figure 43 : images MET de nanoparticules obtenues par la méthode or/citrate/acide tannique ; indexation des plans sur un réseau CFC (image perpendiculaire au plan $\langle 1\bar{1}1 \rangle$)

¹⁸⁷ S.R. Johnson, S.D. Evans, R. Brydson, *Langmuir*, **1998**, 14, 6639.

Etape 2

La fonctionnalisation par la LRSCB est finalement réalisée en mélangeant le fluorophore aux nanoparticules en présence de triéthylamine : une solution rose/rouge est alors obtenue. La LRSCB peut alors se trouver sous différentes formes dans la solution, soit adsorbée à la surface des particules, soit conjuguée au 4-mercaptophéno.

2. Propriétés optiques des nanoparticules recouvertes de fluorophores

Considérant l'objectif de réaliser des nanohybrides de haute fluorescence (supérieure à celle des fluorophores organiques d'au moins un ordre de grandeur), il est important de vérifier que la présence de l'or, connu pour sa forte absorbance dans l'UV, ne réduit pas de façon drastique l'intensité de luminescence des fluorophores. Une étude a donc été menée comparant la luminescence de solutions de fluorophores seuls ou greffés sur des nanoparticules dans les mêmes concentrations. La perte d'intensité observée correspond à un facteur 3 pour des concentrations en LRSCB de 5 à 500 molécules/particule (exemple Figure 44 pour une concentration de 8,6 molécules/particule). Cette absorbance est modérée car la bande de fluorescence de la LRSCB à 585 nm n'interfère pas avec la bande plasmon à 540 nm. Une telle absorption de la luminescence par la bande plasmon pourrait ainsi compromettre l'augmentation espérée par le greffage de plusieurs fluorophores sur une même particule.

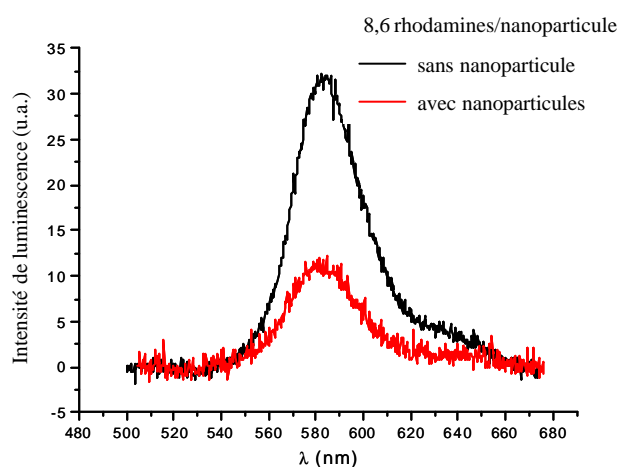


Figure 44 : comparaison de la luminescence de fluorophores libres ou à la surface de nanoparticules. Dans les deux solutions, la concentration est la même et correspond à 8,6 fluorophores/particule

3. Une procédure spécifique et originale pour le dosage des fluorophores sur la nanoparticule

La preuve que les fluorophores sont correctement liés aux particules ne peut être déduit du spectre d'absorption depuis qu'il est avéré qu'une telle liaison n'induit pas de déplacement du maximum de luminescence.

Le spectre d'absorption présenté en Figure 45 est insuffisant pour déterminer le rapport adsorption/greffage dans la mesure où aucun déplacement significatif du maximum d'absorption n'est observé après greffage. On observe simplement un léger déplacement de la bande d'absorption vers le rouge (moins de 2 nm) uniquement pour les faibles concentrations en fluorophores. Ce changement dans les propriétés optiques a déjà été observé pour des molécules de LRSCB adsorbées sur des particules d'argent.¹⁸⁸ Cependant, le déplacement observé est ici grandement masqué par la bande plasmon de surface des nanoparticules d'or, de telle sorte qu'il ne permet pas de déterminer la quantité de fluorophores greffés.

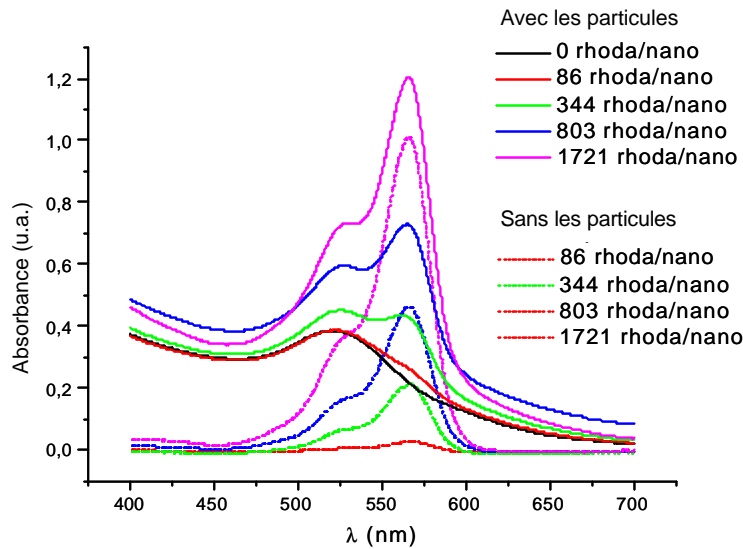


Figure 45 : mesures d'absorbance en fonction de la quantité de rhodamines introduites avec ou sans nanoparticules.

De manière à prouver et quantifier la fixation des molécules fluorescentes sur les particules, une procédure spécifique a donc été utilisée. Comme expliqué précédemment, elle consiste en un dosage des fluorophores résiduels en solution après précipitation des nanoparticules, et des fluorophores qu'elles portent, par addition de NaCl. Cette méthode se rapproche de celle utilisée par Schroedter *et al.* pour le greffage de la biotine sur des nanoparticules d'or.¹⁸⁹

Dans un premier temps, le dosage a été réalisé sur des nanoparticules porteuses de ligands, c'est-à-dire des particules avec une densité de greffage de (MS, AT, MP) par nm^2 soit 84 MS, 84 AT et 168 MP par particule. La procédure complète pour mesurer la quantité de fluorophores fixés est décrite dans la Figure 46.

¹⁸⁸ M.J. Kerker, *J. Colloid Interface Sci.*, **1985**, 105, 297.

¹⁸⁹ A. Schroedter, H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3218.

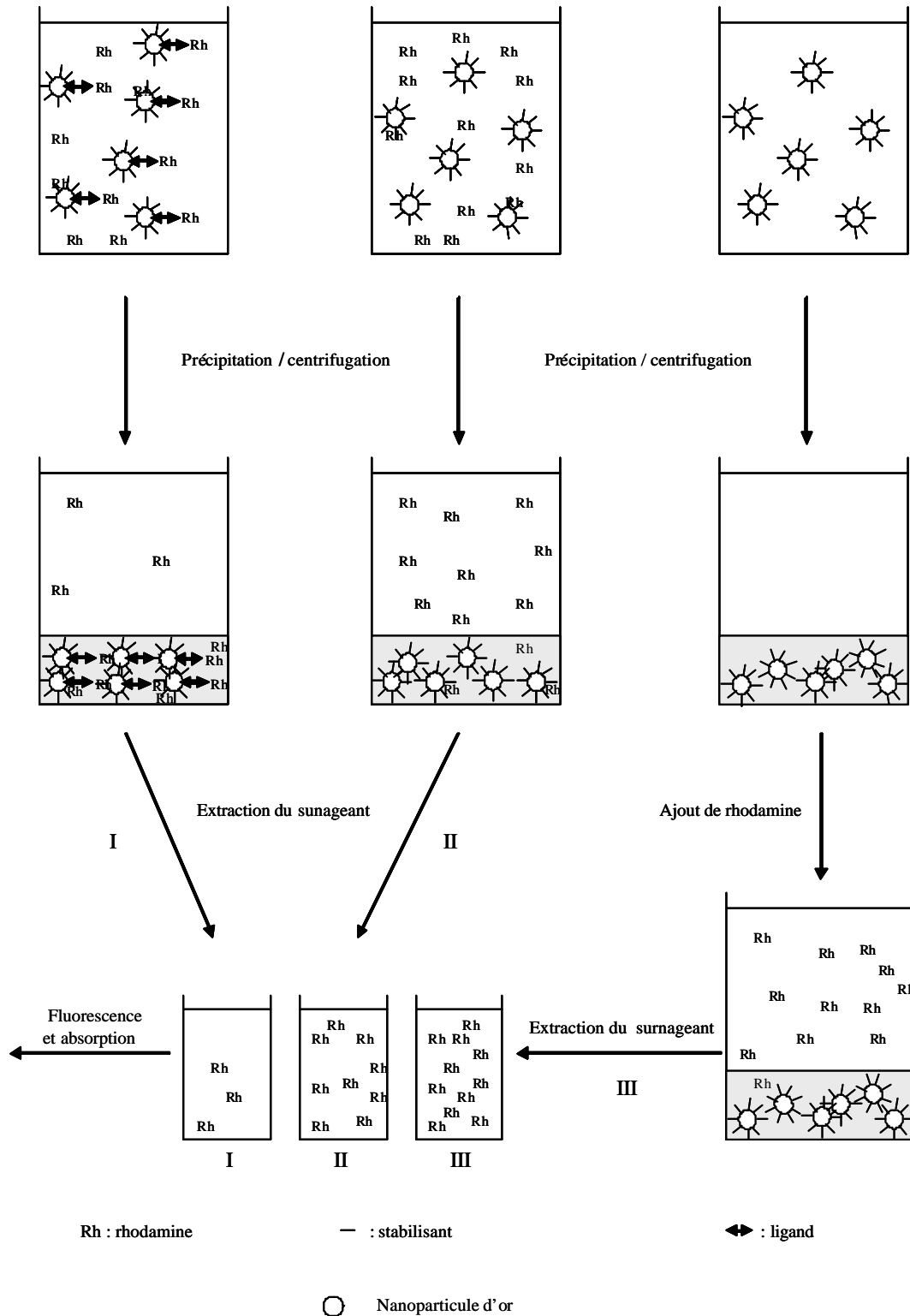


Figure 46 : protocole de dosage des luminescents greffés sur les nanoparticules d'or

D'une part, les nanoparticules synthétisées et fonctionnalisées selon les étapes 1 et 2, sont précipitées par addition de sel (solution I). La fluorescence du surnageant est alors mesurée, le signal obtenu est alors caractéristique des fluorophores non greffés (Figure 47). De l'autre, des solutions de référence ont été préparées. La première série de solutions de référence (solutions III) consiste à mesurer l'absorption d'une solution de fluorophores dans des conditions de concentrations et d'environnements identiques à celles obtenues pour les solutions colloïdales (solution I). On utilise pour cela des solutions obtenues après l'étape 1 et

précipitées en présence de sel, auxquelles on ajoute la LRSCB dans des concentrations similaires aux solutions colloïdales. La fluorescence et l'absorption du surnageant de ces solutions de référence sont alors mesurées. Les intensités recueillies correspondent au signal de tous les fluorophores introduits dans l'étape 2 et comme prévu, il est supérieur à celui du surnageant de la solution colloïdale. Une quantification des fluorophores adsorbés sur les particules peut être réalisée par simple comparaison des spectres de luminescence des deux solutions (I et III). On soustrait pour cela l'intensité de fluorescence mesurée pour la solution I qui contient les nanoparticules à celle obtenue pour la solution III contenant uniquement les fluorophores et on en déduit une intensité correspondants aux fluorophores adsorbés. Une quantification identique est réalisable par comparaison des absorptions UV-visible sur le surnageant. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 47.

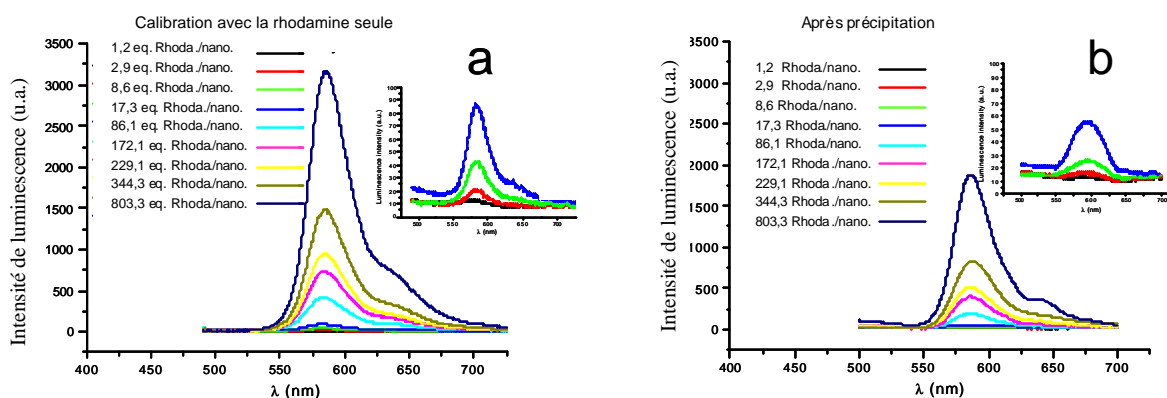


Figure 47 : fluorescence en fonction du nombre de rhodamines en absence (a) ou en présence (b) de nanoparticule (en insert : les grossissements aux faibles concentrations)

Dans un second temps, le dosage a été réalisé sur les mêmes nanoparticules mais sans ligand soit des particules avec des densités de greffage de 0,5 MS et 1,5 AT par nm^2 . Ces solutions suivent le même protocole que les solutions colloïdales porteuses de ligand (Figure 46, solution II). Les résultats en absorption et en fluorescence sont concordants et présentés dans la Figure 48. Ces résultats nous permettent de différencier les molécules chimisorbées des molécules physisorbées en comparant l'efficacité du greffage avec ou sans ligands.

Le premier résultat est donc une grande variation du nombre de fluorophores fixés sur la particule en fonction de la présence ou non de ligands. Dans le cas des nanoparticules sans ligands (solution II), les fluorophores sont uniquement adsorbés (physisorbés) ; les fluorophores supplémentaires sur les nanoparticules porteuses de ligands MP sont à attribuer au greffage sur ces ligands. Le nombre de fluorophores adsorbés augmente avec le nombre de fluorophores introduits et de la même façon, on observe une augmentation du nombre de fluorophores greffés jusqu'à un point d'inflexion autour de 550 fluorophores introduites/particule (Figure 48). A cette concentration, on a donc approximativement 200 fluorophores greffés par particule, 80 adsorbés et 270 qui restent en solution. Une telle valeur de 200 ± 30 est en accord avec le nombre de ligands greffés théoriquement en surface soit 168 ± 15 MP/particules.

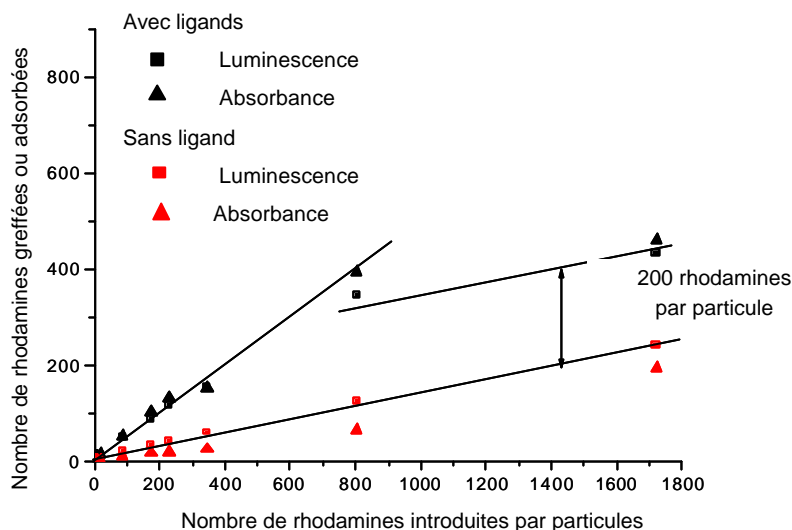


Figure 48 : variation de la quantité de fluorophores greffés et adsorbés en fonction du nombre de rhodamines introduites en solution

Le fait que le nombre de fluorophores greffés corresponde au nombre de ligands introduits durant la synthèse est la preuve de deux phénomènes importants : premièrement, tous les ligands sont bien greffés en surface, et deuxièmement, chaque ligand est lié de manière covalente à un fluorophore. Ce résultat est la première preuve expérimentale que la réaction de greffage d'un thioalcane sur une surface d'or est, dans le cas de la voie citrate, quasi-totale. Au-delà de cette concentration critique de 550 fluorophores introduits/particules, seule l'adsorption (physique) de fluorophores devient possible ce qui est en parfaite concordance avec les courbes comparatives avec et sans ligand dont la pente devient alors similaire.

Ceci valide donc une procédure très simple pour quantifier les fluorophores greffés ou adsorbés sur les nanoparticules obtenues par voie citrate. Cette technique nous permet ainsi de prouver que, dans le cas d'un greffage en deux étapes (greffage d'un ligand puis d'un fluorophore sur ce ligand), les deux étapes sont effectivement réalisées. Nous démontrons en particulier que tous les ligands peuvent être greffés sur les nanoparticules d'or si leur nombre est inférieur à la quantité de sites disponibles en surface. Enfin, dans le cadre de l'utilisation de ces nanoparticules en tant que sondes de détection biologiques, cette étude montre qu'il est possible de greffer au moins 200 fluorophores par particule et dans la mesure où la présence des nanoparticules d'or diminue leur luminescence par un facteur 3, l'augmentation de l'efficacité de détection par un facteur de ~ 70 peut raisonnablement être envisagée. Le problème de cette méthode réside cependant dans l'élimination des fluorophores qui ne seraient pas greffés à la surface des nanoparticules. Ces fluorophores libres pourraient alors réagir au moment de leur utilisation sur des oligonucléotides et troubler la mesure.

B. Greffage direct : Modification de fluorophores organiques pour le greffage

1. Modification de la lissamine rhodamine B (LRSCB)

La modification de la lissamine rhodamine B peut être réalisée par réaction d'une amine¹⁷³ ou d'un alcool¹⁷⁴ sur la fonction chlorure de sulfonyle en milieu basique. Ce type de réaction sur la LRSCB est par ailleurs décrit dans la littérature soit sur des amines^{173,174,176,177,178,179} ou alcool non thiolés,¹⁸¹ soit sur des amines thiolées mais greffés préalablement à la surface de

particules d'or. Cependant, aucun article à ce jour ne décrit la substitution d'une molécule thiolée sur la LRSCB, les seuls articles en ce sens sont le fait de Reinhoudt *et al.* sur des thioethers porteurs d'une fonction amine terminale.¹⁹⁰ Les fluorophores ainsi synthétisés sont greffés ensuite en surface de nanoparticules d'or et une grande partie de la fluorescence est « quenchée » par la nanoparticule. L'efficacité du quenching est directement relié à la longueur de la liaison et la taille des particules¹⁹⁰. L'objectif de notre travail était donc de conjuguer la LRSCB à un thiol afin de greffer celle-ci en grand nombre à la surface des nanoparticules. En jouant sur la quantité de fluorophores greffés, on peut espérer compenser les pertes de fluorescence par quenching et ainsi améliorer la fluorescence par rapport à un fluorophore seul. Une réaction de substitution nucléophile du 4-mercaptophénol a donc été réalisée en présence de triéthylamine. Les analyses pratiquées en CCM sur les produits de réaction en quantité stoechiométrique ont révélé la disparition du mercaptophénol indiquant ainsi la réaction complète de ce dernier. Afin de favoriser la « thiolation » de toutes les molécules de LRSCB, cette réaction est réalisée en présence d'un large excès de mercaptophénol. Les analyses par CCM sur ces produits révèlent un grand nombre de produits avec des tâches très proches les unes des autres. L'analyse par CCM de la LRSCB de départ fournie par Flucka et conservée au préalable à -30°C révèle de la même façon au moins 5 ou 6 tâches selon les conditions opératoires de chromatographie. La LRSCB utilisée n'est donc pas pure, elle se compose tout d'abord des deux isomères (2) et (4) de la LRSCB (Figure 49) mais présente aussi des molécules ayant subi une dégradation. En effet, les dérivés sulfochlorés sont instables en présence d'eau et nécessitent donc une réaction avec les phénols à basse température.¹⁹¹ Malgré les précautions prises lors de la réaction, une partie de la LRSCB est donc hydrolysée. Les différentes tentatives de séparation sur colonne ne permettent pas d'isoler un composé pur, aucun solvant ne permettant une différence d'élution suffisante. La présence de ces différents composés ne permet pas une analyse des spectres RMN dans les meilleures conditions (ANNEXE VII). Cependant, l'analyse comparative entre le spectre de la LRSCB et le produit de la réaction entre le 4-mercaptophénol et la LRSCB montre l'apparition de 2 doublets avec un déplacement chimique autour de $\delta = 6,8$ ppm correspondant donc à la multiplicité et aux déplacements chimiques attendus pour les protons en α et β du mercaptophénol après substitution (ANNEXE VIII). L'analyse par spectrométrie de masse apporte des informations supplémentaires sur la composition du produit. Cette analyse reste toutefois difficile à interpréter, la mesure se déroulant en solution aqueuse très diluée, on observe là encore une hydrolyse de la LRSCB. En effet, l'analyse sur la LRSCB commerciale révèle près de 7 pics pour $m/z < 682$ avec un pic majoritaire à 559,2 (ANNEXE IX). Ce pic correspond à l'hydrolyse du SO_2Cl en SO_3H passant ainsi d'une masse moléculaire attendue de 577,1g/mol à 558,2. Le spectre de masse obtenu à partir du produit de la réaction présente lui aussi plusieurs pics dont les principaux à $m/z = 593,1 ; 653,0 ; 669,1$ et $702,9$. On ne retrouve donc pas le pic moléculaire théorique à 666,8 (ANNEXE X). Ce spectre nous indique néanmoins que le couplage a bien été effectué car les pics massiques obtenus diffèrent en tous points de ceux du réactif de départ. Même si le produit obtenu n'est pas clairement caractérisé, les informations conjointes de la RMN et de la spectrométrie de masse nous confortent dans l'idée que le couplage a bien été réalisé. On peut toutefois se trouver en présence d'un mélange mais cette éventualité ne génère pas de problème pour l'application sur des puces ADN.

¹⁹⁰ E. Dulkeith, A.C. Moreani, T. Niedereichholz, T.A. Klar, J. Feldmann, *Phys. Rev. Lett.*, **2002**, 89, 203002.

¹⁹¹ C. Lefevre, H.C.Kang, R.P. Haughland, N. Malekzadeh, S. Arttamangkul, R. P. Haughland, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 482.

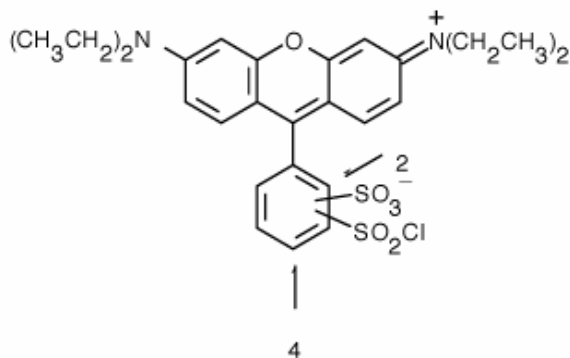


Figure 49 : isomères 2 et 4 de la LRSCB

2. Tests sur puces ADN

Les résultats obtenus par caractérisation RMN et spectrométrie de masse et la présence de travaux préalable sur le couplage R-OH/LRSCB laissent ainsi supposer la modification d'au moins une partie des molécules de LRSCB sous forme de dérivés thiolés. Une étude préliminaire sur l'application des nanohybrides a donc été menée, la présence de molécules de LRSCB non greffées ne présentant pas un obstacle à l'interprétation dans la mesure où ces dernières sont éliminées lors des étapes de lavages.

La réalisation de ces nouvelles biopuces a pour but de permettre une diminution du seuil de détection de ces dernières par fluorescence. Cette amélioration passe par l'élaboration de nanoparticules porteuses en surface d'au moins un nucléotide pour permettre leur reconnaissance et leur immobilisation par hybridation mais aussi de nombreux fluorophores. Les nanoparticules d'or sont sujettes à des réactions d'échange/compétition entre les différents thiols et sont susceptibles de s'agréger dans le milieu salin utilisé pour les biopuces. Des tests préalables ont donc été nécessaires pour connaître les conditions optimales d'élaboration de ces nouveaux outils de détection.

La quantité d'oligonucléotides optimale a été évaluée selon les stratégies (1a Figure 37 et 1b Figure 38) décrites en introduction. Ces stratégies sont basées sur la réalisation dans un premier temps de nanoparticules complètes (porteuses de nucléotides et de fluorophores) puis leur immobilisation par hybridation sur les biopuces. Dans l'option a, l'oligonucléotide est greffé avant les fluorophores et vice et versa pour l'option b. Les résultats obtenus de détection de la fluorescence sont rassemblés dans les courbes a et b de la Figure 50.

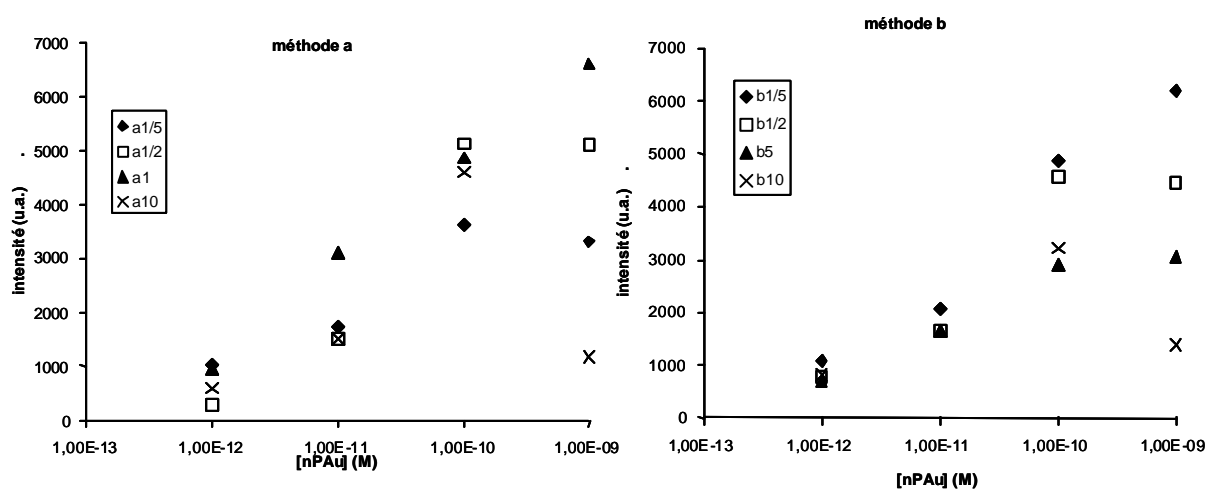


Figure 50 : Quantification de fluorescence sur biopuces obtenus par la stratégie 1a et 1b

Ces études ont donc été menées sur des solutions colloïdales de nanoparticules de 12 nm recouvertes de 100 Rhoda-SH et statistiquement de 0,2 ($1/5$) à 5 oligonucléotides/particule. Ces nanoparticules de 12 nm sont obtenues par la méthode citrate / acide tannique préalablement décrite mais diffèrent sensiblement des diamètres de 8 nm obtenus classiquement. Cette variation est en partie due à l'absence de stabilisants (AT, MS) en surface qui entraîne une légère modification de la taille dans le temps. La valeur de 100 fluorophores par nanoparticule a été choisie arbitrairement en considérant la quantité de sites accessibles sur chaque nanoparticule et l'extinction de fluorescence liée à la présence de la nanoparticule. Le nombre de sites de surface accessibles pour une nanoparticule de 12 nm étant de l'ordre de 2400 (ANNEXE VI) avec 100 Rhoda-SH, on ne s'expose pas à un risque de saturation de la surface. D'autre part, compte tenu de l'extinction de fluorescence de l'ordre d'un tiers (Figure 44), l'augmentation de fluorescence potentielle de ce type de marqueur luminescent augmenterait de façon significative (par un facteur 30) l'intensité de luminescence. Concernant l'option b, on observe une bonne linéarité des intensités détectées en fonction de la concentration d'incubation des biopuces réalisées à partir de nanoparticules comportant 1 oligonucléotide pour 5 nanoparticules. Les tracés obtenus pour une quantité supérieure en oligonucléotides présentent un palier voire une chute de l'intensité pour les fortes concentrations. Cette chute de la fluorescence peut s'expliquer par une réaction d'échange entre les deux thiols, le greffage de l'oligonucléotide entraînant le départ des fluorophores. Cet échange provoque pour un rapport de 10 oligonucléotides par particule une précipitation de la solution, celle-ci passant d'une couleur rouge à une couleur noire. Cette précipitation s'explique par une modification des propriétés de surface, l'oligonucléotide étant majoritairement chargé négativement. L'optimum de détection se situera pour cette option pour un rapport de 1 oligonucléotide pour 5 nanoparticules.

Concernant l'option a, on observe de la même façon une chute de l'intensité aux fortes concentrations en nanoparticules. La seule série conservant sa linéarité sur toute la gamme de concentration est celle élaborée avec 1 oligonucléotide/particule. Ce résultat ne va pas pour autant à l'encontre de celui obtenu dans le cadre de l'option b qui indiquait un optimum pour un rapport de $1/5$. En effet, dans le cadre de l'option a, les phénomènes observés ne sont pas analogues. On se trouve dans ce cas en présence de nanoparticules porteuses pour certaines seulement de quelques oligomères sur lesquelles on apporte des fluorophores en nombre. Il se crée alors un équilibre à la surface des nanoparticules entraînant le départ des oligonucléotides aux fortes concentrations. Chaque particule ne portant plus ou pas d'oligonucléotide ne peut plus être immobilisé par hybridation et entraîne du même coup une perte d'intensité de luminescence correspondant à tous les fluorophores qu'elles portent. Pour un rapport de 10 oligonucléotides/particule, on observe cependant les mêmes phénomènes que pour l'option b à savoir une chute de la luminescence due à la précipitation des particules. Dans cette situation, le meilleur compromis semble donc être le greffage préalable d'un seul oligonucléotide par particule ; on se trouve alors à un équilibre favorable entre un maximum de particules porteuses d'au moins un oligonucléotide greffé et un maximum de fluorophores sur chaque particule. Si l'on compare maintenant ces deux protocoles, on s'aperçoit donc que l'optimum de détection est obtenu pour un rapport inférieur en oligonucléotides pour l'option b (fluorophores greffés en premier). Outre l'avantage pratique et économique de consommer une quantité moindre d'oligonucléotides, cette option permet aussi d'éviter la présence d'oligonucléotides libres qui pourraient gêner l'hybridation des sondes fluorescentes sur les biopuces.

Ces stratégies ayant montré des résultats satisfaisants, l'option c (Figure 40) et la stratégie 2 (Figure 41) décrites en préambule n'ont pas été expérimentées. Ces protocoles présentent, en effet, l'inconvénient majeur de nécessiter deux opérations consécutives sur les biopuces ce qui d'un point de vue application est complexe et difficilement réalisable.

La stratégie et le rapport optimum étant fixés, nous nous sommes attachés à définir la quantité optimale de fluorophores pouvant être greffés à la surface des nanoparticules sur lesquelles on ajoutera donc 1 oligonucléotide pour 5 nanoparticules. Des solutions colloïdales avec des quantités variables de 1 à 2000 fluorophores par particule ont donc été élaborées et testées sur des billes de Sépharose. Ces billes sont ensuite lavées afin d'éliminer les particules non hybridées et la rhodamine libre puis testés en microscopie par fluorescence. Les clichés obtenus (Figure 51) présentent une augmentation croissante de la fluorescence en fonction du nombre de fluorophores introduits dans les solutions colloïdales. La fluorescence observée semble atteindre un palier pour un rapport fluorophores/particule compris entre 400 et 800.

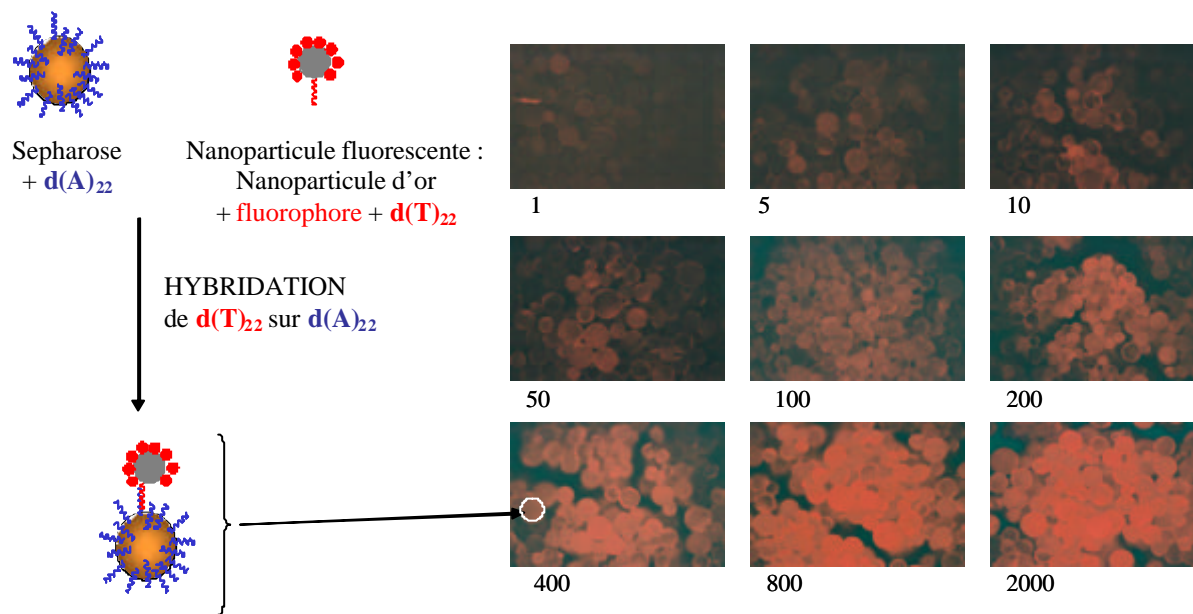


Figure 51 : protocole d'élaboration et clichés en microscopie par fluorescence sur billes de Sépharose dont une partie des brins d(A)₂₂ est hybridée par leurs complémentaires portés par des nanoparticules à différentes teneurs en fluorophores

Cette observation est confirmée par quantification de la fluorescence. La Figure 52 présente les résultats de quantification obtenus en faisant la moyenne sur 4 clichés différents d'une même solution colloïdale. On observe ainsi une augmentation linéaire entre 1 et 400 puis une limitation avec la formation d'un palier. Ces observations confirment d'une part le greffage des fluorophores à la surface des nanoparticules et d'autre part l'immobilisation de ces nanoparticules sur les billes de Sépharose. Le greffage de fluorophores est toutefois limité autour de 800 fluorophores par particule, la fluorescence atteignant alors son maximum. On peut donc supposer que pour cette valeur, la surface des nanoparticules est alors saturée en fluorophores. Ce résultat est loin de celui obtenu par le calcul théorique basé sur les travaux de Murray (ANNEXE VI) qui est de 2400 thiols par particule de 12 nm. Cette différence peut s'expliquer par un encombrement stérique et une répulsion électrostatique supérieure des thiols utilisés dans notre cas qui limite l'accessibilité à la surface des nanoparticules. D'autre part, le diamètre moyen obtenu par MET est obtenu sur quelques centaines de nanoparticules qui ne sont peut-être pas représentatives de la taille moyenne réelle. Une variation de l'ordre de 2 nm entraînerait alors une variation importante de la quantité de sites accessibles en surface (passant à 2000) et expliquerait cet écart par rapport à la théorie. Au-delà de 800 fluorophores par particule, on observe de plus une légère décroissance de la luminescence. Cette observation peut s'expliquer par des phénomènes de quenching pour les fortes concentrations en fluorophores à la surface des nanoparticules. La promiscuité augmente alors la proportion des phénomènes de désexcitation non radiatifs par rapport aux émissions

radiatives. Enfin, la faible valeur de seuil observée indique que la plupart des fluorophores comportent bien une fonction thiolée. Le greffage indirect nous ayant démontré que la physisorption est limitée et ne permet pas d'atteindre ces valeurs.

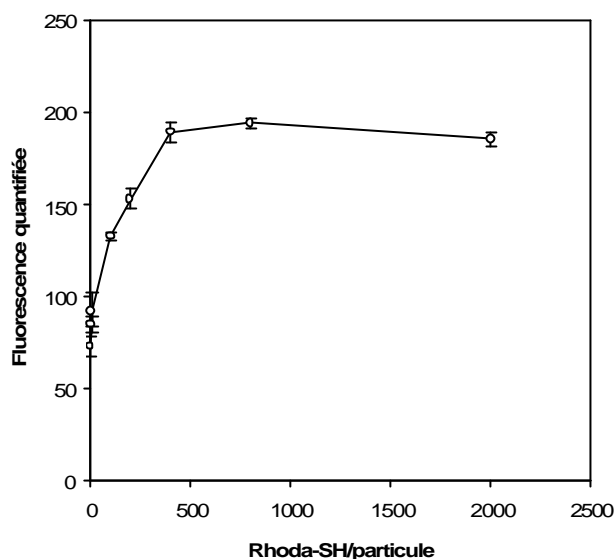


Figure 52 : quantification de la fluorescence sur les billes de Sépharose dont une partie des brins d(A)₂₂ est hybridée par leurs complémentaires portés par des nanoparticules à différents teneurs en fluorophores

Cette étude préliminaire nous a donc permis de démontrer que l'utilisation pour la détection sur puces à ADN de nanoparticules fluorescentes constituées de nombreuses Rhoda-SH et d'au moins un oligonucléotide greffé à la surface d'une nanoparticule d'or était réalisable et prometteuse. Cette étude a ainsi évalué des conditions optimales pour la synthèse de ces marqueurs originaux avec le greffage maximal de 800 Rhoda-SH et 0,2 oligonucléotide par particule. Ces marqueurs permettent donc d'envisager l'élaboration de marqueurs d'intensités de luminescence 260 fois supérieures à celle d'un marqueur fluorescent «classique» muni d'un simple fluorophore. Cette technique permet le greffage de près de 10 fois plus de fluorophores par rapport aux marqueurs récemment développés sur les nanoparticules d'or.⁴⁷ Le mode d'élaboration de ces marqueurs luminescents est de plus très simple de mise en œuvre et utilise des rhodamines thiolées dont le coût est relativement faible par rapport aux dérivés cyanine Cy3 ou Cy5. Ces marqueurs représentent donc une voie d'amélioration simple et rentable pour l'amélioration de la détection sur puces ADN.

Le gain en luminescence de ces marqueurs nanoparticulaires fluorescents a été évalué en le comparant à celui de brins ADN marqués par un seul fluorophore rhodamine (Figure 53). Cette étude révèle que pour des concentrations en brins ADN marqués par un seul fluorophore comprises entre 10^{-7} et 10^{-9} M, l'intensité de luminescence décroît très rapidement jusqu'à atteindre de faibles intensités de luminescence. Pour une même concentration en oligonucléotide (de l'ordre de 10^{-9} M), la fluorescence observée pour des brins marqués par des nanoparticules fluorescentes est alors 10 fois supérieure à celle observée pour des brins marqués par un simple fluorophore. Ces marqueurs permettent ainsi l'observation d'une intensité de luminescence satisfaisante pour des concentrations en oligonucléotides comprise entre 10^{-9} et 10^{-12} M, ce qui n'est pas réalisable à l'aide de marqueurs luminescents classiques.

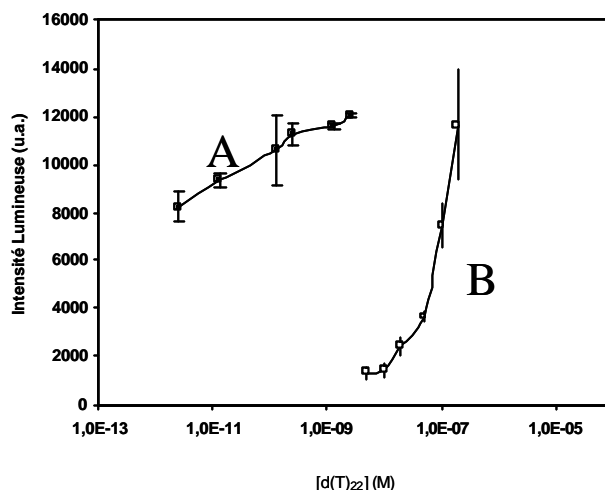


Figure 53 : comparaison des intensités lumineuses entre un brin ADN marqué soit par une nanoparticule fluorescente (A) soit par un simple fluorophore rhodamine (B).

C. Conclusion

Ce travail sur l'élaboration de sondes luminescentes nanoparticulaires a été basé sur le greffage en nombre de fluorophores organiques (plusieurs centaines) sur des nanoparticules d'or. Des nanoparticules d'or ont donc été synthétisées par la méthode citrate qui semblait la plus opportune pour l'élaboration d'une nanoparticule multifonctionnelle (fluorophore + oligonucléotide). Les synthèses par voie citrate et citrate / acide tannique permettent d'obtenir de manière reproductible des nanoparticules de taille homogène et stables respectivement de 16 et 8-12 nm. Le greffage de fluorophores, envisagé de façon indirecte par l'intermédiaire d'un ligand thiolé et de manière directe par greffage d'un dérivé thiolé de la lissamine rhodamine B, a montré son efficacité. L'efficacité du greffage indirecte a été prouvée par l'élaboration d'un dosage original tandis que l'efficacité du greffage directe a été révélée directement par son application en tant que sonde luminescente sur des biopuces. Cette application en tant que sondes luminescentes a donné des résultats indiquant un nombre approximatif de 800 rhodamines/particule (de 12 nm), concordant ainsi avec les 200 rhodamines greffées par particule (de 8 nm) évaluées par dosage (le nombre de surfactants étant fonction du nombre de sites accessibles en surface). Dès lors, l'application de ces nouvelles sondes luminescentes nanométriques montrent un potentiel très intéressant qui pourrait permettre de diminuer le seuil de détection en fluorescence de deux ordres de grandeurs.

D. Perspectives

Les limitations de cette méthode résident dans les difficultés de purifications des solutions colloïdales. L'utilisation de nanoparticules par la voie citrate empêche en effet toute précipitation/redispersion des nanoparticules, ce qui nous oblige à travailler en défaut de fluorophores lors de la fonctionnalisation. L'utilisation de la méthode de Brust pour la synthèse des nanoparticules d'or permettrait l'obtention de particules redispersables mais ne serait pas sans inconvénient. D'une part, les nanoparticules obtenues par la méthode de Brust dépassent rarement les 5 nm ce qui limite la quantité de fluorophores greffables, d'autre part, elles peuvent poser des problèmes dans la synthèse et la multifonctionnalisation de la surface. La désorption des thiols greffés à la surface des nanoparticules est un problème majeur lors de

la multifonctionnalisation. La réalisation d'une couche de silice protectrice autour des nanoparticules d'or semble être un moyen efficace pour éviter la désorption des fluorophores. Les travaux de Zhou *et al.* rapportent des particules de ce type.⁴⁷ L'élaboration de particules protégées par une couche de silice est fastidieuse mais pourrait permettre une amélioration substantielle de la luminescence par la protection des fluorophores contre le photoblanchiment d'une part et d'autre part, par la réduction des effets de quenching lié à la proximité de la nanoparticule d'or (qui divise par 3 l'intensité émise pour chaque fluorophore greffé). On peut ainsi imaginer une architecture proche de celle adoptée par Zhou *et al.*, composée d'une nanoparticule d'or entourée d'une première couche de silice « isolante » sur laquelle on viendrait greffer les fluorophores (Figure 54). Les fluorophores seraient alors éloignés de la surface de la particule ce qui diminuerait l'effet de quenching. Les fluorophores seraient alors protégés dans une seconde couche de silice qui les protégera des phénomènes de photoblanchiment et permettra de greffer dans un troisième temps la sonde biologique.

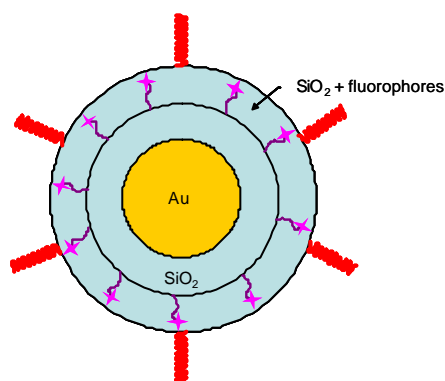


Figure 54 : nanoparticule fluorescente protégée par une double couche de silice.

Une autre manière efficace pour éviter la désorption consisterait à greffer des molécules fluorescentes multithiolées. Mais ces dernières entraîneraient ensuite des problèmes pour la multifonctionnalisation car elles satureraient la surface des nanoparticules et empêcheraient la fonctionnalisation par une sonde biologique. De plus, ils ne résoudraient pas les problèmes de quenching de fluorescence par la nanoparticule. La solution communément utilisée dans de nombreuses études est l'éloignement du fluorophore par l'utilisation d'un oligonucléotide comme ligand (espaceur). Cette solution bien que très simple est toutefois très coûteuse et peut engendrer des « interférences » lors de l'hybridation sur biopuces. Une solution originale serait l'utilisation de polymères comme espaceurs. Ces polymères devront posséder un caractère hydrophile pour conserver la stabilité des nanoparticules ; des polymères du type polyéthylène glycol ou polylysine sont donc envisageables. Une alternative séduisante serait l'élaboration de polymères « diblock » possédant une partie hydrophobe thiolée qui aura tendance à s'adsorber sur la nanoparticule d'or et une partie hydrophile qui assurera sa solubilité et sa stabilité en solution aqueuse.

Partie expérimentale II :

I. ELABORATION D'UN NANOHYBRIDE D'OR POUR UNE APPLICATION COMME AGENT DE CONTRASTE.....	87
A. Introduction : de nouveaux agents de contraste pour un meilleur diagnostic	87
B. Synthèse d'un complexant thiolé	88
C. Synthèse de nanohybrides d'or	90
D. Complexation du gadolinium	91
E. Complexation de l'euporium.....	93
II. MODE OPERATOIRE	94
A. Synthèse d'un complexant thiolé	94
B. Synthèse de nanohybrides d'or	95
C. Complexation des lanthanides.....	95
1. Complexation du gadolinium.....	95
2. Mise au point d'une méthode de dosage	95
3. Dosage des DTDTPA en surface des nanoparticules	96
4. Complexation de l'euporium.....	96
5. Caractérisation.....	96
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	97
A. Synthèse d'un nouveau dérivé thiolé du DTPA.....	97
B. Préparation de nanoparticules hybrides fonctionnalisées stables	100
C. Des propriétés intéressantes pour l'IRM	109
D. Complexation de l'euporium.....	111
E. Conclusion.....	112
F. Perspectives.....	113
CONCLUSION GENERALE.....	114

I. Elaboration d'un nanohybride d'or pour une application comme agent de contraste

A. Introduction : de nouveaux agents de contraste pour un meilleur diagnostic

L'IRM est une technique non-invasive très performante dans la réalisation en temps réel d'une cartographie en 3 dimensions du corps humain que ce soit à un niveau cellulaire ou même moléculaire.^{192,193,135} Cette technique est parfaitement adaptée au diagnostic in vivo sur la plupart des organes et à la détection de tumeurs naissantes.¹⁹⁴ La variation de la concentration en eau dans le corps permet un contraste entre les différents organes et de ce fait, une délimitation et une identification de la plupart des tissus. Pour faciliter l'interprétation des images, des composés paramagnétiques ou superparamagnétiques sont cependant utilisés afin d'augmenter le contraste par réduction des temps de relaxation longitudinale et transverse (T_1 et T_2) des protons des molécules d'eau proches.¹⁹⁵ Leur présence se manifeste localement par un éclaircissement (contraste positif : agents paramagnétiques) ou un assombrissement (contraste négatif : agents superparamagnétiques). Parmi les agents de contrastes induisant un contraste positif, les complexes de gadolinium sont les plus répandus.¹²¹ ¹⁹⁶ Cependant ils sont handicapés par un faible temps de rétention dans le corps dans la mesure où ils sont éliminés par le système rénal.¹⁹⁷ Le développement de nouveaux agents de contrastes plus performants s'oriente vers le greffage de complexant du gadolinium et plus rarement du manganèse sur des particules nanométriques. Différentes stratégies ont été développées au cours des dix dernières années pour synthétiser des agents de contraste plus efficaces à base de gadolinium : gadolinium supporté sur des macromolécules,^{124,125,126} des micelles,^{127,32} des liposomes,^{128,129} des nanoparticules^{130,132,131,133} mais aussi des nanoparticules d'oxyde de gadolinium et des gadofullerènes.¹³⁴ Ces nouveaux agents de contraste sont tous caractérisés par une augmentation du poids moléculaire et de la quantité de Gd^{3+} par agent de contraste. Le double objectif de ces agents de contraste est donc d'améliorer le contraste par l'augmentation de l'efficacité et de la concentration en gadolinium mais aussi par une augmentation du temps de rétention.

Afin de remplir ces objectifs, des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des complexes du gadolinium ont été développées. Des travaux très récents rapportent la fonctionnalisation de nanoparticules d'or par des complexes de lanthanides par des dérivés thiolés de la 2,2'-dipyridine.¹⁹⁸ L'utilisation de nanoparticules d'or en tant qu'agent de contraste revêt de nombreux avantages. Les nombreuses méthodes de synthèses développées au cours des vingt dernières années permettent l'élaboration de nanoparticules d'or par des protocoles simples et reproductibles. Leurs tailles et leurs propriétés peuvent être contrôlées par la nature du stabilisant greffé en surface.⁶² Durant la dernière décennie, des nanoparticules d'or ont été utilisées largement et avec succès pour des applications dans la détection biologique par

¹⁹² R. Weissleder, U. Mahmood, *Radiology*, **2001**, 219, 316.

¹⁹³ S. Langereis, H.-A.T. Kooistra, M.H.P. van Genderen, E.W. Meijer, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1271.

¹⁹⁴ M.F. Kircher, U. Mahmood, R.S. King, R. Weissleder, L. Josephson, *Cancer Res.*, **2003**, 63, 8122.

¹⁹⁵ S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 19.

¹⁹⁶ A. Merbach, E. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging*; John Wiley and Sons: Chichester, **2001**.

¹⁹⁷ B. Sitharaman, K.R. Kissell, K.B. Hartman, L.A. Tran, A. Baikalov, I. Rusakova, Y. Sun, H.A. Khant, S.J. Ludtke, W. Chiu, S. Laus, É. Toth, L. Helm, A.E. Merbach, L.J. Wilson, *Chem. Commun.* **2005**, 3915.

¹⁹⁸ B.I. Ipe, K. Yoosaf, K.G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1907.

différentes techniques (spectroscopie UV-visible,^{199,200,201} résonance plasmon de surface,^{202,203} microscopie,^{42, 43} électrochimie,²⁰⁴ ...) et la vectorisation vers des sites spécifiques de cellules pour l'adressage de sonde pour le diagnostic ou de médicaments.^{205,206,207,208} Si les premières applications étaient basées sur la non-toxicité des nanoparticules d'or,²⁰⁹ des études récentes ont révélé l'effet létal de nanoparticules d'or suite à l'absorption de lumière proche IR sur des cellules tumorales ciblées à l'aide d'un groupement spécifique.^{210,211} Les nanoparticules d'or peuvent donc suivant leur forme diffuser ou/et absorber les rayonnement dans le proche IR. Cette diffusion autorise donc l'imagerie in vivo car les tissus vivants sont transparents aux longueurs d'onde du proche IR tandis que l'absorption dans le proche IR induit un effet photothermique menant à la mort des cellules porteuses des particules d'or. Ces matériaux comportent donc à la fois des possibilités pour l'imagerie in vivo et pour le traitement thérapeutique, les rendant ainsi très attractives.^{210,211} De plus, les nanoparticules d'or peuvent aussi servir de plates-formes sur lesquelles un grand nombre de molécules avec des propriétés supplémentaires ou complémentaires peuvent se fixer. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès pour les rendre fluorescentes par greffage de molécules organiques thiolées fluorescentes en surface.²¹² Une grande partie de la fluorescence émise est réabsorbée par le cœur métallique,^{190,213} mais ces particules demeurent plus lumineuses que n'importe quelle molécule fluorescente seule (cf partie expérimentale : Elaboration d'un nanohybride fluorescent page 55).^{47,214,215}

Des nanoparticules d'or porteuses de complexes du gadolinium sont donc susceptibles d'augmenter le contraste positif des images IRM par rapport à des agents de contraste classiques.

B. Synthèse d'un complexant thiolé

Les molécules soufrées, en raison de leur forte affinité pour l'or, permettent des possibilités de fonctionnalisation quasi-illimitées des nanoparticules d'or. Ce constat a d'ores et déjà permis l'élaboration d'un grand nombre de nanoparticules fonctionnalisées pour des domaines d'application aussi diverse et variée que la catalyse, l'optique non linéaire, l'électrochimie ou la biologie.

¹⁹⁹ R. Jin, G. Wu, Z. Li, C.A. Mirkin, G.C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1643.

²⁰⁰ H., Li, L. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 14036.

²⁰¹ D. Kalogianni, T. Koraki, T.K. Christopoulos, P.C. Ioannou, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, *21*, 1069.

²⁰² E. Hutter, M.-P. Piléni, *J. Phys. Chem.*, **2003**, *107*, 6497.

²⁰³ I.H. El-Sayed, X. Huang, A. El-Sayed, *NanoLett.*, **2005**, 829.

²⁰⁴ T. M.-H. Lee, L.-L. Li, I.-M. Hsing, *Langmuir*, **2003**, *19*, 4338.

²⁰⁵ C.-Y. Tsai, A.-L. Shiau, P.-C. Cheng, D.-B. Sheih, D.-H. Chen, C.-H. Chou, C.-S. Yeh, C.-L. Wu, *NanoLett.*, **2004**, *4*, 1209.

²⁰⁶ M. Thomas, A.M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 9138.

²⁰⁷ A.G. Tkachenko, H. Xie, Y. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W.R. Glomm, M.K. Shipton, S. Franzen, D.L. Feldheim, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 482.

²⁰⁸ L.R. Hirsch, J.B. Jackson, A. Lee, N.J. Halas, J.L. West, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 2377.

²⁰⁹ E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, *Small*, **2005**, *1*, 325.

²¹⁰ C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, R. Drezek, *NanoLett.*, **2005**, *5*, 709.

²¹¹ X. Huang, I.H. El-Sayed, W. Qian, M.A. El-Sayed, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2115.

²¹² F.E. Hernández, S. Yu, M. Garcia, A.D. Campiglia, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 9499.

²¹³ K.G. Thomas, P.V. Kamat, *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 888.

²¹⁴ S.M. Chabane Sari, P.J. Debouttière, R. Lamartine, F. Vocanson, C. Dujardin, G. Ledoux, S. Roux, O. Tillement, P. Perriat, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 402.

²¹⁵ S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gilet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, *Langmuir*, **2005**, *21*, 2526.

La solution la plus simple pour le greffage d'un complexant du gadolinium à la surface d'une nanoparticule d'or passe donc par l'élaboration d'un dérivé thiolé de ce complexant, qui possèdera de ce fait une affinité forte pour l'or. Il est à noter que d'autres alternatives sont envisageables mais semblent bien moins séduisantes. Tout d'abord, le greffage du complexant peut aussi se faire par conjugaison sur un surfactant possédant à son extrémité un groupement réactif susceptible de permettre une réaction du type substitution (typiquement un groupement hydroxyl ou amine). Cette possibilité ne simplifie en aucun cas la démarche de greffage, car la réaction de conjugaison n'en nécessite pas moins un dérivé du chélatant porteur d'une fonction réactive (NHS, etc.), ce qui est pour l'heure indisponible commercialement et nécessite donc de fait une synthèse préalable. On peut ajouter à cela une difficulté supplémentaire à réaliser la réaction au voisinage de la particule et surtout en solution colloïdale qui bien souvent limite le choix du solvant (eau, méthanol en grande majorité). L'autre alternative, tout aussi compliquée, consisterait à l'élaboration d'une structure core-shell composée d'un cœur d'or et d'une coquille de silice. Les structures de ce type présentent des protocoles de synthèse complexes et qui nécessitent des paramètres parfaitement maîtrisés afin d'obtenir de manière reproductible des particules homogènes en taille.

La liste des agents de contraste présentée en annexe XII rassemble la majorité des complexes du gadolinium et autres agents de contraste développés ainsi que leurs caractéristiques physiques de relaxation et leur champ d'application. Parmi les agents de contraste actuellement disponibles commercialement, le DTPA a retenu notre attention pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, il s'agit d'un produit largement répandu et qui par conséquent possède une bibliographie importante permettant d'élaborer un protocole de synthèse du dérivé thiolé. Sa « chimie » est, qui plus est, relativement simple d'application. L'élaboration de dérivés du DTPA passe essentiellement par une réaction à partir du bis-anhydride DTPA (DTPABA). La réactivité des groupements anhydride permet l'addition d'une grande variété de substituants. Son coût est faible, ce qui permet une utilisation et une production qui ne seront pas limitées par des problèmes financiers. Enfin, les capacités intrinsèques de relaxation sont bonnes même si elles restent inférieures à celle d'un composé comme le DOTA (ANNEXE XI) qui possède une chimie plus complexe et donc un prix beaucoup plus élevé. Ce critère reste toutefois secondaire dans la mesure où, comme dans le cas des fluorescents, l'amélioration des performances (ici du contraste) est espérée par un effet de nombre, conférant ainsi à nos nanohybrides or/DTPA des propriétés de relaxation bien supérieures à celles de n'importe quel chélatant moléculaire seul. La synthèse de notre dérivé thiolé s'est donc appuyée sur une réaction de couplage sur le DTPABA.²¹⁶ La synthèse est réalisée par une réaction d'addition de 2 aminoéthanethiol sur les fonctions anhydrides du DTPABA en présence de triéthylamine (Figure 55).

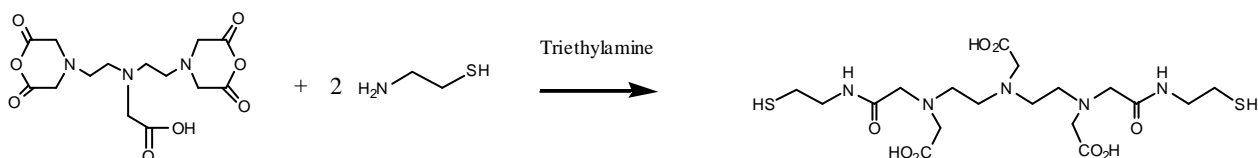


Figure 55 : Synthèse du diamideéthanethioldiéthylènetriaminepentacétate (DTDTPA)

La molécule ainsi obtenue comportera deux extrémités thiolées qui seront donc susceptibles d'améliorer l'accrochage sur les particules d'or par rapport à une molécule porteuse d'une seule fonction thiol.

²¹⁶ E. Tóth, I. van Uffelen, L. Helm, A.E. Merbach, D. Ladd, K. Briley-Saebø, K.K. Kellar, *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, S125.

C. Synthèse de nanohybrides d'or

Une fois le dérivé DTPA thiolé (DTDTPA) synthétisé, de nombreuses possibilités de synthèses de nanoparticules d'or s'offraient à nous ; la bibliographie regorge de méthodes différentes. Cependant, la maîtrise du procédé de synthèse étant essentiel pour l'élaboration de nanoparticules, il convient donc d'utiliser des synthèses déjà familières à l'opérateur. Les synthèses de Brust (voie NaBH_4) et de Frens (voie citrate) étant les procédés communément utilisés au laboratoire, le choix était restreint mais suffisant. En effet, ces deux voies représentent les deux différentes façons de réaliser des nanoparticules, c'est-à-dire la voie directe et indirecte. La synthèse utilisant le citrate comme réducteur permet d'obtenir des particules dites nues qu'il faudra stabiliser dans un deuxième temps par des composés thiolés puis fonctionnaliser, c'est la voie indirecte. L'avantage de cette méthode est de pouvoir moduler la quantité de complexant que l'on veut greffer en surface mais le problème réside dans la quantification des composés greffés effectivement en surface. En effet, les solutions de nanoparticules or/citrate sont fortement diluées et non redispersables après séchage ce qui pose un problème majeur pour leur caractérisation et leur utilisation (manipulation). La synthèse par réduction à l'aide de NaBH_4 se fait quant à elle en présence d'un excès de surfactant thiolé se greffant directement sur la nanoparticule (voie directe) (Figure 56). Le DTDTPA synthétisé comportant des fonctions carboxylates, la solubilité et donc la stabilité colloïdale en solution aqueuse et alcoolique semblaient assurées. La taille des nanoparticules obtenues est fortement liée à la nature de ce surfactant et on ignore la quantité de surfactant greffé mais grâce à la redispersibilité de ces nanoparticules, cette quantité peut être déduite plus facilement par différentes analyses notamment sur poudre.

La synthèse a donc été réalisée en se basant sur une synthèse de Brust utilisant comme surfactant l'acide dihydrolipoïque (DHLA)²¹⁵ qui possède, comme le DTDTPA, deux fonctions thiols et une fonction carboxylate.

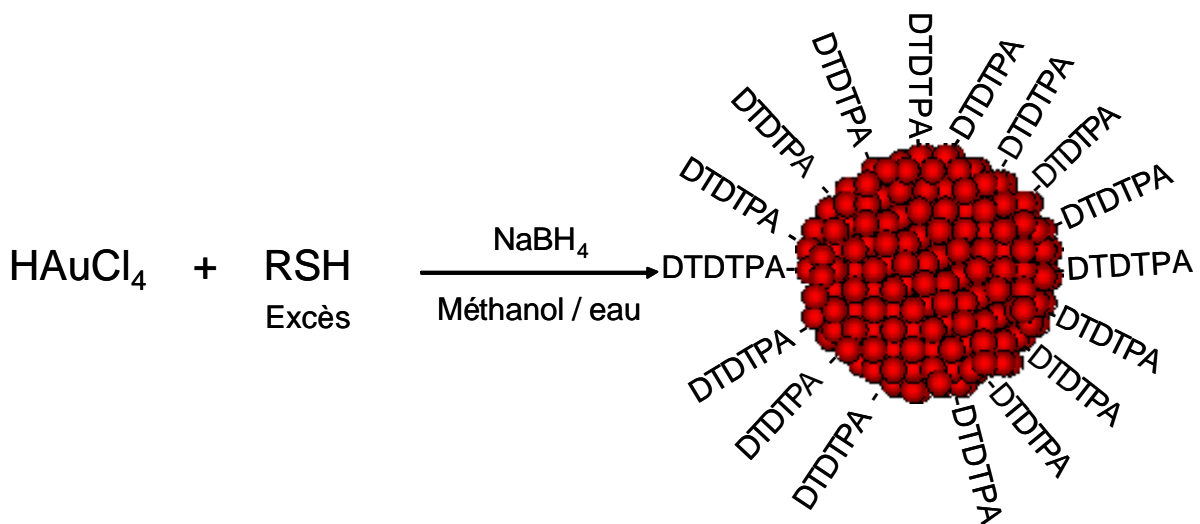


Figure 56 : Synthèse par voie NaBH_4 de nanoparticules Au@DTDTPA

D. Complexation du gadolinium

Les dérivés du DTPA possèdent une forte affinité pour le gadolinium qui s'exprime par des constantes d'affinité K de l'ordre de 10^{22} qui garantissent donc une infime dissociation des complexes durant leur séjour dans le corps humain. De ce fait, on peut supposer que notre produit original, le DTDTPA dont nous ne connaissons pas la constante d'affinité pour le gadolinium conservera une affinité nécessaire proche de celle du DTPA pour son application *in vivo*.

Si on se réfère à la constante d'affinité, la réaction de complexation du Gd^{3+} s'effectue très facilement. On peut donc envisager deux stratégies de complexation. Soit une complexation sur le DTDTPA puis un greffage sur la particule d'or ; soit une complexation directement sur les DTDTPA greffés sur l'or. Cette deuxième option a été retenue. La solubilité des nanoparticules et des ions Gd^{3+} en solution aqueuse ainsi que la forte réactivité de complexation étant acquise, rien ne semblait pouvoir perturber la complexation en solution colloïdale. Cette stratégie a été préférée afin de limiter les paramètres pouvant perturber l'élaboration des nanoparticules. En effet, l'apport d'ions métalliques Gd^{3+} complexés par les fonctions carboxylates du DTDTPA peut réduire la solubilité dans la solution alcoolique (méthanol) durant la phase de synthèse des nanoparticules et ainsi augmenter la difficulté des complexes à assurer leur rôle dans le contrôle de la taille et la stabilisation de colloïdes. D'autre part, on peut s'interroger sur l'influence d'ions métalliques Gd^{3+} sur les ions Au^{3+} présents en solutions, et penser à une éventuelle intégration au cœur des nanoparticules. La complexation du gadolinium a donc été réalisée sur une solution colloïdale aqueuse par addition directe d'ions Gd^{3+} sous forme de $GdCl_3$.

Dosage des DTDTPA en surface par colorimétrie

La quantité de DTDTPA greffés en surface des nanoparticules et donc présents dans chaque échantillon étant inconnue avant toute étude physique sur les poudres (ATG), il était nécessaire de réaliser un dosage de cette quantité afin d'ajuster les ajouts en Gd^{3+} . Nous avons donc pour cela élaborer une méthode de dosage des ligands DTDTPA par dosage de la complexation des ions Gd^{3+} .

Le dosage de la quantité de DTDTPA présents autour des nanoparticules d'or est donc réalisé par colorimétrie à l'aide du xylénol orange (XO) (Figure 57). En effet, ce composé est un complexant faible des lanthanides, des terres rares et de nombreux métaux ce qui permet grâce à un changement de couleur entre la molécule seule et la molécule complexant le métal de repérer la présence de ces derniers en solution.^{217,218,219} De nombreuses méthodes de dosage de métaux ont été développées sur ce principe en additionnant aux solutions des complexants forts sous forme de polyaminocarboxylates (EDTA, DTPA, etc.). Les indicateurs colorés tels que le xylénol trouvent ainsi une application importante dans la mesure des constantes de stabilité d'un métal avec un autre ligand en solution. Quand deux ligands, qui peuvent former des complexes avec le même ion métallique sont introduits dans une même solution, la capacité de complexation de chaque ligand est alors déterminée par leurs concentrations et les constantes de stabilité métal-ligand respectives. Si la constante de

²¹⁷ M. A. El-Hamied Hafez, A.M.A. Abdallah, N. El-Sayed Abd El-Gany, *Analyst*, **1990**, 115, 221.

²¹⁸ L. Harju, A. Ringbom, *Anal. Chim. Acta*, **1970**, 49, 221.

²¹⁹ B.J. Colston, V. Robinson, *Analyst*, **1997**, 122, 1451.

stabilité d'un ligand et les concentrations de toutes les espèces associées sont connues, on pourra alors déterminer la constante de stabilité de l'autre ligand.

Dans notre cas, la problématique est inversée et il nous faut déterminer non pas la quantité de Gd^{3+} mais la quantité de complexant fort en solution. On repèrera pour cela la présence de Gd^{3+} libre donc non complexé par des DTDTPA saturés. Le xylénol ajouté dans une solution de complexant fort du gadolinium, comme le DTPA et ses dérivés, complexera le gadolinium laissé libre et changera alors de couleur, passant du jaune au rose. Par un ajout progressif de Gd^{3+} sous forme d'une solution de $GdCl_3$, on peut donc repérer le volume de saturation du DTDTPA et ainsi évaluer sa quantité autour des nanoparticules.

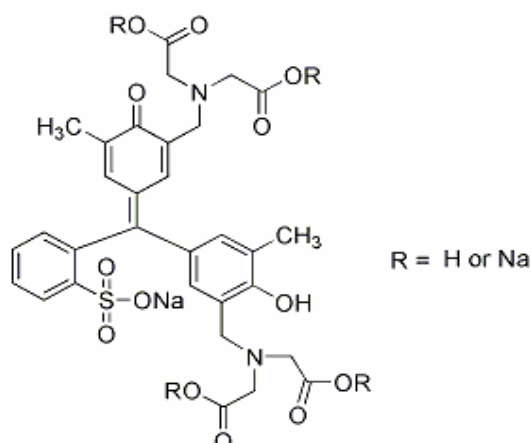


Figure 57 : formule semi-développée du xylénol orange

L'absorbance du xylénol pur varie en fonction du pH et présente une zone de virage centrée autour de pH 7. Cette zone de virage (changement de couleur) correspond au pH pour lequel il y a autant de xylénol sous la forme protonnée H_3XO^{3-} que déprotonnée H_2XO^{4-} . D'après les différents pKa recueillis dans la littérature (Tableau 5), la forme H_3XO^{3-} est présente dans une gamme de pH approximative de 3 à 7. La complexation du Gd^{3+} ne sera donc possible que sur cette gamme. B.J. Colston *et al.*²¹⁹ préconisent cependant un dosage à pH 4,6 afin de s'affranchir des absorptions des xylénols résiduels sous forme H_2XO^{4-} .

			Ref.220	Ref.221	Ref.222
$H^+ + XO^{6-}$	\longrightarrow	HXO^{5-}	12,28	12,23	12,00
$H^+ + HXO^{5-}$	\longrightarrow	H_2XO^{4-}	10,48	10,35	10,30
$H^+ + H_2XO^{4-}$	\longrightarrow	H_3XO^{3-}	6,22	6,70	7,50
$H^+ + H_3XO^{3-}$	\longrightarrow	H_4XO^{2-}	3,23	2,85	4,49
$H^+ + H_4XO^{2-}$	\longrightarrow	H_5XO^-	2,58	2,32	2,74
$H^+ + H_5XO^-$	\longrightarrow	H_6XO	1,15	1,40	2,00

Tableau 5 : Valeurs du pKa du xylénol orange dans la littérature^{220, 221, 222}

Une étude en fonction du pH sera donc pratiquée afin de définir précisément les conditions opératoires de notre dosage des DTDTPA sur les nanoparticules. Ces conditions seront ensuite validées sur des solutions connues en DTPA et DTDTPA.

²²⁰ L.G. Anisimova, N.A. Arkhipova, *Sporn. Dagest. Univ.*, **1969**, 6, 42.

²²¹ B.W. Budesinsky, J. Svec, *Anal. Chim. Acta*, **1972**, 61, 465.

²²² V.I. Kornev, L.V. Kardapolova, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1968**, 13, 1546.

E. Complexation de l'euporium

Les dérivés du DTPA étant des chélatants de la plupart des lanthanides, la complexation d'autres lanthanides que le gadolinium peut présenter des avantages et des nouvelles applications intéressantes. Si il est avéré que le gadolinium est le composé paramagnétique le plus efficace pour l'amélioration du contraste en IRM, ses proches voisins dans le tableau périodique (Eu, Tb, Dy) présentent eux aussi, sous leur degré d'oxydation (+3), des effets paramagnétiques entraînant une diminution du temps de relaxation protonique. A ces propriétés, s'ajoutent des propriétés en luminescence sous la forme complexée. Cependant, l'élaboration de nanoparticules portant conjointement des propriétés paramagnétiques (IRM), de fluorescence sans oublier d'absorption par les nanoparticules métalliques présente des propriétés très intéressantes en vue d'un travail en aval sur le déplacement et la vectorisation de nos agents de contraste. Les cations lanthanides émettant dans le visible et présentant des durées de vie de luminescence suffisamment élevées sont au nombre de quatre, le samarium, l'euporium, le terbium et le dysprosium (III) (Tableau 6). Les chélates d'ions Eu^{3+} et Tb^{3+} présentent les propriétés de fluorescence les plus intéressantes car leurs durées de vie peuvent atteindre et même dépasser la milliseconde en solution aqueuse.

Lanthanide	Maximum d'émission (nm)	Couleur	Durée de vie de luminescence (μs)
Sm^{3+}	645	rouge	30-100
Eu^{3+}	615	orange	100-2000
Tb^{3+}	545	vert	400-5000
Dy^{3+}	573	jaune	1-10

Tableau 6 : Propriétés d'émission de chélates de différents lanthanides en solution aqueuse.²²³

L'utilisation de Tb^{3+} bien qu'étant le lanthanide ayant les durées de vie de luminescence les plus importantes sous forme chélatée n'est pas envisageable dans le cadre de nanohybrides fluorescents de l'or. En effet, sa raie d'émission se trouve dans la zone d'absorption du plasmon de l'or, ce qui annihilerait la fluorescence par réabsorption directe. L'ion Eu^{3+} est donc de par son émission à 615 nm un bon candidat pour l'élaboration de nanohybrides fluorescents.

L'excitation directe des cations Ln^{3+} nécessite l'emploi de sources très intenses comme les lasers. Les états excités d'un lanthanide (III) peuvent cependant être peuplés de manière indirecte, à l'aide d'un chromophore jouant le rôle d'antenne collectrice de photons ; cet effet sera communément nommé effet d'antenne.²²⁴ Le transfert d'énergie des états excités triplets du chromophore vers les états excités du lanthanide a été largement discuté dans la littérature²²⁵ et des mécanismes ont été proposés par Förster²²⁶ et Dexter.²²⁷

La plupart des chélates de lanthanides présentent de faibles rendements quantiques de luminescence en solution aqueuse à cause de désactivations non radiatives liées à la présence de molécules d'eau coordonnées²²⁸ ou à la proximité d'oscillateurs C-H présents sur le ligand

²²³ E.F. Gudgin Dickson, A. Pollak, E.P. Diamandis, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.*, **1995**, 27, 3.

²²⁴ N. Sabbatini, M. Guardigli, J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.*, **1993**, 123, 201.

²²⁵ N. Sabbatini, M.T. Indelli, M.T. Gandolfi, V. Balzani, *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 3585.

²²⁶ Th. Förster, *Comparative Effects of Radiation*, **1960**, Eds. John Wiley & Sons, New-York

²²⁷ D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.*, **1953**, 21, 836.

²²⁸ a) W. De W. Horrocks Jr., D.R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 334.

(Tableau 7). Dans des conditions particulières, certains complexes de lanthanides ont tendance à se dissocier en raison d'une faible stabilité, ce qui constitue un de leurs inconvénients majeurs. Toutefois, ces limitations peuvent être compensées dans la majorité des applications par une conception judicieuse du ligand. De plus leurs durées de vie exceptionnellement longues permettent l'utilisation d'une fenêtre temporelle également utile à la détection spécifique du signal, et conduisent à des applications en temps résolu.

Propriétés	Fluorophores organiques	Chélates de lanthanides
Domaine d'absorption	UV à IR proche	UV
Domaine d'émission	UV à IR proche	visible à proche IR
Bande d'absorption	larges	larges
Bande d'émission	larges	finies
Déplacement de Stokes	faible (<3000 cm ⁻¹)	élevé (>10000 cm ⁻¹)
Rendement quantique	jusqu'à 100%	faible surtout dans l'eau
Durée de vie	1-100 ns	10 µs à 10 ms

Tableau 7 : comparatif entre les propriétés de luminescence de fluorophores organiques et de chélates de lanthanide ²²³

Les chélates de lanthanides sont donc utilisés pour la détection en temps résolu et constituent un outil très puissant pour la détection spécifique, même dans des fluides biologiques complexes. Certaines techniques utilisant des chélates de lanthanides spécifiques permettent ainsi d'atteindre des limites de l'ordre de 10⁻¹¹ voir 10⁻¹⁴ mol.L⁻¹.

Une étude a donc été menée sur la complexation de l'euporium par le DTDTPA et sur les caractéristiques de ce complexe en fluorescence.

II. Mode opératoire

A. Synthèse d'un complexant thiolé

Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 2 g (5,6.10⁻³ mol) de DTPABA dans 40 mL de diméthylformamide (DMF) et chauffer à 70 °C. Dans un autre flacon, dissoudre 1,4 g (1,23.10⁻³ mol) d'ainoéthanthiol dans 30 mL de DMF puis ajouter 1,74 mL de triéthylamine. Cette solution est ajoutée dans le ballon et agitée magnétiquement durant une nuit. La solution est alors refroidie à température ambiante à l'air libre puis plongée dans un bain de glace. On observe alors la précipitation d'une poudre blanche (NEt₃.HCl) qui est filtrée sur fritté de porosité n°4. Le filtrat est récupéré et réduit à quelques millilitres à l'évaporateur rotatif. Cette solution est alors ajoutée goutte à goutte à une solution de 100 mL de chloroforme agitée magnétiquement. Un précipité blanc apparaît alors. Ce précipité est filtré sur fritté et lavé avec 50 mL de chloroforme puis immédiatement séché sous vide sur rampe pendant 4 heures afin d'éliminer le DMF et autres solvants résiduels. Une poudre blanche est récupérée avec des rendements supérieurs à 90%. Ce produit doit être maintenu au congélateur afin de lui garantir une plus longue conservation.

RMN¹H (D₂O, 300 MHz, 298K) d: 3,81 (s, 2H); 3,69 (s, 2H); 3,64 (s, 2H); 3,35 (t, 2H); 3,22-3,29 (m, 4H); 2,59 (t, 2H)

b) W. De W. Horrocks Jr., D.R. Sudnick, *Acc. Chem. Res.*, **1981**, 14, 384.

RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz, 298K) d: 172,5 (-COOH), 171,2 (-COOH), 168,9(-CONR), 57,2 (N-CH₂-COOH), 56,9 (C₂H₂OOH-N-CH₂-CH₂-N), 54,8 (N-CH₂-CONR), 52,2 (HOCO-CH₂-N-CH₂-CH₂-N), 51,5 (N-CH₂-COOH), 42,6 (N-CH₂-CH₂-SH), 23,7 (N-CH₂-CH₂-SH).

Masse I.E. m/z (intensité relative, attribution) (M=511g.Mol⁻¹): 512 (100, [M+H⁺]), 534,2 (50, [M+Na⁺]).

B. Synthèse de nanohybrides d'or

De nombreuses manipulations résumées en annexe XI ont permis d'aboutir à la mise en place d'un mode opératoire décrit ci-après. Dans un ballon de 500 mL, introduire 200 mg ($5,1 \cdot 10^{-4}$ mol) d' HAuCl_4 et les dissoudre dans 120 mL de méthanol, la solution a alors une coloration jaune.

Dissoudre indépendamment 482 mg ($9,4 \cdot 10^{-4}$ mol) de DTDTA dans 40 mL de méthanol plus 2 mL d'acide acétique afin de conserver les fonctions carboxylates sous leur forme hydrogénée. Après dissolution complète, ce mélange est ajouté à la solution d'or. Une coloration rousse puis une décoloration en une solution jaune très pâle apparaissent. Cette coloration disparaît dans les 5 minutes et on obtient une solution incolore et limpide.

Dissoudre alors 192 mg ($5,1 \cdot 10^{-3}$ mol) de NaBH_4 dans 14 mL d'eau distillée ; on observe un fort dégagement gazeux de dihydrogène (H_2). Cette solution est ensuite ajoutée dans le ballon ; une coloration immédiate de la solution en un brun très foncé est observée indiquant la formation des nanoparticules d'or.

Ce mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 1 heure puis filtré sur membrane osmonics de porosité 0,22 μm . La poudre est alors lavée avec 100 mL d'une solution d' HCl 10^{-3} N puis 100 mL d'eau distillée et enfin elle est séchée avec 100 mL d'éther éthylique. Une fois séché sur rampe, on récupère 170 mg d'une poudre brune très foncée. Le calcul du rendement de la réaction est impossible à ce stade car il faut tenir compte de la taille des particules et du rapport Au/DTDTA.

C. Complexation des lanthanides

1. Complexation du gadolinium

La complexation de l'ion Gd^{3+} est obtenue par simple ajout de GdCl_3 sur une solution colloïdale de nanoparticules Au@DTDTA agitée magnétiquement à température ambiante. La quantité de Gd^{3+} est ajustée à la stœchiométrie par dosage colorimétrique avec le xylénol orange. Le rapport massique Au@DTDTA/ Gd^{3+} peut légèrement varier en fonction des synthèses de nanoparticules mais pour une solution typique de 60 mg de Au@DTDTA dans 50 mL de soude 0,1 N acidifiée à pH 3 par ajout d' HCl concentré, on ajoute de l'ordre de $5,5 \cdot 10^{-5}$ moles de GdCl_3 . Ce complexe Au@DTDTA: Gd est récupéré sous forme de poudre après évaporation de l'eau sous pression réduite jusqu'à 10 mL et précipitation par ajout du même volume d'acétone.

2. Mise au point d'une méthode de dosage

Etude des conditions de pH du dosage

Sur une solution de 50 mL de xylénol orange à 10^{-5} M on ajoute dans un premier temps une quantité négligeable de soude molaire afin d'obtenir un pH proche de 12. On abaisse ensuite le pH par ajout de quantités négligeables d' HCl 1N. A différents pH, des échantillons de 2 mL sont prélevés pour analyse en spectroscopie UV-visible puis aussitôt réincorporés à la solution mère.

Validation sur des solutions de concentrations en complexant connues

Notre méthode de dosage a été validée dans un premier temps sur une solution de concentration connue en DTPA, puis sur une solution de DTDTPA. On procède comme suit : la solution aqueuse de complexant de 50 mL est préparée et ajustée à un pH de 4 par ajout d'HCl; parallèlement on prépare une solution de Gd^{3+} par dissolution de 145,2 mg $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ dans 100 mL d'eau. La solution complexante est agitée magnétiquement et son pH est contrôlé en permanence par un pH mètre, la solution de $GdCl_3$ est introduit dans une burette graduée et ajoutée mL par mL à la solution. Des prélèvements de 1 mL sont pratiqués et ajoutés à 1mL d'une solution de xylénol orange à $5,0 \cdot 10^{-5}$ M. Le changement est observé à l'œil nu puis par spectroscopie UV /visible. Sur une solution de 50 mL d'eau, la présence de gadolinium libre est repérée dès la première goutte. Sur une solution complexante contenant 10 mg ($1,95 \cdot 10^{-5}$ mol) de DTDTPA, le virage est obtenu pour un volume situé à ~ 5 mL soit la quantité théorique estimée.

3. Dosage des DTDTPA en surface des nanoparticules

Sur une solution contenant 60 mg de Au@DTDTPA, on procède à des prélèvements de 100 μ L. La concentration de la solution lui confère une couleur marron intense qui ne permettrait pas d'observation visuelle du changement de couleur. Le virage est observé pour un ajout de 14 mL correspondant à la présence de 27,9 mg ($5,45 \cdot 10^{-5}$ mol) de DTDTPA à la surface des particules.

4. Complexation de l'euporium

La complexation de l'euporium est réalisée dans des conditions identiques à celles du gadolinium. Pour une solution de 60 mg de Au@DTDTPA dans 50 mL d'une solution acidifiée à pH 3 par ajout d'HCl concentré, on ajoute 8 mL d'une solution à $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L d' $EuCl_3$ soit $4,0 \cdot 10^{-5}$ moles.

5. Caractérisation

RMN, FT-IR, spectro métrie de masse

Les spectres RMN 1H et ^{13}C sont enregistrés sur un spectromètre Bruker AM 300. Les spectres FT-IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer spectrum one. Les spectres de masse sont obtenus par technique electrospray sur un appareil API 165 PE SCIEX.

Etude par spectroscopie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible sont enregistrés à température ambiante avec un spectrophotomètre Shimadzu UV-2401 PC dans la gamme de longueur d'onde de 200 à 800 nm. Les mesures de la bande d'absorption des nanoparticules d'or sont effectuées sur des solutions colloïdales à 0,2 g.L $^{-1}$ dans des cuves standard en quartz.

Microscopie électronique à transmission (MET haute résolution)

La microscopie MET haute résolution est utilisée pour obtenir des informations structurales et morphologiques sur les échantillons de solutions colloïdales. Les clichés sont réalisés sur un microscope JEOL 2010 à 200 kV. Les échantillons pour le MET haute résolution sont

préparés en déposant une goutte de solution colloïdale diluée d'Au@DTDTPA sur une grille de carbone et en laissant sécher à l'air ambiant.

Diffraction des rayons X (DRX)

Les diagrammes DRX sont enregistrés sur un diffractomètre Siemens D5000 avec les raies Cu-Ka1 et Cu-Ka2 ($\lambda=0,15406$ nm et $\lambda=0,15444$ nm). Ce diagramme est enregistré selon une gamme d'angle 2θ de 10-150° par pas de 0,02° et un temps de comptage de 8s/pas. Ce diagramme est fitté par la procédure de Rietveld en utilisant le programme Fullprof. Les paramètres cristallins ont été affinés en prenant en compte les déviations émanant des déplacements de l'échantillon. Les microcontraintes et la taille du domaine cohérent sont dérivés par un affinement des largeurs à mi-hauteur (en anglais FWHM), β , des diagrammes fittés par des fonctions de Pseudo-Voigt utilisant les relations suivantes : $\beta^2 = U \tan^2 \theta + IG / \cos^2 \theta$. Dans cette équation, U est une estimation de l'élargissement isotropique dû à la présence de microcontraintes : $\varepsilon = \pi / 1.8 \sqrt{U}$ (e étant la concentration en défauts en %) et IG est la mesure des effets isotropiques de taille : $T = 180K\lambda / \pi \sqrt{IG}$ (T la taille en Å, λ la longueur d'onde en Å et K la constante de Scherrer égale ici à 4/3).

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'ATG est réalisée sur un appareil SETARAM G12, sur 30-35 mg de poudre sèche et pure, sous un flux d'air (40 mL.min⁻¹) avec une rampe de chauffage de 5°C.min⁻¹ sur l'intervalle 25-700°C.

Imagerie IRM et mesures en T₁

Les mesures en T₁ et les images IRM sont réalisées à 7T en utilisant une séquence de recouvrement inverse FLASH en variant le temps de recouvrement. L'augmentation du contraste est pondérée en T₁ avec une séquence Spin-Echo standard avec T_R=500 ms et T_E=12 ms.

Mesure du potentiel zéta

La détermination directe du potentiel zéta de solutions colloïdales de nanoparticules Au@DTDTPA est réalisée par spectroscopie de corrélation de photons sur un appareil Zetasizer 3000 HS (laser He-Ne (633 nm)-Malvern Instrument). Avant mesures, les solutions colloïdales sont diluées de façon à obtenir des concentrations de 0,08 g.L⁻¹ en solution aqueuse à 0,01 M en NaCl et ajustées au pH désiré.

Mesure en fluorescence

Les études de fluorescence sont pratiquées sur un spectrofluorimètre de type JASCO FP 6500. Les études sont pratiquées sur des solutions colloïdales Au@DTDTPA:Eu de concentration comprise entre 0,012 et 0,12 g/L.

III. Résultats et discussion

A. Synthèse d'un nouveau dérivé thiolé du DTPA

La synthèse originale précédemment exposée, permet l'accès à un nouveau dérivé dithiolé du DTPA (DTDTPA) qui de par ses propriétés pourra s'immobiliser à la surface des nanoparticules tout en les stabilisant, et complexer le gadolinium en vue d'application en IRM.

Ce composé est obtenu dans des conditions de rendement très satisfaisantes de l'ordre de 90%. Ce composé se présente sous forme de poudre soluble dans l'eau et les alcools (méthanol, éthanol). Le DTDTPA est caractérisé par RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR-TF et spectrométrie de masse. La RMN ^1H effectuée dans le D_2O nous indique l'absence de réactif résiduel ou de coproduit de réaction (Figure 58). On remarque cependant à 2,5 et 2,0 ppm la présence de pics correspondant au DMF résiduel qui n'a pas été éliminé en totalité lors des étapes de purifications et de séchage sur rampe de par sa viscosité et son haut point d'ébullition. Sa présence pourrait se révéler inopportune dans le cadre d'applications biologiques, ce qui in fine est le but des nanoparticules pour lequel il est synthétisé. Les extrémités soufrées étant susceptibles de réagir pour former des ponts disulfure, nous limitons les étapes de purification au minimum pour éviter la formation de polymères. Le DMF résiduel ne pose pas de problème pour la synthèse des nanoparticules et est donc éliminé a posteriori pendant les étapes de lavages aqueux où il est alors entraîné. La RMN ^{13}C (Figure 59) confirme la structure de la molécule. La spectroscopie IR présente quant à elle le pic caractéristique de la liaison S-H autour de 2530 cm^{-1} confirmant le couplage de l'aminoethanethiol (Figure 60). Enfin, la spectrométrie de masse présente uniquement le pic moléculaire à 511 g.mol^{-1} et son sel de sodium à $533,2\text{ g.mol}^{-1}$ (Figure 61). Le produit obtenu est donc pur mais il convient de conserver le produit au congélateur afin d'éviter la réaction de polymérisation due à la formation de ponts disulfures. On observe en cas de polymérisation la formation d'une pâte extrêmement collante.

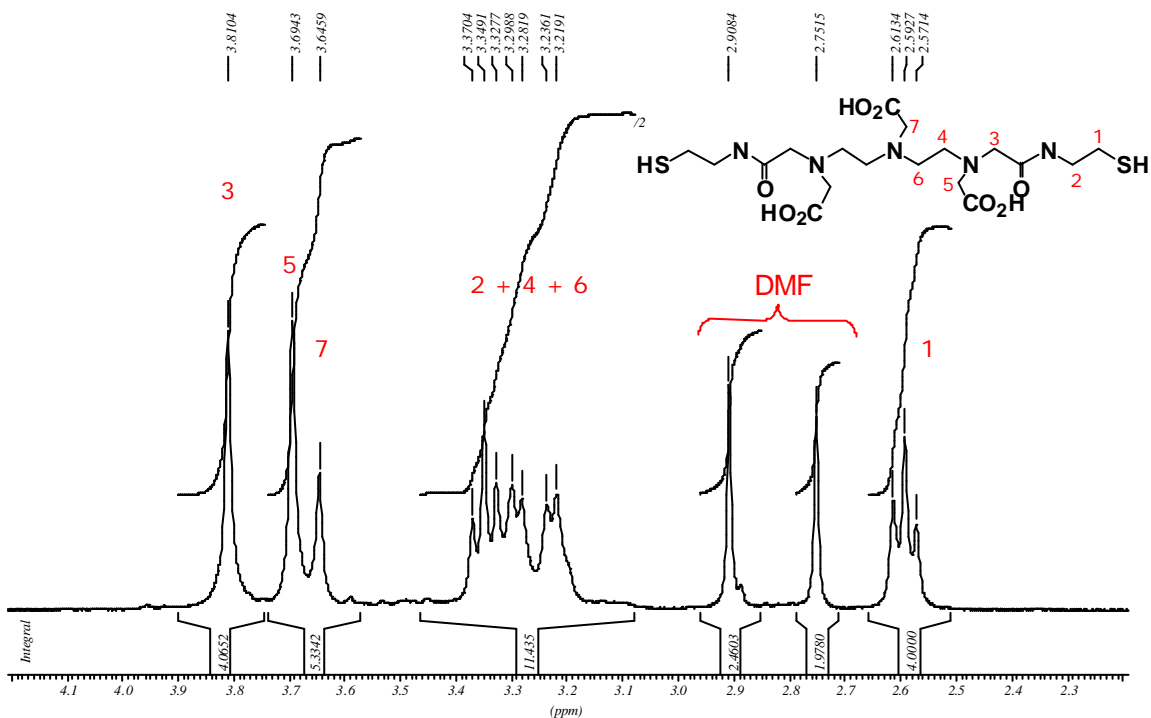


Figure 58 : spectre RMN ^1H sur DTDTPA dans D_2O

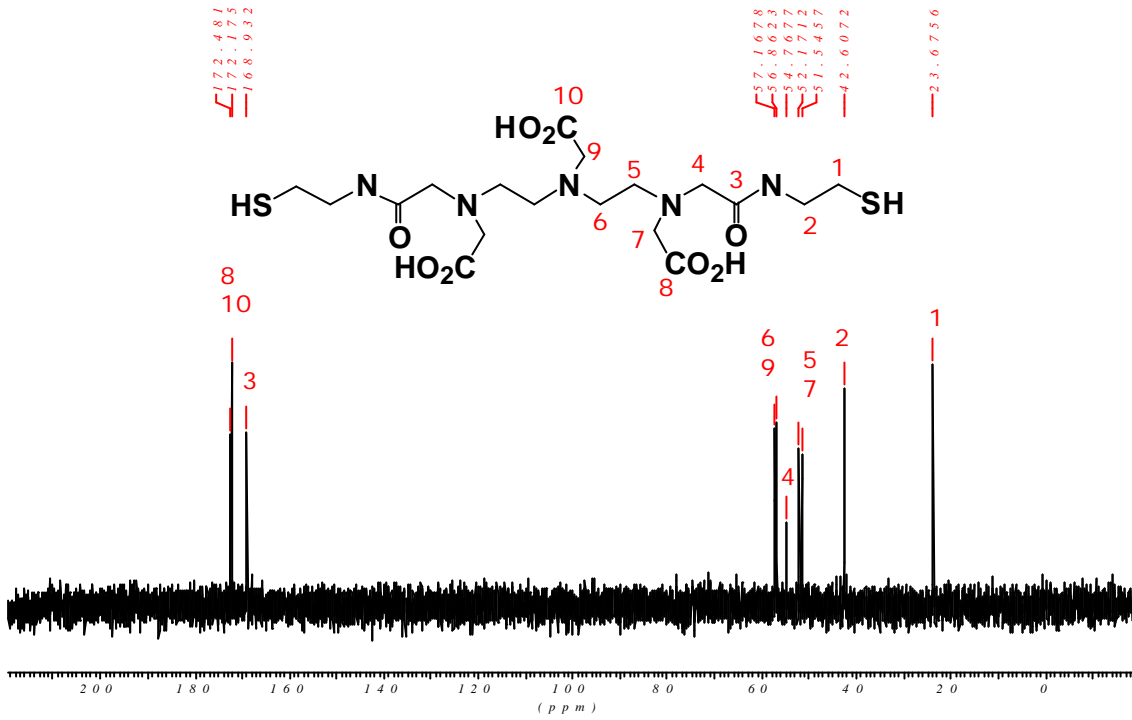


Figure 59 : spectre RMN ^{13}C sur DTDTPA dans D_2O

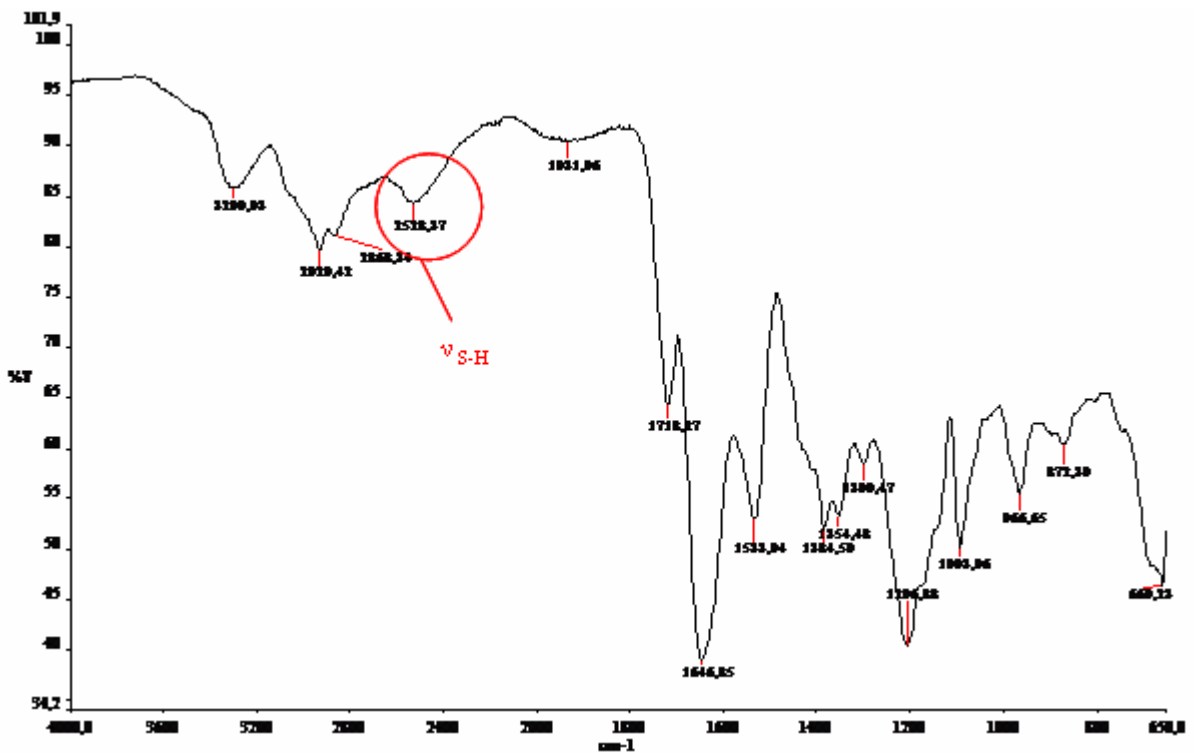


Figure 60 : spectre IR-TF du DTDTPA

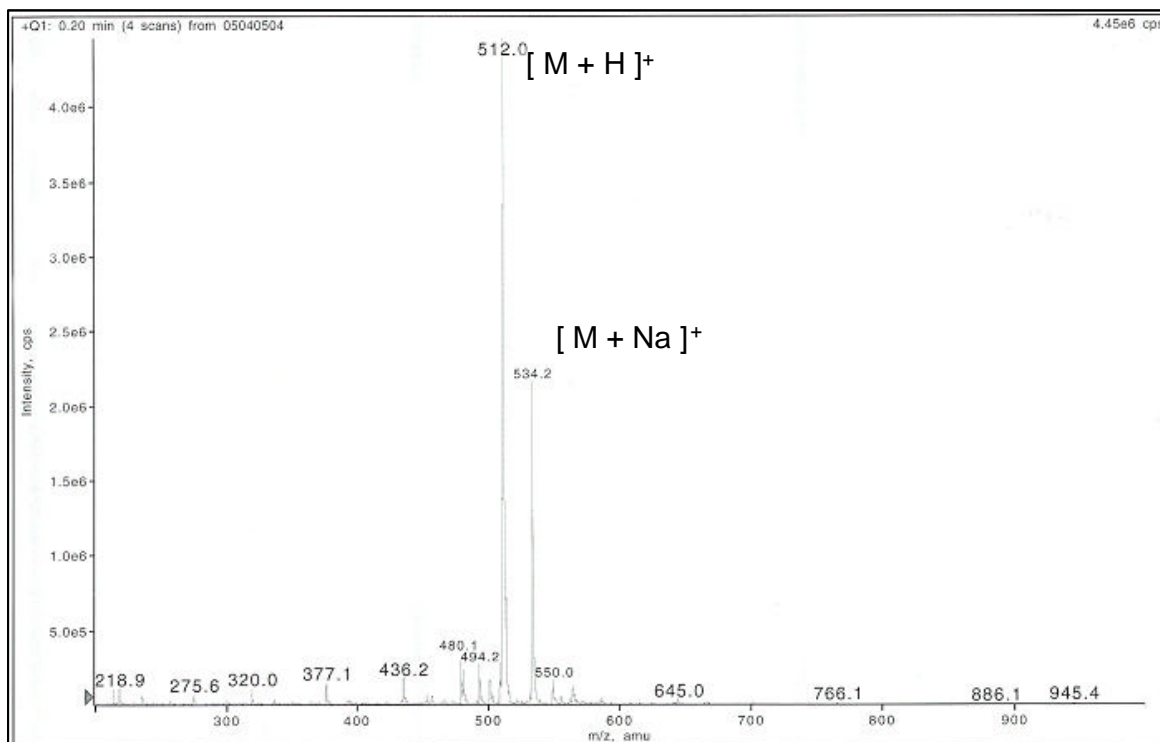


Figure 61 : Spectre de masse (I.E) sur DTDTPA

B. Préparation de nanoparticules hybrides fonctionnalisées stables

Des nanoparticules d'or fonctionnalisées par le DTDTPA sont synthétisées par réduction de sel d'or ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) par NaBH_4 dans un mélange méthanol/eau en présence de DTDTPA. Après agitation, les nanoparticules d'or ainsi obtenues sont isolées sous forme d'une poudre noire après une série de lavages (eau, $\text{HCl } 10^{-2} \text{ N}$, éther) afin d'éliminer NaBH_4 et l'excès de DTDTPA. Cette poudre noire est facilement redispersible comme le sont la plupart des poudres obtenues par la méthode de Brust. On peut ainsi redisperser cette poudre en solution basique en quelques minutes (20 mg dans 10 mL de $\text{NaOH } 0,1\text{N}$). Quel que soit le pH, le spectre UV-visible des solutions colloïdales présente une bande d'absorption correspondant au plasmon de surface des colloïdes d'or qui est centré autour de 520 nm (Figure 62). Cette bande d'absorption, due à une oscillation collective des électrons de la bande de conduction, est caractéristique des nanoparticules d'or d'une taille supérieure à 2 nm. Cependant, la forme du spectre est caractérisée par une très faible bande d'absorption, indiquant ainsi un diamètre moyen de particules légèrement supérieur à 2 nm.^{229,230,231}

²²⁹ S. Chen, K. Kimura, *Langmuir*, **1999**, 15, 1075.

²³⁰ K. Fauth, U. Kreibitz, G. Schmid, *Z. Phys. D*, **1989**, 12, 515.

²³¹ D.G. Duff, A. Baiker, P.P. Edwards, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 96.

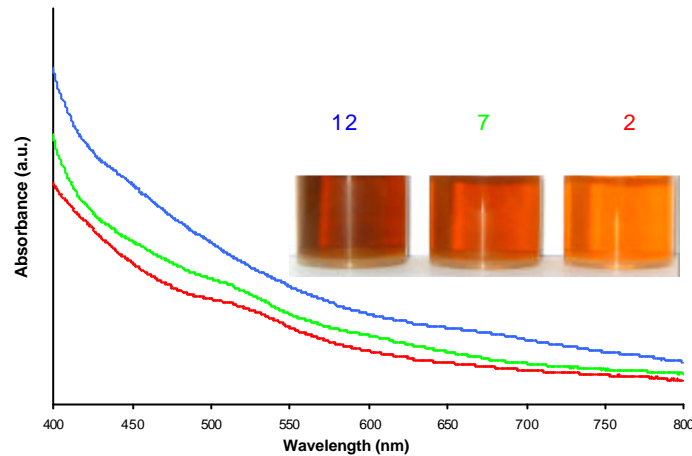


Figure 62 : spectres UV-visible de solutions colloïdales d'Au@DTDTPA aqueuses à pH 2 (rouge), 7 (vert) et 12 (bleu)

Les colloïdes obtenus possèdent donc une grande stabilité sur une large gamme de pH. Entre pH 2 et 12, aucune précipitation n'est observée. On observe seulement un léger changement de couleur de l'orange clair à l'orange foncé (insert Figure 62). Cette observation concorde avec les résultats obtenus en mesurant le potentiel ζ en fonction du pH. Ils révèlent une charge négative de surface entre pH 2 et 12 (Figure 63).

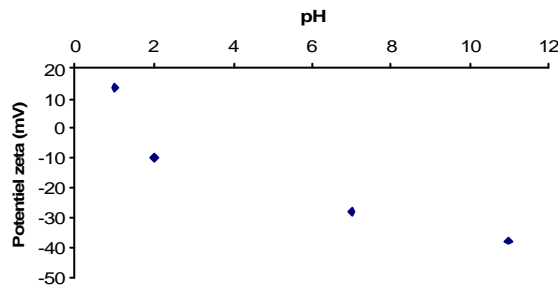


Figure 63 : évolution du potentiel ζ en fonction du pH

La stabilisation des nanoparticules dans cette gamme de pH est assurée par répulsion électrostatique entre les particules chargées. La charge négative observée par mesure du potentiel ζ peut être attribuée à la déprotonation des trois groupements $-\text{COOH}$ (Figure 63).⁷⁰ La microscopie électronique à transmission montre nettement que la taille et la morphologie des nanoparticules d'or ne sont pas affectées par les variations du pH dans la mesure où aucune différence de taille ou d'agglomération n'est observée (Figure 64). Comme l'allure des spectres UV-visible pouvait le laisser présager, la taille moyenne des nanoparticules, déterminée en mesurant une centaine de particules à partir des photos MET, est comprise entre 2-2,5 nm avec une faible distribution en taille ($< 0,5$ nm). De plus, les plans réticulaires sont très nettement observés sur les clichés de MET haute résolution (Figure 64 d et e) reflétant ainsi la structure cristalline des particules. Les mesures de diffraction des rayons X sont fittées par les affinements de Rietveld en prenant en compte l'appartenance de l'or au groupe $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$ (Figure 65). Dans ces conditions, le paramètre de maille des nanoparticules est égal à $4,10 \text{ \AA}$, une valeur très proche de la valeur théorique sur un cristal macroscopique ($4,0786 \text{ \AA}$).²³² La taille du domaine cohérent est évaluée à $2,1 \pm 0,2$ nm et le pourcentage de

²³² 04-0784, 2002 JCPDS

défauts est de l'ordre de $10\pm 5\%$. La cohérence entre la taille des particules obtenues en MET ($2,4\pm 0,5$ nm) et celle obtenue en diffraction X indique que la plupart des particules sont certainement monocristallines. Ces résultats sont en accord avec les observations faites sur les clichés MET haute résolution (Figure 64 d-e).

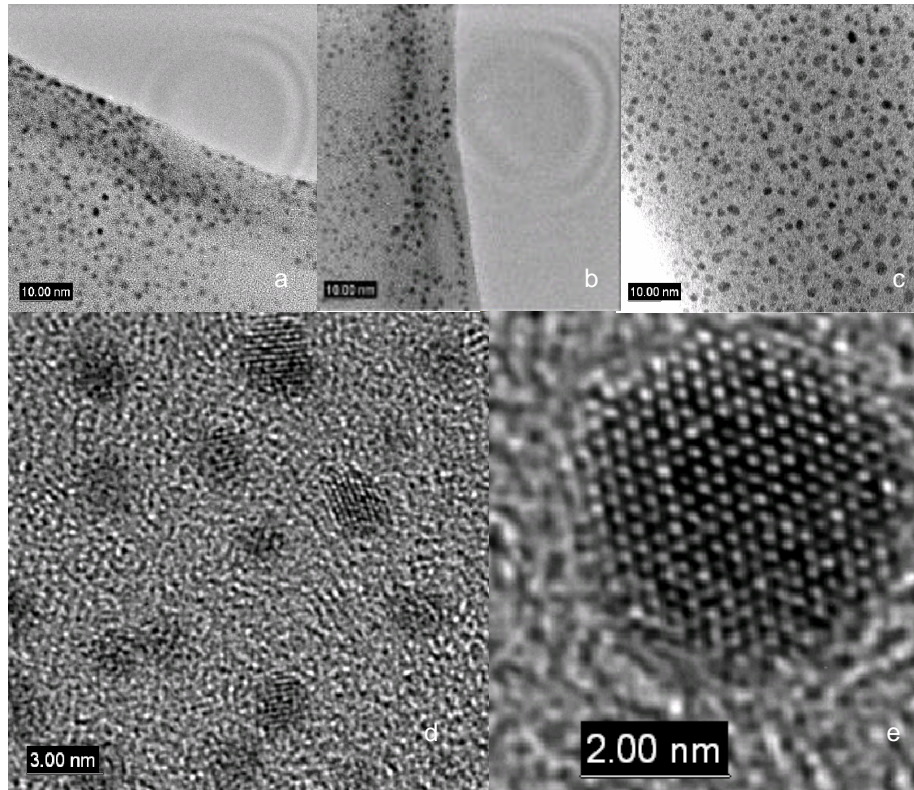


Figure 64 : clichés de microscopie électronique à transmission sur nanoparticules Au@DTDTPA à pH 2 (a), 7 (b), et 12 (c), la taille moyenne observée est de $2,4\pm 0,5$ nm ; (d) et (e) clichés MET haute résolution sur nanoparticules Au@DTDTPA, (e) visualisation d'une particule et de ses plans réticulaires selon la direction [111].

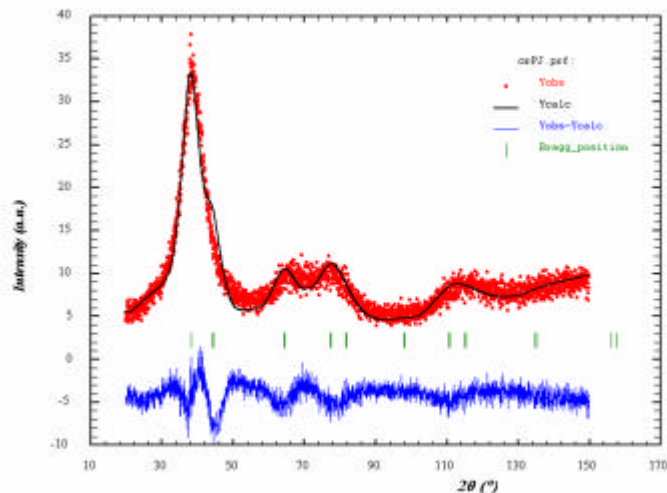


Figure 65 : diagramme de diffraction X sur poudre de nanoparticules Au@DTDTPA. Comparaison du tracé expérimental (en rouge) au tracé obtenu par le procédé de Rietveld (en noir). La différence entre les résultats expérimentaux et le fit est donnée en bleu.

La stabilité dans une large gamme de pH d'une solution colloïdale de nanoparticules d'or et la faible distribution de taille suggèrent la présence de DTDTPA à la surface des nanoparticules. Ce fait semble quasiment acquis de part la forte affinité des molécules thiolés pour l'or mais il convient de caractériser ce greffage de manière quantitative et qualitative.

La présence d'une couche organique à la surface des nanoparticules est confirmée par l'analyse thermogravimétrique qui révèle une perte de masse en deux étapes de l'ordre de 44% entre 210 et 590°C (Figure 66).

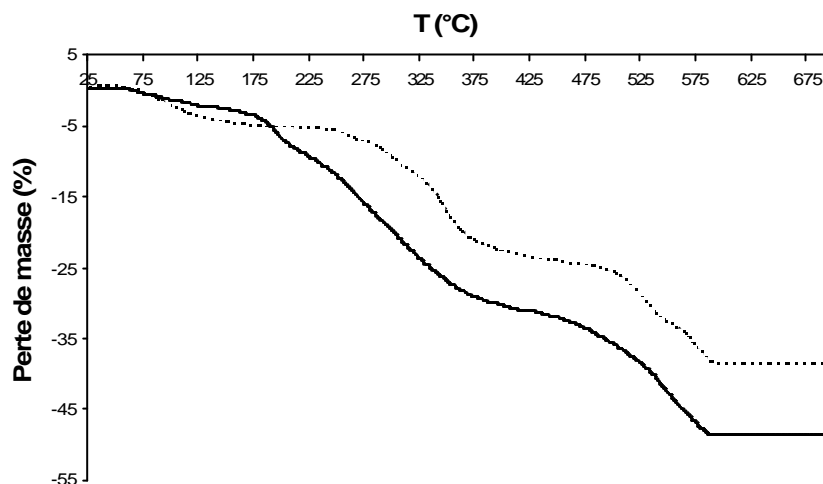


Figure 66 : courbes thermogravimétriques poudres de nanoparticules d'or Au@DTDTPA (trait plein) et Au@DTDTPA:Gd (trait en pointillé)

La première perte de masse entre 75 et 175°C n'est pas prise en compte car elle correspond à la désorption des molécules d'eau. L'évaporation de la partie volatile (organique) se situe à une température supérieure à celle du point d'ébullition du DTDTPA, cette perte de masse est attribuée aux DTDTPA greffés sur l'or dans la mesure où une plus haute température peut relever de l'interaction des molécules de DTDTPA avec l'or. Les 2 phases entre 275-375 et 375-590°C, marquées par des changements de pente, correspondent à l'évaporation de composés organiques sous deux formes différentes non identifiées. Une telle perte de poids correspond à la présence d'à peu près 150 ligands/particule de diamètre 2,4 nm, soit 2 ligands pour 3 atomes d'or de surface qui pour une particule de 2,4 nm, le nombre d'atomes d'or en surface est de l'ordre de 230 (ANNEXE V). Le nombre de DTDTPA par particule est en accord avec les valeurs rapportées par Murray *et al.*,²³³ mais il paraît trop élevé pour envisager une immobilisation de ces ligands dithiolés sur la nanoparticule d'or par les deux atomes de soufre.

Les mesures effectuées en XPS confirment la présence de molécules organiques thiolées à la surface des nanoparticules d'or (Figure 67). En effet, l'analyse des spectres XPS des nanoparticules d'Au@DTDTPA présente les pics caractéristiques des éléments C, N, O et S avec des rapports atomiques proches des valeurs théoriques (par exemple C/S= 8,9 au lieu de 9, Tableau 8).

²³³ M.J. Hostetler, J.E. Wingate, C.-J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J. David Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans, R.W. Murray, *Langmuir*, **1998**, 14, 17.

Rapports atomiques	C/S	N/S	O/S	C/O	C/N	O/N	N/Gd
Au@DTDTPA:Gd	11,2 / 9	2,6 / 2,5	4,6 / 4	2,4 / 2,3	4,3 / 3,6	1,7 / 1,6	5,0 / 5
Au@DTDTPA	8,9 / 9	1,9 / 2,5	2,8 / 4	3,2 / 2,3	4,7 / 3,6	1,5 / 1,6	---
DTDTPA	9,0 / 9	2,4 / 2,5	4,5 / 4	2,0 / 2,3	3,8 / 3,6	1,8 / 1,6	---

Tableau 8 : résumé comparatif des rapports atomiques

Le pic correspondant aux énergies de liaison des orbitales C1s des nanoparticules d'Au@DTDTPA présente un seul pic centré sur 284,8 eV et un épaulement prononcé vers les hautes énergies (Figure 68a, Tableau 9).

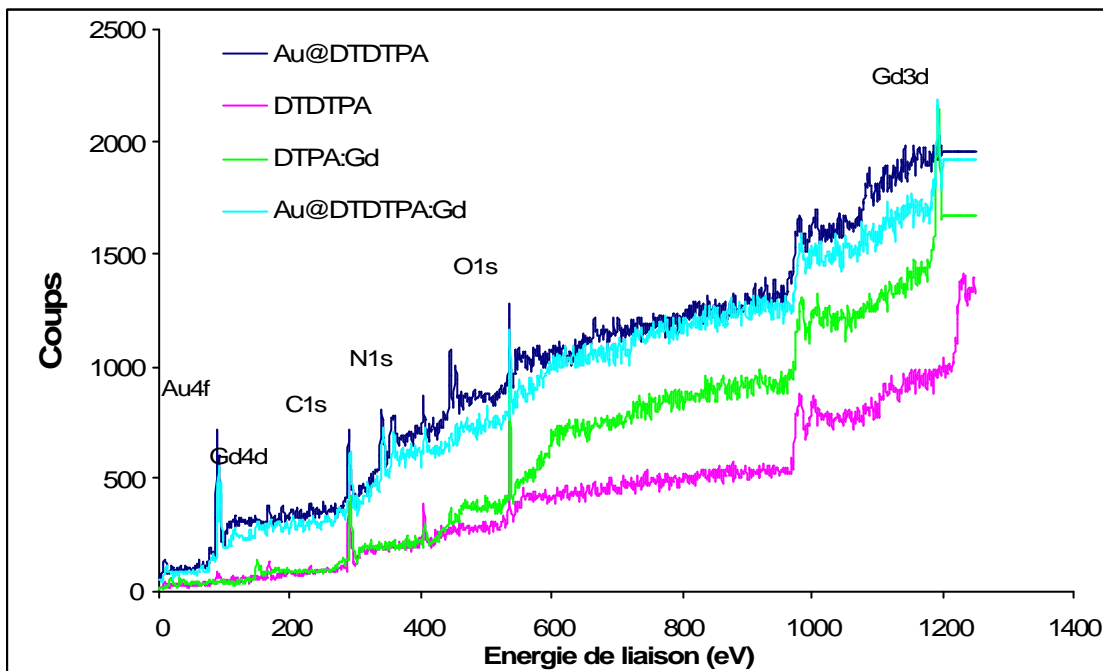


Figure 67 : spectre global d'XPS calibré sur C1s à 284,6 eV

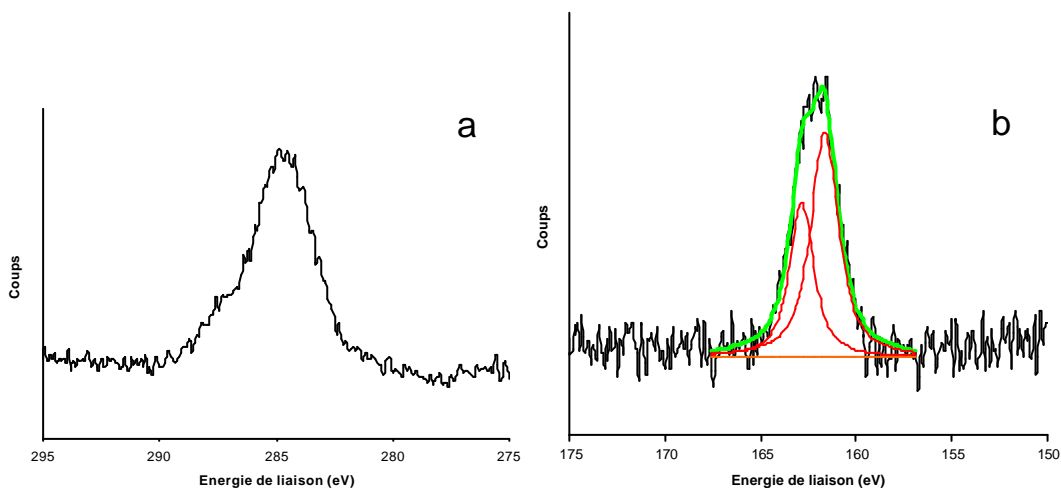


Figure 68 : spectres XPS C 1s (a) et S 2p de nanoparticules Au@DTDTPA

échantillon	C 1s	N 1s	O 1s	S 2p _{1/2,3/2}	Au 4f _{7/2}	Gd 4d	Gd 3d _{5/2}
Au@DTDTPA[Gd]	284,6	389,9	530,5	162,2	83,0	141,7	1186,4
Au@DTDTPA	284,6	389,7	530,4	161,8	82,9		
DTDTPA	284,6	389,5	530,3	162,6			

Tableau 9 : comparatif des énergies de liaison (eV)

Le pic principal est attribué aux groupements méthylène (CH₂) tandis que l'épaule est attribuable aux atomes de carbone impliqués dans une liaison carbonyle C=O dans les groupements –COOH et –CONHR dont la valeur est proche de celle rapportée dans la littérature pour des cas similaires.²³⁴ La forme observée pour C1s (c'est-à-dire la présence d'un épaulement) est un argument supplémentaire pour l'adsorption des molécules de DTDTPA sur les nanoparticules d'or. Cependant, l'interprétation du spectre XPS correspondant aux niveaux d'énergie S2p n'est pas sans ambiguïté (Figure 68b). Comme prévu quand les thiols sont adsorbés sur des surfaces d'or, la position du pic (161,8 eV) est déplacée vers les basses énergies de liaison par rapport au DTDTPA libre (162,6 eV).^{235,236}

²³⁷ La déconvolution du pic dissymétrique S2p, en appliquant le rapport de pics 0,60 et un écart de 1,20 eV en accord avec les travaux précédemment publiés, indique la présence d'un seul type de doublet qui est attribué aux orbitales S2p_{3/2} et S2p_{1/2} respectivement situés à 161,6 eV et 162,8 eV. Le nombre de ligands déterminé par l'ATG éliminant la possibilité d'un greffage par les deux extrémités soufrées, le spectre des nanoparticules Au@DTDTPA au niveau des énergies S2p devrait montrer la présence de deux doublets avec des aires comparables mais à des basses énergies pour les thiols liés à la surface d'or et à de plus hautes énergies pour les thiols non liés. Le déplacement vers les basses énergies pour les échantillons d'Au@DTDTPA et la présence d'un seul type de doublet électronique peut être expliqué par l'implication d'un thiol dans la liaison avec la surface tandis que l'autre thiol est impliqué dans la formation d'une liaison disulfure avec un thiol non lié d'un DTDTPA voisin, car la résolution spectrale du système utilisé ne nous permet pas de distinguer les interactions Au-S des interactions S-S.^{238,236} Le greffage du DTDTPA par une seule de ses deux extrémités thiolées est en accord avec les observations de Vance *et al.*²³⁵ Leurs travaux démontrent que les monomères α,ω-dithiolés s'adsorbent sur l'or préférentiellement par un seul thiol (Figure 69) tandis que la couche obtenue par clivage de la liaison S-S de polymères au voisinage de la surface d'or sont liés par les deux extrémités soufrées adoptant alors une structure en arc de cercle (Figure 70). Ce phénomène s'explique par le fait que les atomes de soufre des disulfures du polymère s'adsorbent sur l'or simultanément tandis que les atomes de soufre du monomère situés à chaque extrémité de la molécule n'ont qu'une très faible probabilité de s'adsorber simultanément sur l'or. Aux concentrations utilisées pour les synthèses de Brust, le monomère est alors en large excès par rapport à la quantité nécessaire pour une monocouche. Il n'y a tout simplement plus d'espace pour accéder à la surface pour le second groupement

²³⁴ G. Beamson, D. Briggs, *High-Resolution XPS of organic Polymers*, **1992**, John Wiley and sons Ltd., Chichester

²³⁵ A.L. Vance, T.M. Willey, A.J. Nelson, T. van Buuren, C. Bostedt, L.J. Terminello, G.A. Fox, *Langmuir*, **2002**, 18, 8123.

²³⁶ D.G. Castner, K. Hinds, D.W. Grainger, *Langmuir*, **1996**, 12, 5083.

²³⁷ R. G. Nuzzo, B. R. Zergarsky, L. H. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 733.

²³⁸ P. Kohli, K. K. Taylor, J. J. Harris, G. J. Blanchard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11962.

thiol. A contrario, l'approche des polymères ne peut s'effectuer que par l'adsorption du pont disulfure sur l'or qui se solde par la coupure réductrice de la liaison S-S. Ce clivage aboutit à l'adsorption du monomère par ses deux atomes de soufre.

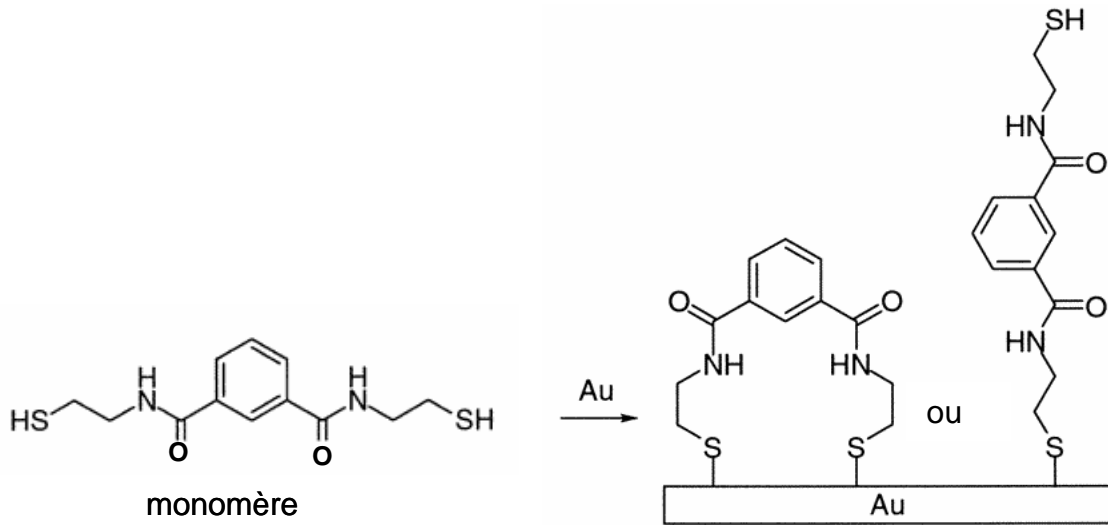


Figure 69 : greffage de monomères α,ω -dithiolés sur une surface d'or²³⁵

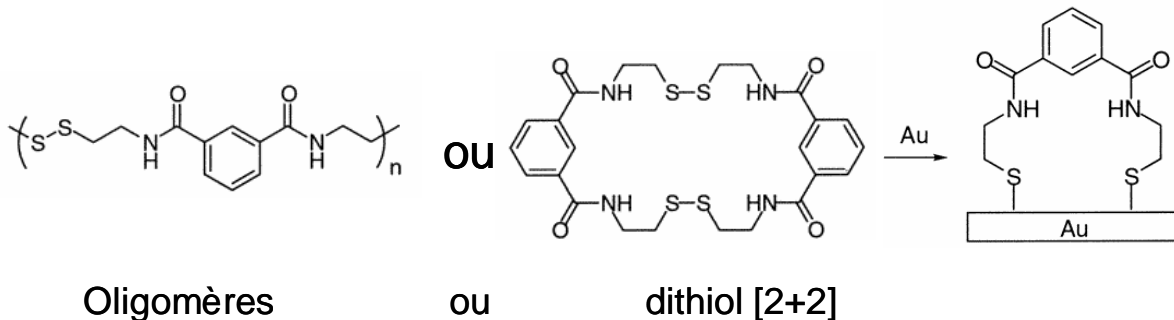


Figure 70 : greffage de polymères (ou d'oligomères de bas poids moléculaires) et molécules macrocycliques porteuses de ponts disulfures sur la surface d'or.²³⁵

Dans notre cas, la formation de ponts disulfures à partir des thiols non liés à l'or génère alors une multicouche réticulée très robuste. Cette réaction de formation des ponts disulfures doit probablement se dérouler après l'élimination par lavage des espèces réductrices (NaBH_4) qui ne favorisent pas la réaction. Dans la mesure où aucune liaison S-H n'est observée en XPS, l'absence de thiol peut donc venir de la formation de ponts disulfures dans la même couche ou entre différentes couches. La faible proportion de thiol qui en résulte ne permet ainsi pas leur observation en XPS. La coquille organique formée autour du noyau d'or est donc composée de plusieurs couches de DTDTPA reliées les unes aux autres (Figure 71), ce qui n'est pas surprenant au regard du nombre de molécules greffées (150 molécules soit 2 molécules pour 3 atomes d'or de surface) qui paraît trop élevé pour l'élaboration d'une monocouche.

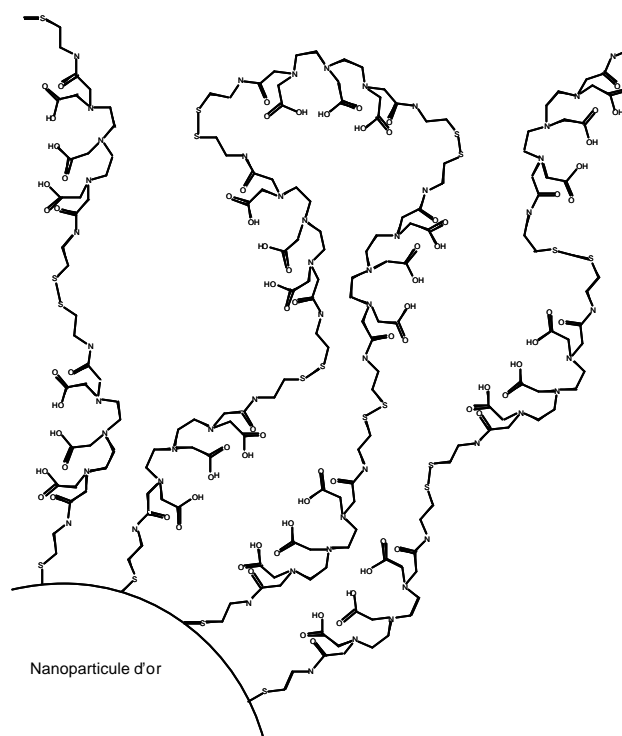


Figure 71 : illustration schématique de la couche de DTDTPA à la surface des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)

Ce greffage sous forme de multicouche réticulée rend les molécules adsorbées/greffées moins sensibles à la désorption. Si on ajoute à cela la présence de nombreux groupements ionisables, un enrobage de ce type augmente donc sensiblement la stabilité colloïdale dans la mesure où la désorption peut mener à la précipitation des particules.^{215,239,240} De plus, la structure multicouche de l'enrobage permet une immobilisation d'une quantité supérieure de molécules de DTDTPA autour du noyau d'or avec une densité de recouvrement de surface inférieure. De ce fait, l'augmentation du contraste devrait être améliorée car la coque organique devrait contenir plus d'ions Gd^{3+} que dans le cas d'une monocouche et offrir une meilleure accessibilité des ions Gd^{3+} complexés aux molécules d'eau, ce qui représente un point clé dans la génération d'images contrastées (augmentation de la relaxivité).

En plus d'assurer le contrôle de la croissance (donc de la taille) des nanoparticules et de la stabilité de la solution colloïdale sur une large gamme de pH (pH 2-12), la présence de DTDTPA sur les nanoparticules d'or permet aussi l'immobilisation d'ions Gd^{3+} par complexation sur les particules. Le DTPA et ses dérivés sont connus pour leur propension à complexer Gd^{3+} . Ainsi le DTPA:Gd (Magnevist®) est d'ailleurs très largement utilisé comme agent de contraste en IRM car Gd^{3+} exerce une influence importante sur le temps de relaxation des protons de l'eau. D'autre part, la très haute valeur de la constante de stabilité du DTPA:Gd limite considérablement le relargage d'ions Gd^{3+} dans le corps et permet donc une utilisation clinique sans aucun risque. Une particule recouverte de nombreux complexes Gd (III) devrait donc permettre l'amélioration du contraste par rapport à un complexe Gd (III) seul.

La complexation du Gd^{3+} est effectuée par ajout de $GdCl_3$ sur une solution colloïdale de nanoparticules Au@DTDTPA. La stœchiométrie de complexation DTDTPA/Gd est 1:1. La proportion de DTDTPA greffés à la surface des nanoparticules est propre à chaque synthèse et

²³⁹ Z. Li, R. Jin, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, *Nucl. Acids Res.*, **2002**, *30*, 1558.

²⁴⁰ B. Garcia, M. Salomé, L. Lemelle, J.-L. Bridot, P. Gillet, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, *Chem. Commun.*, **2005**, 369.

inconnue avant toute étude préalable (ATG, XPS). Une méthode de dosage par colorimétrie a donc été élaborée afin d'évaluer la quantité de DTDTPA par une méthode de routine aisément accessible. Cette méthode est basée sur la complexation des Gd^{3+} libres par un complexant faible, le xylénol orange. Des tests préalables ont donc été nécessaires afin d'obtenir des conditions optimales de dosage. La Figure 72 présente ainsi une étude de l'absorption UV-visible du xylénol à différents pH. Le xylénol est aussi étudié en présence de Gd^{3+} c'est-à-dire sous sa forme complexante. Cette étude nous permet d'évaluer une gamme de pH optimale, pour le dosage colorimétrique de la complexation du Gd^{3+} c'est-à-dire une zone de pH où le xylénol présente un seul pic d'absorption et où le complexe xylénol:Gd présente un second pic d'absorption distinct de celui du xylénol. En milieu basique, le xylénol (non complexant) présente un pic d'absorption dans le rose à 579 nm. Cette absorption se décale dans le jaune (443 nm) en milieu acide. Les courbes tracées à pH 6,8 et 4,8 présentent des absorptions à ces deux longueurs d'ondes. La valeur du pKa correspondant au changement de couleur est le pH pour lequel une quantité équivalente d'espèces protonées et déprotonées du xylénol orange sont en solution. Notre zone de virage semble donc, d'après les courbes a et b, se situer entre pH 6 et 7 ce qui est en accord avec les valeurs de la littérature (Tableau 5). Une bande d'absorption à 579 nm persiste à pH 4,8 ne permettant pas un dosage dans des conditions optimales. Le dosage doit donc approximativement se situer à un pH < 4. L'analyse de la Figure 72c nous indique que l'ajout de gadolinium libre sur une solution à pH 3 entraîne l'apparition d'un nouveau pic à 569 nm. Le second spectre en présence de Gd^{3+} à pH 1,7 ne révèle toutefois aucun pic supplémentaire. Ces nouvelles courbes indiquent donc qu'on doit approximativement se trouver à un pH > 2,5 pour observer la présence de Gd^{3+} . Les conditions optimales de dosage des ions Gd^{3+} se situe donc entre pH 3 et 4. Ces valeurs sont en accord avec la littérature qui indique la présence majoritaire de la forme H_3XO^{3-} entre pH 3 et 6, et préconise un dosage à pH 4,8.

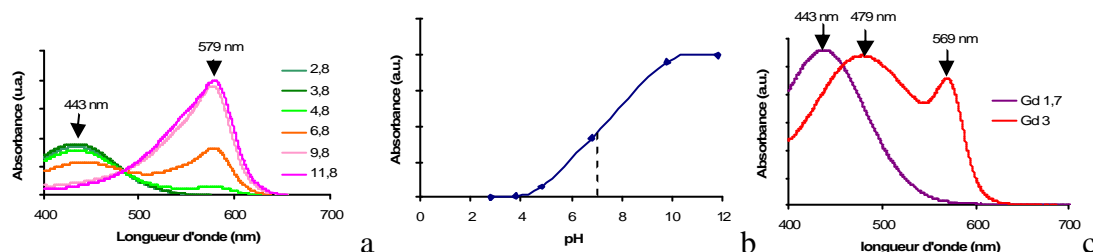


Figure 72 : spectres UV-visible à différents pH de solutions de xylénol non complexant (a) et complexant Gd (c) ; variation de l'absorbance à 579 nm du xylénol non complexant en fonction du pH (b).

Une solution aqueuse de $GdCl_3$ est donc ajoutée graduellement à la solution colloïdale contenant Au@DTDTPA. Lorsqu'il ne reste plus aucun DTDTPA accessible (c'est-à-dire que chaque DTDTPA complexe un Gd^{3+}), les ions Gd^{3+} sont alors complexés par le xylénol induisant ainsi une modification du spectre d'absorption UV-visible du xylénol (Figure 72 c). Les conditions opératoires du dosage ont été validées sur des solutions de concentration connue en DTDTPA en absence de nanoparticules d'or. Sur une solution aqueuse ($[DTDTPA]=0$), le changement de couleur est observé dès la première goutte (Figure 73 a). Sur une solution de concentration connue en DTDTPA, le changement de couleur est observé à la quantité théorique correspondant à un rapport équimolaire de DTDTPA/Gd (Figure 73b) Une solution aqueuse de $GdCl_3$ est donc ajoutée graduellement à la solution colloïdale contenant Au@DTDTPA. Lorsqu'il ne reste plus aucun DTDTPA accessible (c'est-à-dire que chaque DTDTPA complexe un Gd^{3+}), les ions Gd^{3+} sont alors complexés par le xylénol induisant ainsi une modification du spectre d'absorption UV-visible du xylénol (Figure 73c).

Le dosage sur une solution Au@DTDTPA nous permet de déduire la complexation de 157 Gd^{3+} par particule (Figure 73 c).

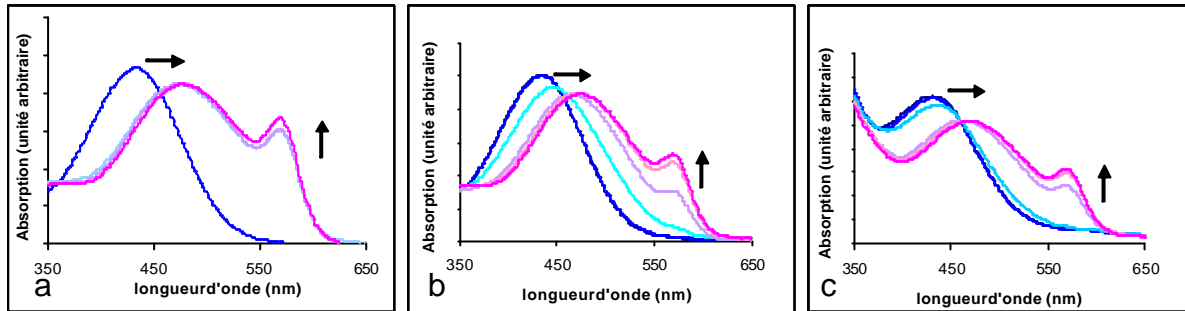


Figure 73 : évolution de l'absorption en fonction de l'ajout en Gd^{3+} . Sur une solution aqueuse (a), sur une solution de DTDTPA (b) et sur une solution Au@DTDTPA (c).

L'analyse thermogravimétrique d'une poudre d'Au@DTDTPA:Gd montre que la proportion de molécules organiques comparée à la partie inorganique est en retrait (34%) par rapport à celle d'une poudre d'Au@DTDTPA (44,2%) (Figure 66). De plus, l'évaporation des molécules organiques se produit à une température sensiblement supérieure (de 175 à 225°C) à celle dans le cas d'Au@DTDTPA. Ces deux observations semblent confirmer la présence d'ions Gd^{3+} complexés par le DTDTPA à la surface des particules. L'ATG nous permet aussi une analyse quantitative du Gd^{3+} ; le thermogramme nous permet ainsi de déduire un rapport expérimental Gd/DTDTPA de 0,955. La présence et la proportion relative de gadolinium sont confirmés par l'analyse XPS pratiquée sur une poudre Au@DTDTPA:Gd (N/Gd = 5,0 pour Gd/DTDTPA =1,0 soit un parfait accord avec le rapport théorique). Le dosage colorimétrique donne un rapport Gd/DTDTPA =1,05 qui confirme ainsi les résultats obtenus en ATG et en XPS.

C. Des propriétés intéressantes pour l'IRM

Ces nanoparticules d'or enrobées de complexes de Gd (III) ont été évaluées dans leur capacité à réduire le temps de relaxation des protons de l'eau. Leur capacité à augmenter le contraste a été étudiée en mesurant le temps de relaxation longitudinale (T_1) sur des solutions colloïdales aqueuses de concentrations croissantes en nanoparticules (Figure 74). Les images pondérées en T_1 montrent clairement que les nanoparticules Au@DTDTPA:Gd induisent un contraste positif comparé aux échantillons sans Gd^{3+} (Au@DTDTPA). Pour une concentration équivalente en gadolinium, l'augmentation du contraste observée entre une solution de complexes DTPA:Gd et de Au@DTDTPA est du même ordre: la valeur de la relaxivité r_1 (la pente de la courbe $1/T_1 = f([Gd])$) des protons en présence d'Au@DTDTPA:Gd ($r_1=3,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et celle du DTPA:Gd ($r_1=3,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) sont en effet très similaires (Tableau 10; Figure 75).

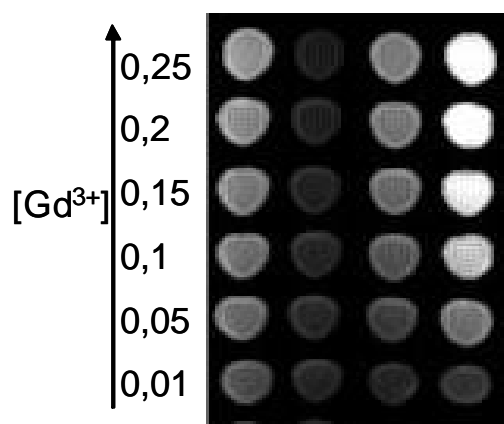


Figure 74 : IRM pondérée en T_1 de solutions aqueuses à différentes concentrations en gadolinium (mM), de gauche à droite, Au@DTDTPA:Gd, Au@DTDTPA, DTPA:Gd et $GdCl_3$

	A	B
Au@DTDTPA:Gd	3,90	585
Au@DTDTPA	0,02	-
DTPA:Gd	3,00	3,00
Gd^{3+}	11,39	11,39

Tableau 10 : relaxivité r_1 ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$) des différentes solutions pour une même concentration en Gd (A) et pour une même concentration en agent de contraste (B).

L'immobilisation des complexes sur les nanoparticules ne semble donc avoir aucune influence sur les interactions Gd^{3+}/H_2O : chaque chélate de gadolinium présent sur l'or adopte quasiment le même comportement que le DTPA:Gd en solution. De plus, cette similitude élimine les doutes sur la présence de Gd^{3+} libre dans les solutions colloïdales d'Au@DTDTPA:Gd car l'influence de Gd (III) complexé est largement inférieure à celle d'un Gd^{3+} libre. On observe donc également que le contraste de Gd^{3+} libre est largement supérieur à celui de DTPA:Gd mais son application clinique est cependant impossible de part sa toxicité (remplacement de Ca^{2+}). L'augmentation du contraste par agent de contraste est cependant largement supérieure quand les nanoparticules Au@DTDTPA:Gd sont utilisées (Tableau 10; Figure 75) car chaque particule d'or est porteuse de 150 complexes DTDTPA:Gd. Si on rapporte les valeurs de relaxivité en fonction de la concentration non pas en gadolinium mais en agent de contraste, la relaxivité des nanoparticules d'Au@DTDTPA:Gd atteint alors $585 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$ tandis que les valeurs pour les complexes DTDTPA:Gd et le gadolinium libre demeurent respectivement à 3,00 et $11,39 \text{ mM}^{-1} \cdot s^{-1}$.

La stratégie consistant à immobiliser des complexes de Gd(III) sur des nanoparticules d'or permet d'obtenir des agents de contraste de plus haute relaxivité (r_1) que le gadolinium libre mais sans en rencontrer les désavantages liés à la toxicité.

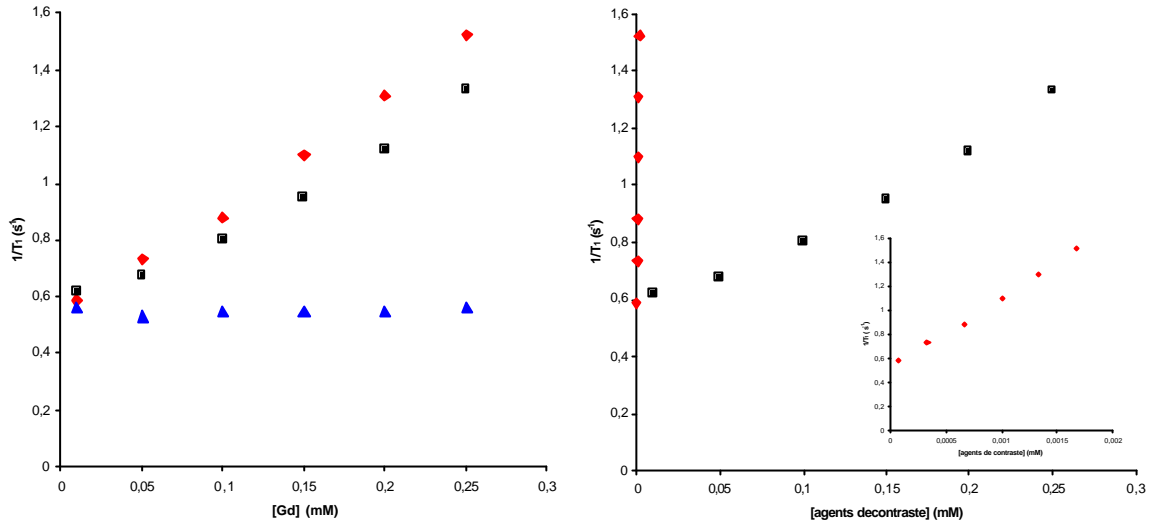


Figure 75 : taux de relaxation longitudinale ($1/T_1$) de nanoparticules d' Au@DTDTPA:Gd (en rouge) d' Au@DTDTPA(en bleu), et de DTPA:Gd (en noir) en fonction d'une quantité croissante de gadolinium (a) et de l'agent de contraste (b)

D. Complexation de l'euporium

Outre la complexation du gadolinium, les polyaminocarboxylates complexent aussi la plupart des lanthanides dont l'euporium. Ce dernier sous sa forme Eu^{3+} possède des propriétés paramagnétiques bien inférieures à celle du gadolinium mais présente en contre partie des propriétés intéressantes de luminescence notamment en détection en temps résolu.

Une étude préliminaire de complexation sur des nanoparticules Au@DTDTPA a donc été réalisée afin de tester la faisabilité de ce nano-objet original. La complexation de l'euporium (III) a donc été effectuée dans des conditions identiques à celles du gadolinium c'est à dire par simple agitation en solution aqueuse. La quantité d' Eu^{3+} complexés a été évaluée à 81 Eu^{3+} par particule (de diamètre moyen 2,4) par dosage colorimétrique à l'aide du xylénol orange (qui complexé tous les lanthanides) (Figure 76). Cette valeur est du même ordre que la quantité de gadolinium (150) complexé préalablement même si on constate un écart conséquent. Cette étude n'ayant été réalisée que sur une seule solution colloïdale qui n'a pas été caractérisée en MET, on peut attribuer cette différence à une variation de la taille des nanoparticules entre les deux expériences.

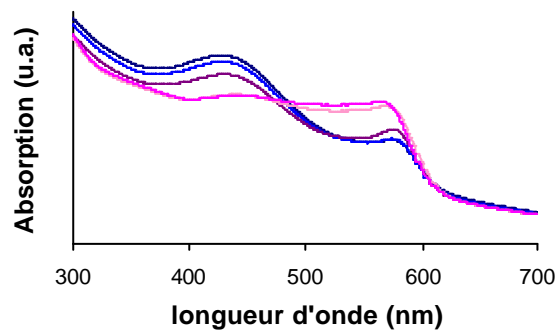


Figure 76 : dosage colorimétrique de la complexation d' Eu^{3+} sur Au@DTDTPA.

Ces nanoparticules ont été analysées en fluorescence. Une étude préalable sur un complexe DTPA:Eu a permis de repérer un maximum de fluorescence à 589 et 619 nm pour une excitation à 393 nm. L'analyse en fluorimétrie sur les solutions colloïdales Au@DTDTPA:Eu n'a pas permis d'observer de bande d'émission pour une excitation comparable à 393 nm. La forte absorption du noyau métallique à cette longueur d'onde (Figure 62) affaiblit considérablement la quantité de photons parvenant aux complexes d'euporium et par voie de conséquence anéantit la fluorescence émise. Néanmoins, un pic d'émission très faible à $\lambda_{Em}=620$ nm est observé pour une longueur d'onde d'excitation décalée à 565 nm. Le rendement quantique des chélates d'euporium étant très faibles, une analyse plus pointue nécessiterait l'utilisation d'une source laser ou d'une détection en temps résolu, afin d'évaluer correctement les capacités en fluorescence de ces nanoparticules.

E. Conclusion

En conclusion, ce travail démontre que des nanoparticules d'or avec une taille comprise entre 2-2,5 nm peuvent être synthétisées suivant le protocole de Brust en utilisant un ligand dithiolé original, le DTPA. Si ces molécules ne sont pas accrochées sur les nanoparticules d'or par leurs deux extrémités thiolées, elles permettent cependant la formation d'une robuste multicouche par des liaisons inter et intra couche à l'aide de ponts disulfures. Leur présence à la surface des particules assure une formidable stabilité colloïdale sur une large gamme de pH et permet de plus la complexation d'agents paramagnétiques (gadolinium, euporium). La présence de complexes de gadolinium sur les nanoparticules d'or les rend très intéressantes comme agents de contraste pour l'IRM car l'immobilisation d'une grande quantité de complexes DTPA:Gd sur chaque particule génère, pour un nombre identique d'agents de contraste, une augmentation de la relaxivité plus prononcée que dans le cas des complexes de DTPA:Gd qui sont communément utilisés en diagnostic clinique. La comparaison aux autres agents de contraste positif nanoparticulaires est difficile en terme d'amélioration du contraste tant la relaxivité est dépendante de nombreux facteurs et notamment de la séquence spin-écho utilisée. Les études sur le protocole IRM se limitent, dans ce travail, à une séquence spin-écho classique mais des études supplémentaires permettraient peut-être une amélioration sensible des performances de contraste. Si les performances en terme de relaxivité sont difficilement comparables par rapport aux autres agents de contraste nanoparticulaires en développement, on peut toutefois remarquer plusieurs améliorations par rapport aux nanoparticules rapportées jusqu'ici (dendrimères, micelles, nanoparticules Au-SiO₂). L'élaboration des nanoparticules est tout d'abord d'une grande simplicité, ce qui pour une application commerciale à large échelle est une priorité. La formation d'une multicouche apporte de surcroît une grande stabilité et permet l'immobilisation d'une quantité importante de gadolinium. Enfin, la taille des nanoparticules obtenues convient parfaitement à des applications classiques en IRM, le système réticulo-endothélial ne détectant pas les particules d'aussi faible taille. La biocompatibilité de l'or permet d'envisager l'utilisation de ces nanoparticules pour le diagnostic et la thérapie (par hyperthermie) dans les organismes vivants. De plus, une partie des DTPA à la périphérie de la particule peut être conjuguée à des molécules porteuses d'une fonction biologique pour le ciblage spécifique d'un substrat biologique. Les possibilités de multi-fonctionnalisation des nanoparticules ouvrent ainsi un large panel d'adaptations en fonction de l'application visée. L'élaboration de nanoparticules Au@DTDTPA complexant conjointement l'euporium et le gadolinium pourrait ainsi permettre la double détection de ces nanoparticules par fluorescence et par résonance magnétique. De plus, ces nanoparticules peuvent aussi être appliquées à la capture des ions métalliques dans le domaine de la décontamination de l'eau.

F. Perspectives

Les prochaines étapes de ce travail sont tout d'abord des caractérisations supplémentaires du comportement en IRM. Dans l'optique d'une utilisation *in vivo* de notre agent de contraste, une étude du T_1 à température corporelle (37°C) et en fonction du pH serait utile avant application. Une étude de la constante d'affinité à l'aide du xylénol pourrait aussi compléter les caractéristiques de notre agent de contraste. L'étude des mécanismes de la relaxation autour des nanoparticules d'or peut aussi représenter une étude fondamentale intéressante pour la compréhension du phénomène. Les perspectives à ce travail sont aussi naturellement une amélioration du matériau déjà élaboré (les nanoparticules Au@DTDTPA:Gd). Une étude plus approfondie des paramètres de synthèse pourrait permettre l'élaboration de nanoparticules de diamètre supérieur permettant ainsi le greffage d'une quantité supplémentaire de complexes DTDTPA:Gd. Dans cette approche, la synthèse de nanoparticules par la méthode citrate serait donc envisageable pour obtenir des particules de taille encore plus importante (de l'ordre de 20 nm) mais les difficultés liées à leur caractérisation n'en font pas une priorité. Enfin, les applications *in vivo* semblent être la voie la plus intéressante pour ces nanoparticules qui possèdent un potentiel pour la multi fonctionnalisation notamment en vue d'un ciblage passif ou actif.

Conclusion générale

Les deux études menées conjointement sur les nanoparticules d'or ont exploité les propriétés de fonctionnalisation de ces dernières, permettant ainsi l'immobilisation en nombre d'agents de détection à sa surface.

L'utilisation de nanoparticules d'or comme plate-forme nous a donc mené à l'élaboration de nanoparticules d'une taille homogène entre 8 et 12 nm porteuses de plusieurs centaines de fluorophores de type rhodamine. Ces nanoparticules ont été caractérisées par la mise au point d'une méthode de dosage originale démontrant l'efficacité d'un greffage en deux étapes. Une étude préliminaire menée sur des puces ADN a ainsi démontré que l'application de ces nouvelles sondes luminescentes nanométriques possède un réel potentiel qui pourrait permettre de diminuer le seuil de détection en microscopie par fluorescence de deux ordres de grandeurs.

Une étude sur l'application des nanoparticules à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a d'autre part été réalisée suivant une démarche analogue. Des nanoparticules d'or de 2-2,5 nm ont ainsi été synthétisées par la méthode de Brust utilisant un ligand original, un dérivé dithiolé de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTDTPA). La nanoparticule hybride ainsi élaborée présente une multicouche très réticulée formée de DTDTPA reliés par des ponts disulfures qui lui procure une formidable stabilité sur une large gamme de pH. De plus, cette multicouche permet l'immobilisation d'un nombre important de complexes de gadolinium sur la nanoparticule lui conférant ainsi un potentiel intéressant comme agent de contraste en IRM. L'étude IRM pratiquée sur ces nanoparticules révèle en effet une augmentation significative du contraste par rapport au DTPA:Gd. La biocompatibilité de l'or et les facultés de multifonctionnalisation de ces nanoparticules d'or permettent ainsi d'envisager son application pour le diagnostic (IRM) *in vivo* et la thérapie (hyperthermie).

Ces deux études réunies montrent toute l'étendue des capacités d'adaptation et de fonctionnalisation des nanoparticules d'or pour des applications biologiques et plus particulièrement pour la détection qu'elle soit à un niveau microscopique ou anatomique. Les nanoparticules d'or, bien qu'elles soient à l'origine du développement des nanotechnologies, semblent encore promises à un bel avenir car leurs immenses facultés ne sont pas encore épuisées.

ANNEXES

ANNEXE I : La vectorisation médicale

A. Introduction

Les méthodes nanométriques qui reposent à la fois sur l'expérimentation et sur la modélisation informatique, rendent le processus de recherche thérapeutique moins hasardeux et moins empirique et de ce fait plus fiable. De nombreux médicaments sont prescrits simplement parce qu'on a constaté une certaine efficacité dans leur prise, même si leur mécanisme d'action est encore inconnu. On ne s'aperçoit des effets secondaires qu'au moment du test clinique, voire après la mise sur le marché du médicament. C'est pourquoi le processus d'autorisation de commercialisation est si long et si complexe. A l'inverse l'action de la plupart des nanomédicaments sera non seulement comprise mais aussi ciblée car ils proposeront une fonction de détection. Ils présenteront donc moins d'effets secondaires. Tous ces atouts les rendront plus efficaces. Les médicaments disponibles actuellement sont essentiellement de petites molécules de faible masse qui circulent donc librement dans toutes les cellules du corps. Cette biodistribution hasardeuse peut avoir des conséquences néfastes tels qu'une toxicité dans les tissus non visés, des difficultés à rester dans des concentrations médicamenteuses limites pour le traitement thérapeutique, des problèmes de métabolisme et d'évacuation des médicaments, tout cela réduisant considérablement leur efficacité.²⁴¹ Pour être efficaces, les substances médicamenteuses doivent atteindre la bonne cible dans l'organisme : les anti-dépresseurs doivent se fixer dans le cerveau, les anti-cancéreux dans les tumeurs, etc. Le facteur temps a aussi son importance ; certains médicaments agissent vite mais peu de temps, tandis que l'action d'autres remèdes persiste des journées entières. On appelle biodisponibilité la faculté d'une molécule thérapeutique à se trouver au bon endroit, au bon moment. Son optimisation, à la fois dans le temps et l'espace, est un problème majeur de l'industrie pharmaceutique.

De nouveaux médicaments basés sur des nanotechnologies peuvent permettre de réduire ces problèmes en combinant l'action thérapeutique à un ciblage des organes ou cellules malades grâce à leurs capacités multifonctionnelles. Des études ont déjà permis la réalisation de médicaments encapsulant le principe actif dans des nanosphères,²⁴² ou le conjuguant à des macromolécules du type dendrimères.²⁴³ Ce nouveau type de médicaments peut permettre une libération contrôlée du principe actif augmentant ainsi son efficacité et permettant de réduire la dose initiale. Le ciblage spécifique peut donc réduire la toxicité, et, l'encapsulation ou la conjugaison à des nanoparticules peut protéger la molécule active du métabolisme et de l'évacuation générale (macrophages du foie). A ces fonctions de transport, la nanoparticule peut ajouter aussi une fonction physique spécifique permettant l'application d'un signal externe tel que les ultra sons,²⁴⁴ la lumière proche infra-rouge²⁴⁵ ou les radio-fréquences.²⁴⁶ L'utilisation de nanoparticules magnétiques liées à des cellules spécifiques peuvent par soumission à un champ magnétique entraîner un échauffement local et conduire à la destruction thermique des cellules avoisinantes indésirables (cancéreuses par exemple). La vectorisation implique donc le transport des molécules actives jusqu'à la cible biologique. C'est là qu'interviennent les nanoparticules qui de part leurs tailles et leurs capacités de polyfonctionnalisation sont des vecteurs idéaux. En effet, tout vecteur doit avoir une taille

²⁴¹ D.B. Buxton, S.C. Lee, S.A. Wickline, M. Ferrari, *Circulation*, **2003**, 108, 2737.

²⁴² F.D. Kolodgie, M. John, C. Khurana, *Circulation*, **2002**, 106, 1195.

²⁴³ H.R. Ihre, O.L. Padilla De Jesus, F.C. Jr Szoka, *Bioconjug. Chem.*, **2002**, 13, 443.

²⁴⁴ C.S. Kwok, P.D. Mourad, L.A. Crum, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2001**, 57, 151.

²⁴⁵ S.R. Sershen, S.L. Westcott, N.J. Halas, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, 51, 293.

²⁴⁶ J. Kost, J. Wolfrum, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1987**, 21, 1367.

inférieure à 1µm pour être transporter dans les capillaires sanguins et une taille inférieure à 100 nm pour diffuser à travers les parois capillaires.

On différenciera ici deux types de ciblage thérapeutique : le ciblage passif et le ciblage actif.²⁴⁷

B. Ciblage passif : ciblage tissulaire

Les vecteurs médicaux introduits tel quel en solution par voie intraveineuse doivent satisfaire à différentes conditions pour permettre de cibler n'importe quel organe. En effet, le système immunitaire est doté d'un mécanisme de protection des corps étrangers appelé opsonisation qu'il faut contourner. L'opsonisation est l'adsorption de protéines à la surface de particules repérées ainsi comme étrangères entraînant leur élimination par les macrophages du foie. Ce nettoyage par le SRE diminue donc le temps de circulation des particules dans le flux sanguin et réduit donc les chances d'atteindre le site ciblé. Pour atteindre un autre organe que le foie, il faudra donc tout d'abord éviter l'opsonisation. Pour cela, plusieurs stratégies sont envisageables, la première étant celle du biomimétisme. Cette stratégie consiste à recouvrir la surface de la particule d'une molécule familière au corps humain et donc non repérée et éliminée par celui-ci. Les molécules utilisées dans la littérature sont soit du type érythrocyte soit des dérivés de polymères comme les polysaccharides et les polyéthylène glycol. L'autre stratégie sera la réalisation de particules vectrices d'une taille < 50 nm qui possèdent de ce fait un rayon de courbure élevé qui n'autorise pas l'opsonisation.

Dans le ciblage passif, les macromolécules et les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans les sites tumoraux avec un accroissement de la perméabilité et un effet de rétention (EPR : Enhanced permeation and retention effect). Cet effet résulte de deux facteurs : les tumeurs angiogéniques produisent des augmentation des facteurs vasculaires endothéliaux qui hyperperméabilisent la liaison tumoro-vasculaire et cause des fuites de macromolécules ou de nanoparticules ; les tumeurs n'ont pas de système de drainage lymphatique ce qui entraîne une accumulation des nanoparticules. (Figure 77)

C. Ciblage actif : ciblage cellulaire

L'autre manière de cibler certains organes est le transport des nanoparticules à l'intérieur de cellules, il s'agit donc d'un ciblage cellulaire. Pour permettre son transport dans la cellule, la nanoparticule doit être reconnue par cette dernière à l'aide de récepteurs spécifiques du type acide folique, transferrine, EGF (epidermal growth factor) ou d'anticorps monoclonaux (antiCD20, antiCD52). Ces récepteurs permettent alors une capture de la particule par endocytose. Ces ligands sont liés à l'agent de contraste de manière covalente ou non. Le temps de demi-vie de tels agents, de l'ordre de quelques heures, permet une exposition et des interactions suffisantes avec les sites récepteurs. L'autre caractéristique requise pour ces ligands est qu'ils se lient uniquement aux épitopes choisis pour le traitement ou la visualisation, en combinant une importante augmentation du contraste. Enfin, ces agents doivent avoir une toxicologie acceptable et permettre une utilisation clinique régulière.

²⁴⁷ G.M. Lanza, R. Lamerichs, S. Caruthers, S.A. Wickline, *Medicamundi*, **2003**, 47, 34.

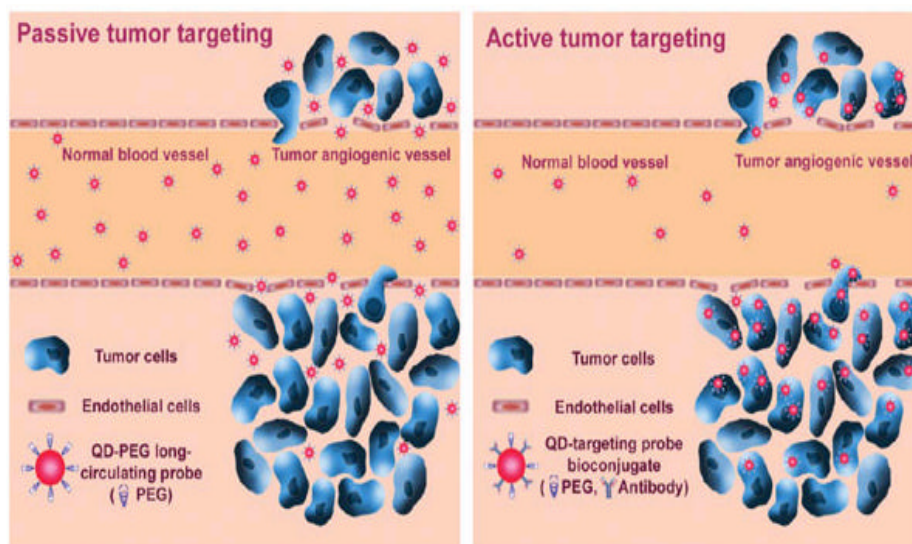


Figure 77 : représentations des ciblage actifs et passifs

D. Imagerie moléculaire

Les progrès de la génomique ont permis d'établir une cartographie du génome humain en 2001. Les études sur les gènes et leur expression (protéomique) laissent envisager la découverte de nombreux biomarqueurs qui pourraient être appliqués à l'imagerie médicale ou à la thérapie à l'échelle de la molécule. Ces nouveaux marqueurs thérapeutiques et de diagnostic sont le cœur de l'imagerie moléculaire. Une définition générale de l'imagerie moléculaire est le diagnostic *in vivo* de pathologies par détection de leur signature biologique à un niveau subcellulaire. Cette approche diffère de l'approche traditionnelle pour laquelle le diagnostic d'après le contraste de l'image est relié aux différences intrinsèques entre le tissu sain et le tissu malade qui sont une expression de la maladie.

Les constituants moléculaires d'une maladie sont trop petits pour être repérés par quelque méthode clinique que ce soit. Cependant, grâce à la présence de leur signature biologique unique, elles peuvent être détectées par la présence d'agents de contraste qui ont une affinité pour ces molécules. Les agents de contraste s'accablent donc dans les régions malades selon un mécanisme qui peut être soit passif soit actif.

ANNEXE II : principe de l'IRM

A. Le phénomène de résonance magnétique

La résonance magnétique nucléaire consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux sous l'action conjointe de deux champs magnétiques : un champ magnétique fixe et élevé \vec{B}_0 et un champ électromagnétique tournant \vec{B}_1 (radiofréquence).

En absence de champ, les moments magnétiques ne sont pas orientés (Figure 78). La somme des champs magnétiques est alors nulle et il n'y a pas de vecteur d'aimantation macroscopique ($\vec{M} = 0$).

En présence d'un champ magnétique statique, les moments magnétiques vont avoir tendance à s'orienter dans la direction de ce dernier et prennent $2I+1$ orientations soit deux orientations pour ^1H ($I=1/2$) (Figure 78) Ces deux orientations correspondent à deux états d'énergie.

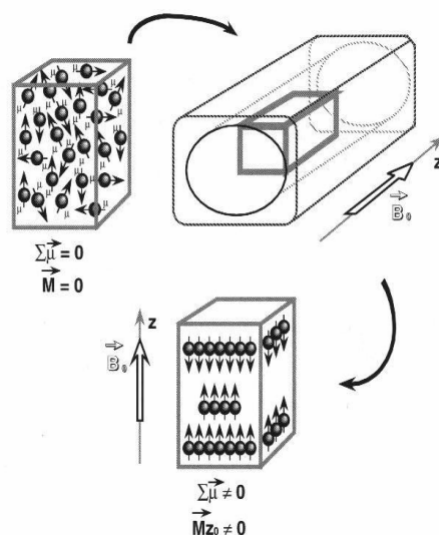


Figure 78: Orientation du champ magnétique en présence de champs magnétique.

En présence de ce champ, les moments magnétiques associés aux deux états d'énergie se mettent en mouvement et forment deux populations tournant autour de \vec{B}_0 avec un certain angle décrivant ainsi deux cônes de précession (parallèle et antiparallèle). Ce mouvement a une vitesse correspondant à une fréquence de précession (angulaire) $\vec{\omega}_0 = \gamma \vec{B}_0$, γ étant le rapport gyromagnétique (spécifique à chaque noyau). La répartition des protons dans le sens parallèle et antiparallèle (soit respectivement à basse énergie E_1 et haute énergie E_2) est à peu près équivalente. En fait, il y a plus de protons parallèles à \vec{B}_0 mais cette différence (liée à la force du champ magnétique et à la température) est très petite : à 0,5 Tesla et à température corporelle, elle est de l'ordre de 2 par million. Bien qu'infime, cette différence suffit à créer un signal RMN à l'échelle tissulaire. Ce sont ces protons en surnombre qui vont être à l'origine de l'apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique \vec{M} aligné sur \vec{B}_0 selon \vec{O}_z .

A l'équilibre, le mouvement de précession des protons fait apparaître une composante longitudinale \vec{M}_{z_0} .

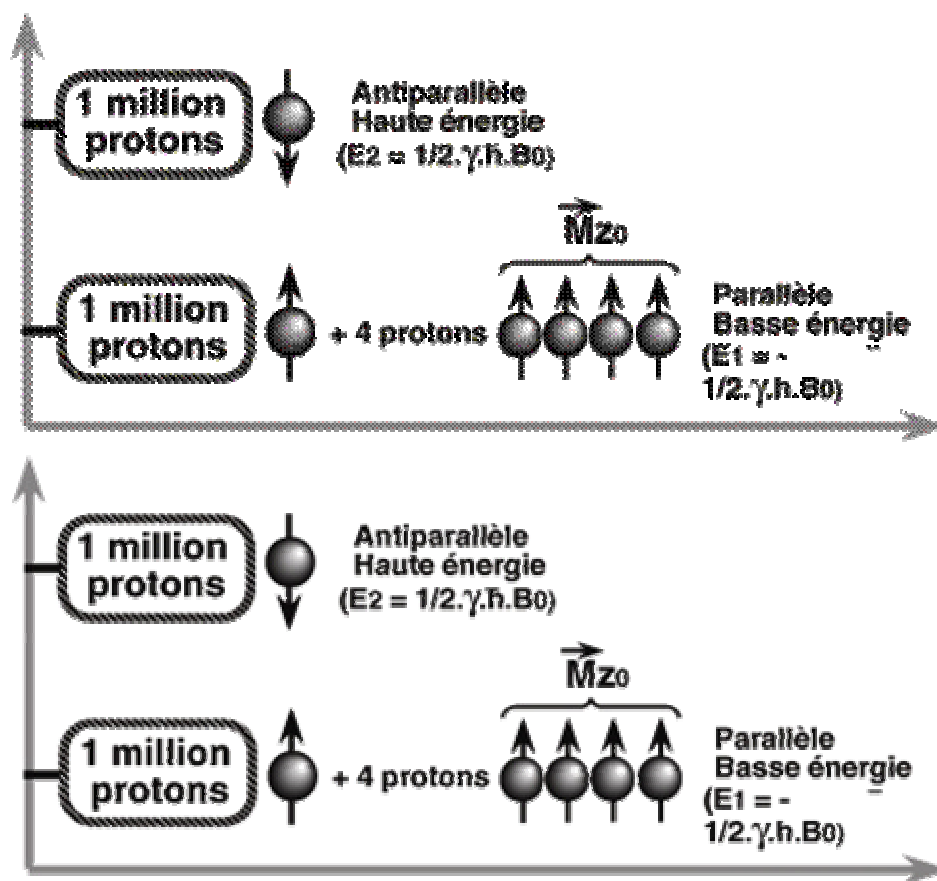


Figure 79 : Sous un champ magnétique B_0 , apparition d'un champ d'aimantation macroscopique \vec{M} dû aux protons parallèles en surnombre.

Il n'est pas possible de mesurer directement le vecteur d'aimantation macroscopique à l'équilibre car il est infiniment petit par rapport à \vec{B}_0 . Pour l'observer, il faut donc basculer dans le plan xOy par un deuxième champ magnétique \vec{B}_1 . \vec{B}_1 est appliqué selon \vec{Ox} . Pour qu'il y ait transfert d'énergie du système à l'équilibre, il faut que la fréquence de rotation ω_r de \vec{B}_1 soit égale à la fréquence de Larmor ω_0 : on dit alors que les deux systèmes sont en résonance. La fréquence de Larmor étant située dans le domaine des ondes radiophoniques, le champ \vec{B}_1 est une onde de radiofréquence (RF).

Dans le cas d'un spectromètre à transformée de Fourier, \vec{B}_1 est envoyé sous forme d'impulsions très brèves (de l'ordre de la microseconde) afin d'obtenir la résonance.

Comme nous l'avons vu précédemment, les protons alignés dans le champ magnétique sont représentés par un vecteur de magnétisation \vec{M} qui a deux composantes, la magnétisation longitudinale \vec{M}_z et la magnétisation transversale \vec{M}_{xy} .

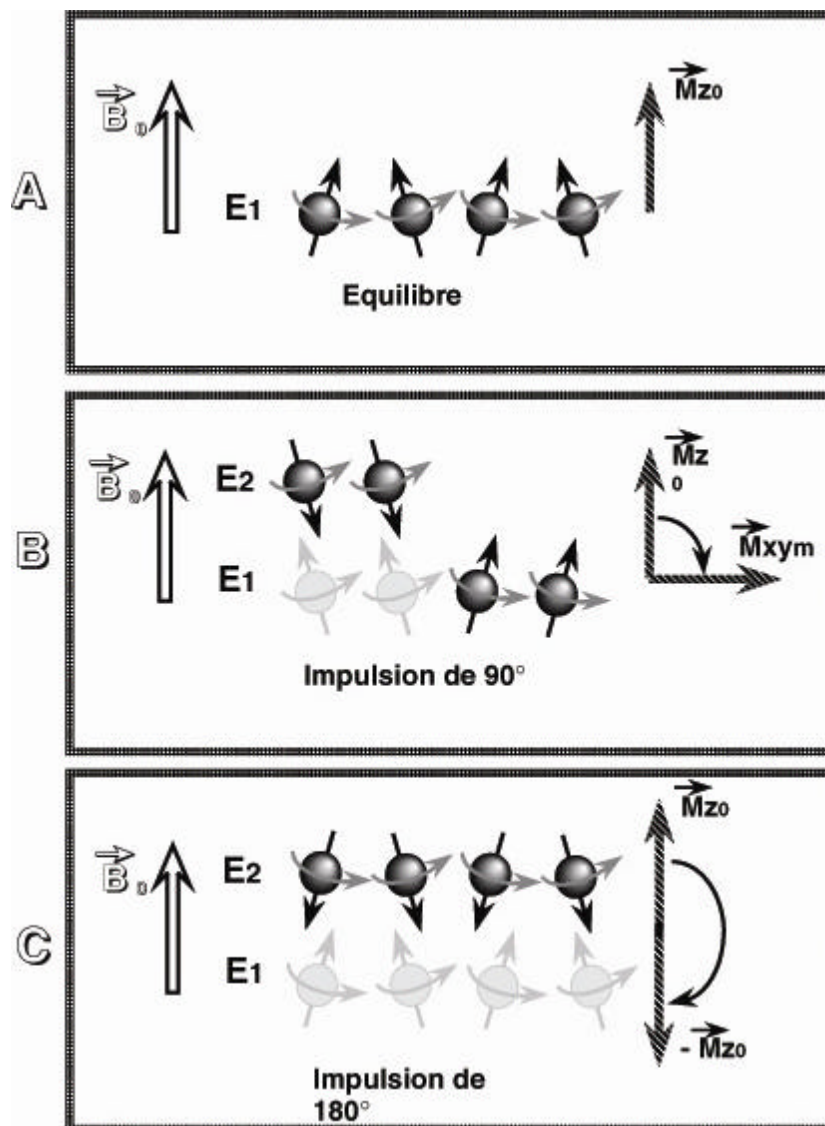


Figure 80 : Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique :

A Avant l'impulsion RF, il y a 4 protons parallèles en surnombre qui vont être à l'origine de l'apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique aligné sur \vec{B}_0 , sans composante transversale car les protons sont déphasés : \vec{M} est aligné sur \vec{Ox} , $\vec{M} = \vec{M}_{z0}$ ($\vec{M}_{xy} = 0$)

B L'impulsion RF provoque des transitions : E1? E2 (parallèles? antiparallèles) et un rephasage des protons (\vec{M}_z diminue et \vec{M}_{xy} croît). Lorsque deux des protons en surnombre sont passés du niveau E1 au niveau E2, il y a égalisation des populations sur les deux niveaux d'énergie et il n'y a plus de composante longitudinale de \vec{M} ($\vec{M}_z = 0$) et \vec{M}_{xy} est maximal (\vec{M}_{xym}) : impulsion de 90°.

C Lorsque les 4 protons en surnombre sont passés du niveau E1 au niveau E2, il y a inversion des protons (en « excès ») sur les niveaux d'énergie d'où inversion de la composante longitudinale de $\vec{M} = -\vec{M}_{z0}$: impulsion de 180°.

Si on supprime le champ \vec{B}_1 , le vecteur \vec{M} a tendance à revenir à sa position initiale c'est à dire colinéaire à l'axe \vec{Oz} . Sa composante \vec{M}_y se déphase et tend alors vers 0, de même

pour \vec{M}_x , tandis que \vec{M}_z croît. Cette décroissance de \vec{M}_y se fait de façon exponentielle et engendre un courant induit dans une bobine située sur l'axe $\vec{O}y$.

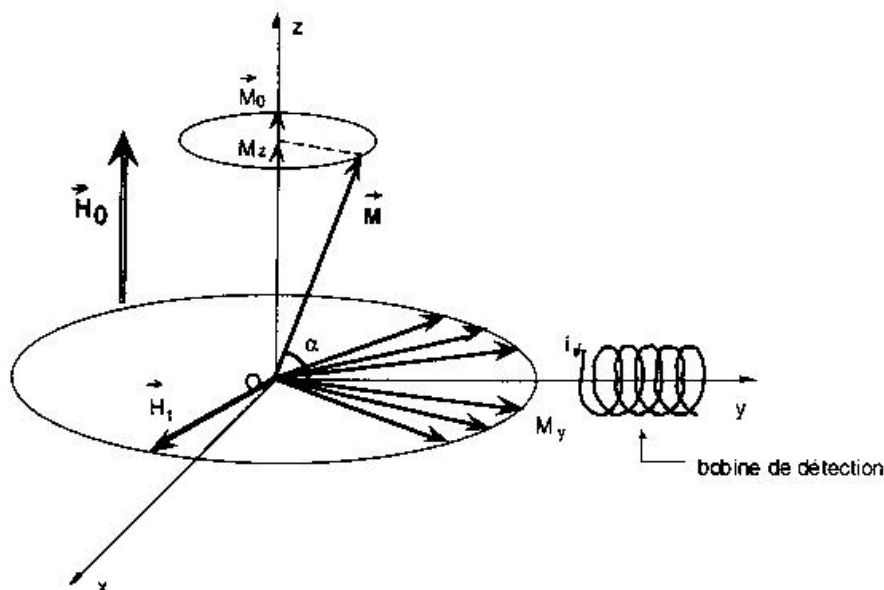


Figure 81 : Orientation de la magnétisation du proton sous l'effet de champs magnétiques.

Une fois amplifié, le signal induit capté par la bobine est appelé FID (Free Induction Decay) ou encore signal de précession libre (Figure 82). Le signal FID représente un ensemble de sinusoïdes amorties en fonction du temps. Le signal observé est lié à la fois aux inhomogénéités de champ d'origine moléculaire (T_2) auxquelles s'ajoutent les inhomogénéités propres du champ magnétique externe \vec{B}_0 (T_2^*). Pour s'affranchir de l'inhomogénéité propre à \vec{B}_0 , après application de RF à 90° , on procède à l'application d'impulsion de RF à 180° à un demi temps d'écho de spin $T_E/2$ entraînant une annulation de ces inhomogénéités et permettant d'accéder à un T_2 vrai fonction uniquement des inhomogénéités moléculaires. La transformée de Fourier du signal permet de rendre compréhensible le signal. On obtient ainsi un signal fonction de la fréquence représentant le spectre RMN final.

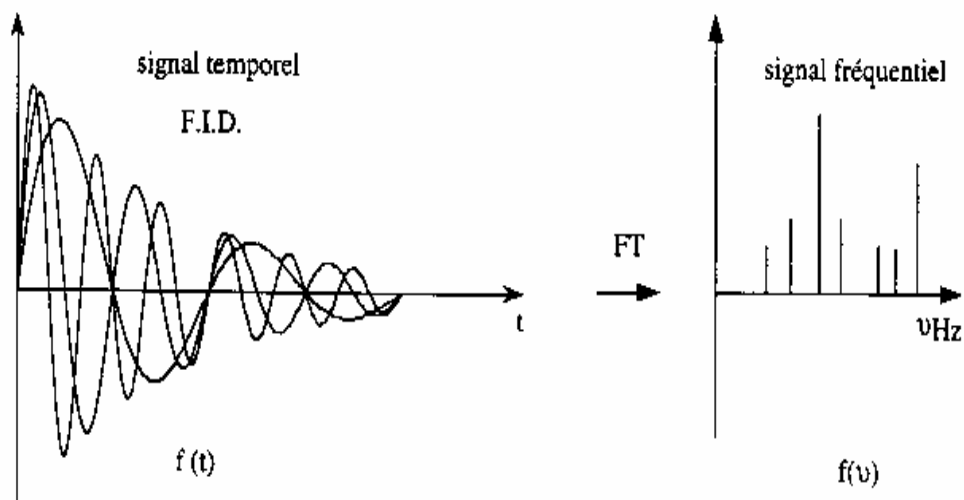


Figure 82: Signaux temporel et fréquentiel

B. Les phénomènes de relaxation

On parle de relaxation quand, après absorption de l'énergie électromagnétique fournie par \vec{B}_1 , les noyaux tendent à retrouver la distribution de Boltzmann (c'est à dire quand \vec{M} revient à sa position d'équilibre). On peut la décomposer en deux phénomènes, la relaxation longitudinale \vec{M}_z et la relaxation transversale \vec{M}_{xy} . C'est par la relaxation des protons que le phénomène de RMN devient observable. L'apparition et la disparition de ces deux phénomènes font intervenir des mécanismes très différents :

- pour \vec{M}_z : transition des protons entre les niveaux d'énergie E_1 et E_2 et inversement de E_2 vers E_1 ;
- pour \vec{M}_{xy} : mise en phase et déphasage des spins (Figure 83)

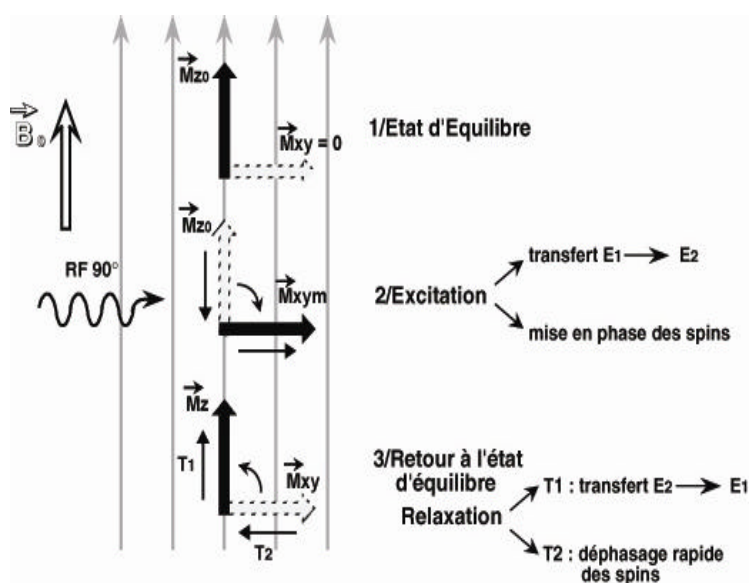


Figure 83 : interactions entre l'onde de radiofréquence et les protons placés dans le champ B_0

1. Relaxation longitudinale

A l'équilibre $\vec{M}_z = M_0$, après le basculement $\vec{M}_z = 0$. Le retour de \vec{M}_z à sa valeur de départ M_0 est exponentielle : $M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$ (Figure 84). Cette relaxation longitudinale, dite relaxation T_1 ou encore relaxation "spin-réseau", correspond au retour à l'équilibre énergétique du système après l'excitation. La constante de temps T_1 est le temps nécessaire pour que les protons atteignent 63% de leur aimantation. Elle dépend en fait de la mobilité des atomes d'hydrogène ou de celle des molécules où ils sont engagés. T_1 sera d'autant plus court que ces hydrogènes seront liés à de grosses molécules.

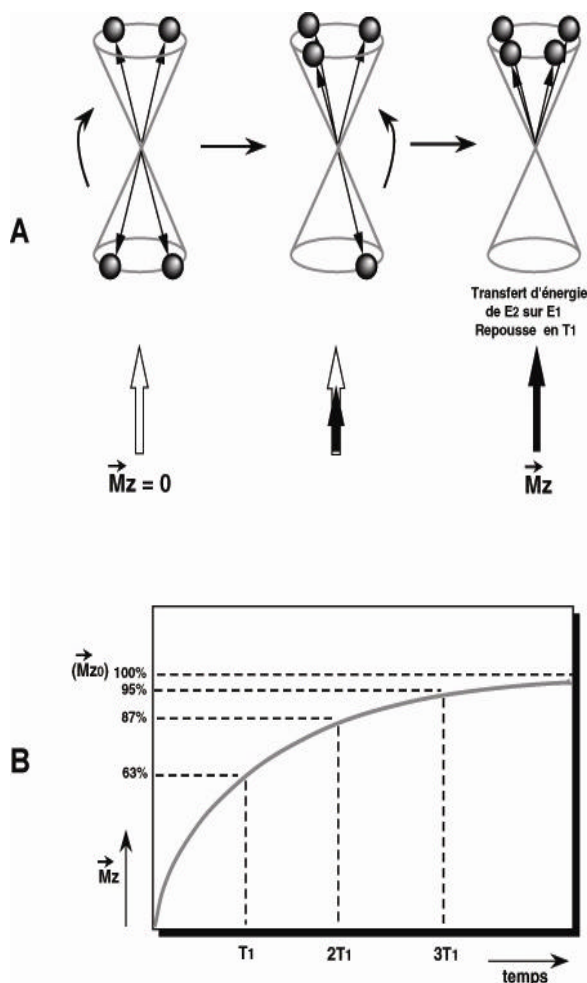


Figure 84 : A dès l'arrêt de l'impulsion RF, retour à l'état d'équilibre et transition du niveau E_2 (antiparallèle) au niveau E_1 (parallèle)

B Courbe exponentielle de repousse de l'aimantation longitudinale en fonction de T_1

Voici, à titre d'exemple, la valeur du T_1 de certains tissus dans un champ de 1 Tesla (en millisecondes) (Tableau 11).

Graisse	240 ms
Muscle	730 ms
Substance blanche	680 ms
Substance grise	809 ms

Tableau 11: Valeur du T_1 en fonction du tissu dans un champ de 1 Tesla

2. La relaxation transversale

A l'équilibre $\vec{M}_{xy} = 0$, après le basculement de 90 degrés, $\vec{M}_{xy} = M_0$. Le retour de \vec{M}_{xy} vers 0 est exponentiel $\vec{M}_{xy}(t) = \vec{M}_0 e^{-t/T_2}$ (Figure 85). Cette décroissance de la composante transversale se fait en général plus vite que ne le veut le simple retour à l'équilibre de la composante longitudinale. Elle est due au déphasage des spins, c'est-à-dire à la « dispersion » rapide des composantes transversales élémentaires dans différentes directions. Elle se caractérise par le temps de relaxation T_2 (encore appelé temps de relaxation "spin-spin"). T_2 est en réalité le temps pendant lequel l'intensité décroît de 63% de sa valeur initiale.

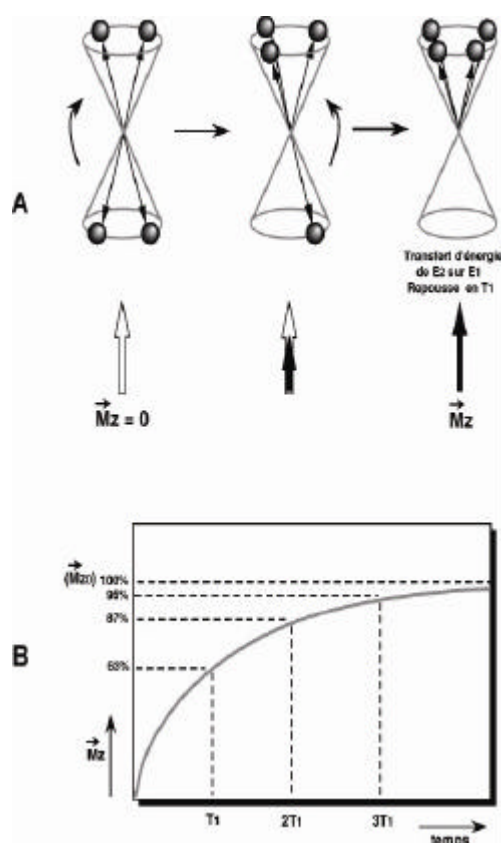


Figure 85: A dès l'arrêt de l'impulsion, déphasage des protons et décroissance de M_{xy}
 B courbe exponentielle de disparition de l'aimantation transversale en fonction du T_2

Ce temps de relaxation T_2 est toujours inférieur au temps de relaxation T_1 . Il dépend lui aussi de la mobilité des atomes ou des molécules sur lesquelles les protons sont engagés.

Ces temps de relaxation vont varier pour un tissu donné selon l'organisation physico-chimique de l'eau dans ce tissu, et c'est sur ces variations que l'on s'appuie pour détecter au sein d'un tissu les modifications liées à la présence d'une lésion. Voici quelques valeurs de T_2 dans un champ de 1 Tesla (Tableau 12).

Graisse	84 ms
Muscle	47 ms
Substance blanche	92 ms
Substance grise	101 ms

Tableau 12: Valeurs de T_2 en fonction du tissu dans un champ de 1 Tesla.

En résumé les temps de relaxation T_1 et T_2 des tissus dépendent de la mobilité des noyaux d'hydrogène présents dans ces tissus : ces temps de relaxation augmentent avec l'hydratation de ces tissus, ils diminuent lorsque cette hydratation diminue. C'est ce qui fait dire, très schématiquement, que lors d'une affection aiguë, la densité d'hydrogène, le T_1 et le T_2 , pour un tissu donné, varient dans le même sens. En effet un processus lésionnel aigu s'accompagne dans la plupart des cas de phénomènes inflammatoires et oedémateux qui ont pour résultat d'augmenter la quantité d'eau dans ces tissus. Dans un tissu cicatriciel par contre ce sera le contraire.

3. Contraste en T_1 , T_2 et densité protonique

Le contraste en IRM correspond à la traduction des signaux RMN en niveaux de gris (noir : signal faible, blanc : signal élevé). Ce contraste traduit les différences en temps de relaxation (qui peuvent aller jusqu'à 500%) et, dans une moindre mesure, les différences de densité protonique (0 à 15 %). Les trois facteurs T_1 , T_2 et la densité protonique interviennent toujours à des degrés divers. L'opérateur peut par le choix de la séquence d'écho de spin, favoriser l'un de ces facteurs dans la génération du signal, c'est-à-dire pondérer la séquence. Comme nous avons pu le voir précédemment, la séquence d'écho de spin comprend 2 impulsions RF qui vont se succéder au cours d'une même excitation : une impulsion sélective de RF à 90° (pour basculer l'aimantation dans le champ transverse) puis une impulsion à 180° (pour s'affranchir des déphasages constants induits par \vec{B}_0). Ce cycle élémentaire ne permet d'obtenir qu'une ligne de la matrice image ; pour obtenir les lignes suivantes, il va falloir répéter pour chaque ligne le cycle d'impulsion, un cycle « image » complet correspond à 128 ou 256 lignes.

Le temps de répétition T_R correspond au temps de passage entre 2 lignes soit l'intervalle séparant deux impulsions à 90° . Cet intervalle influence le résultat en T_1 , la repousse du signal longitudinal \vec{M}_z pouvant être incomplète si T_R inférieur à T_1 . Ainsi, si l'on prend deux tissus ayant des T_1 faiblement différents, le tissu R a un T_1 court (repousse rapide) et le tissu L a un T_1 long (repousse lente). Pour un T_R court, on aura donc un fort contraste en T_1 (R repoussant plus vite) et inversement pour un T_R long, on aura un contraste faible en T_1 (la repousse étant complète ou presque).

L'impulsion de 180° (appliquée au temps $t = T_E/2$) permet d'accéder à la décroissance en T_2 vrai et le signal est récolté lors de l'écho au temps T_E . Le temps T_E détermine donc le moment précis où le signal T_2 est mesuré, c'est-à-dire le temps pendant lequel on laisse décroître le signal en T_2 avant de le mesurer. Si on reprend donc deux tissus avec des T_2 différents mais insuffisants pour être séparés, le tissu R a un T_2 court (décroît rapidement) et le tissu L a un T_2 long (décroît lentement). Pour un T_E court, on obtiendra un contraste faible en T_2 car la différence de décroissance est faible ($Rq : T_E \ll T_R$), inversement, à T_E long, le contraste en T_2 sera fort dû à une augmentation de l'écart de signal entre les deux tissus.

Pour un contraste pondéré en T_1 , il faudra donc un T_R court pour favoriser le contraste en T_1 et un T_E court pour minimiser le contraste en T_2 .

Pour un contraste pondéré en T_2 , il faudra à l'inverse un T_R long pour minimiser le contraste en T_1 et un T_E long pour favoriser le contraste en T_2 .
Pour un contraste pondéré en densité protonique, on minimise T_1 et T_2 avec un T_R long et un T_E court.

ANNEXE III : la relaxivité

A. Principe de la relaxivité

Dans le cas A, la molécule d'eau se trouve dans la première sphère de coordination de l'ion métallique et s'échange avec l'eau du milieu. Le cas B regroupe les interactions par des liaisons de type hydrogène avec la seconde sphère de coordination. Ces interactions sont effectives si leur durée est longue comparée au temps de diffusion. Les mécanismes de la seconde sphère de coordination étant mal connus, on les différencie rarement de ceux schématisés dans le cas C. Ces interactions représentent les interactions avec la sphère externe obtenue par diffusion translatrice près des ions paramagnétiques.

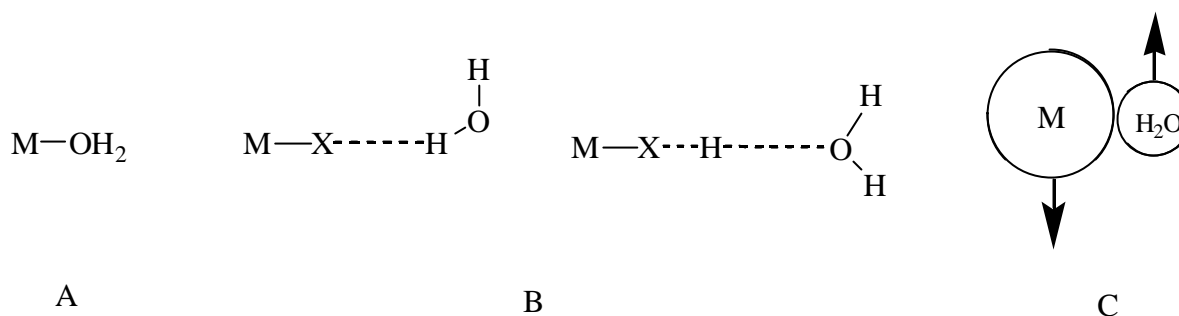


Figure 86 : différents types d'interactions métal-eau

L'augmentation de la vitesse de relaxation (relaxivité) des protons en présence d'ions paramagnétiques peut donc être divisée en deux contributions :

- la relaxivité de la sphère externe : due à des interactions à longue portée de l'ion métallique avec les protons de molécules d'eau libres. La diffusion des molécules d'eau au voisinage du complexe cause des fluctuations du champ magnétique local ressenti par les protons.
- la relaxivité de la sphère interne : due à des interactions à courte portée avec les protons de molécules d'eau directement coordonnées au métal et transféré dans le milieu avoisinant lorsque les molécules d'eau sont échangées

Pour les agents de contraste métalliques, la contribution dominante est en général la relaxivité de la sphère interne. L'explication théorique des phénomènes de relaxivité dans la sphère de coordination est donc donnée par l'équation suivante

$$(1/T_i)_p = (1/T_i)_{in} + (1/T_i)_{out} \quad i = 1,2 \quad (16)$$

Nous discuterons de ces 2 types de relaxivités.

B. Relaxivité interne : équations de Solomon-Bloembergen-Morgan

La contribution de sphère interne résulte de l'échange chimique d'une molécule d'eau entre la première sphère de coordination de l'ion paramagnétique et du solvant. D'après la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan²⁴⁸, elle dépend de plusieurs temps caractéristiques :

- T_1 et T_2 , les temps de relaxation électronique longitudinale et transversale.

²⁴⁸ N.Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, **1957**, 27, 572.

- Le temps de résidence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination du cation.
- Le temps de corrélation rotationnel τ_R

Plus il y aura de molécules d'eau coordonnées au métal et plus le temps de relaxation diminuera ce qui aura pour conséquence l'augmentation du signal. Les mécanismes d'échanges de molécules d'eau entre la première sphère de coordination de l'ion paramagnétique donnent lieu à une augmentation de la vitesse de relaxation du spin nucléaire observée $(1/T_1)_{\text{obs}}$ par rapport à la vitesse $(1/T_1)_d$ en l'absence d'agent paramagnétique et sont exprimés dans l'équation suivante :

$$1/T_{\text{in}} = 1/T_{\text{obs}} - 1/T_{1d} = [\text{Gd}^{3+}] \cdot R_{1is} = [\text{Gd}^{3+}] \cdot q / (55,6 \cdot 10^3) \cdot 1/(T_{1M} + t_m) \quad (17)$$

R_{1is} étant la relaxivité longitudinale de sphère interne, q étant le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal, T_{1M} étant le temps de relaxation longitudinale des protons en première sphère de coordination et t_m le temps de résidence d'une molécule d'eau dans cette même sphère (t_m est l'inverse de la constante de vitesse d'échange k_{ex}).

Ainsi, si le temps de résidence des molécules d'eau en première sphère est plus long que le temps de relaxation des protons, la relaxivité est limitée par suite de manque d'efficacité du transfert. Le temps de relaxation dépend alors lui-même d'autres paramètres qui ont été décrits dans les équations de Solomon-Bloembergen. La contribution dominante pour les protons de l'eau en sphère interne est celle des interactions dipôle-dipôle qui dépend des rapports gyromagnétiques ? des spins nucléaires et électroniques, de leur distance r et de la fréquence angulaire de Larmor ? (équation ci-dessous) :

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \left(\frac{m_0}{4p} \right)^2 \frac{\hbar g_s^2 g_l^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \left[\frac{3t_{d1}}{1 + w_l^2 t_{d1}^2} + \frac{7t_{d2}}{1 + w_s^2 t_{d2}^2} \right] \quad (18)$$

I correspond ici au spin nucléaire du proton et S au spin électronique de Gd^{3+} . Les deux temps de corrélation dipolaires t_{d1} et t_{d2} sont reliés aux vitesses de relaxation électronique longitudinale et transverse par l'équation

$$\frac{1}{t_{di}} = \frac{1}{t_m} + \frac{1}{t_R} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (19)$$

Les équations fixent alors les bornes pour une valeur idéale de vitesse d'échange :

$$\frac{1}{T_{1m}} < k_{ex} < \frac{1}{t_R}, \frac{1}{T_{1,2e}} \quad (20)$$

En résumé, le transfert devra être assez rapide pour transférer efficacement la relaxation au milieu ambiant mais ne devra pas être plus rapide que l'interaction dipôle-dipôle.

C. Relaxation externe

La contribution de sphère externe est moins importante que celle de sphère interne. Cependant, l'utilisation en IRM de ligands multidentates pour assurer la stabilité des complexes *in vivo*, réduit le nombre de molécules d'eau coordonnées, donc la contribution par sphère interne. La relaxation par sphère externe n'est alors plus négligeable.

Elle est la conséquence des interactions à longue portée avec les protons de molécules d'eau libres ; la diffusion des molécules d'eau au voisinage du complexe cause des fluctuations du champ magnétique locale ressenti par les protons. Elle dépend de plusieurs paramètres. Parmi eux :

- le coefficient de diffusion des protons de l'eau par rapport au centre paramagnétique
- le temps caractéristique de diffusion
- la distance d'approche des protons.

La relaxivité de la sphère externe est généralement décrite par le modèle de Freed,²⁴⁹ qui explicite la relaxation des protons de l'eau due à la fluctuation de l'interaction dipolaire avec les électrons, modulée par la diffusion des molécules d'eau à proximité du centre paramagnétique.

$$\left[\frac{1}{T_1} \right]_{out} = \frac{C_p N_s g_s^2 \hbar^2 S(S+1)}{d^3 t_D} [7I(\mathbf{w}_s \mathbf{t}_D T_{1e}) + 3I(\mathbf{w}_r \mathbf{t}_D T_{1e})] \quad (21)$$

N_s étant le nombre d'ions métalliques par cm^3 , de la distance minimale d'approche de l'eau du métal et t_D le temps de diffusion par translation. Les interactions dipôle-dipôle sont fonction des rapports gyromagnétiques des spins nucléaires γ_I et électronique γ_S , ainsi que de leurs fréquences angulaires de résonance ω_I et ω_S au champ magnétique considéré.

Ce temps de diffusion est relié aux coefficients de diffusion relatif de l'eau et du complexe métallique (respectivement D_I et D_S).

$$t_D = \frac{d^2}{3(D_I + D_S)} \quad (22)$$

Ce modèle suppose une distribution uniforme et une diffusion sans force des molécules d'eau autour du complexe ce qui est une affirmation fautive surtout si l'on considère un complexe chargé ; cette approximation permet cependant d'arriver à une équation analytique de la relaxivité de la sphère externe.

²⁴⁹ J.H. Freed, *Spin Labeling. Theory and Applications*, 1976, 1, 53-132, New York, Academic Press

ANNEXE IV : Les caractéristiques des complexes du gadolinium

A. Introduction

Le principe de ces agents de contraste est de modifier localement les paramètres intrinsèques des tissus là où ils iront se fixer préférentiellement. Ces produits doivent bien sûr être non toxiques, efficaces en concentration faible et si possible posséder une certaine spécificité au moins compartimentale, si ce n'est tissulaire. Le principal enjeu pour ces produits de contraste est de pouvoir allier l'efficacité (propriétés paramagnétiques) de l'ion gadolinium, la spécificité de son action sur les molécules d'eau, tout en assurant la sécurité du patient. Cette méthode permet d'augmenter la stabilité du complexe mais également limite les échanges par sphère interne et donc l'intensité des signaux. Le choix de propriétés physico-chimiques appropriées permet de réduire la toxicité des complexes et d'optimiser leur efficacité.

B. Stabilité des complexes

Les complexes du Gd doivent être stables : l'absence de dissociation des complexes est essentielle pour éviter par relargage, l'apparition de ligand ou de Gd libre dans l'organisme.

Le type du chélate conditionne la stabilité du complexe. Elle est dans tous les cas élevée et elle s'exprime par une constante d'affinité K, d'autant plus élevée que la dissociation est faible (ex : Gd-DTPA $10^{22,5}$, Gd-DOTA 10^{28}). Cette stabilité peut également être appréciée par la cinétique de décomplexation de l'ion gadolinium ou les possibilités d'échanges avec d'autres ions endogènes. Pour les produits d'IRM, les réactions d'intolérance liées à une dissociation du complexe apparaissent d'autant moins que l'inertie cinétique est grande. Elles sont de même type que celles notées lors des injections de produits de contraste iodés, mais restent toutefois plus rares et sont généralement plus minimes.

La dissociation des complexes ou leur stabilité est fonction de différents paramètres :

- La constante de stabilité thermodynamique K :

On constate que la constante de stabilité des complexes macrocycliques du Gd est supérieure à celle des complexes linéaires.

- La demi-vie de décomplexation (inertie cinétique) :

L'important est de définir si le complexe est susceptible de se dissocier pendant le temps où il est présent dans l'organisme. Cette notion de cinétique peut être évaluée par la demi-vie de décomplexation à un certain pH. Cette demi-vie est extrêmement longue pour des complexes macrocycliques du Gd (de l'ordre de la vingtaine d'années) alors qu'elle n'est que de quelques heures pour un complexe linéaire.

- La sélectivité des ligands pour l'ion Gd :

Ce paramètre exprime la capacité de l'ion métallique complexé à être échangé avec un ion métallique endogène (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} ...) indépendamment des contraintes du temps.

La manière la plus commune d'augmenter la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique d'un complexe est d'employer un ligand polydentate. Un ligand polydentate est construit à partir de donneurs de liaisons.

C. Affinité du ligand avec le Gd : sites de liaison

En général, ces ligands possèdent une affinité élevée vers les grands cations comme le Gd^{3+} . Ce cation métallique est complexé sous la forme d'un chélate, par une liaison qui n'est donc

pas covalente. Cet ion a besoin de sept voire huit atomes donneurs pour accomplir la sphère de coordination et former un complexe stable et non toxique. En effet, enfermé dans la sphère de coordination, Gd^{3+} , cation toxique, ne s'exprime que par son effet paramagnétique. Pour augmenter la relaxation du proton de l'eau et donc sa stabilité, le gadolinium laisse également, au moins un emplacement ouvert pour l'échange d'un ligand d'eau. Les sites d'approche du Gd^{3+} permettent la formation de deux structures différentes : le prisme trigonal et le prisme à base carrée.

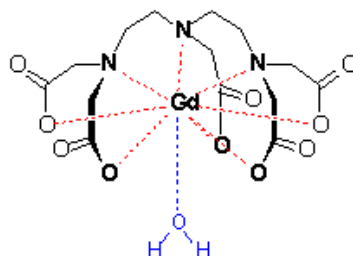


Figure 87 : complexe DTPA[Gd]

La géométrie réelle de coordination est entre ces deux modèles. En effet, les atomes d'azote donneurs préféreront occuper les positions couvrantes du Gd^{3+} plutôt qu'un coin prismatique (et ainsi former un prisme trigonal). Mais il n'est pas possible que chacun des trois ou quatre donneurs occupent ces positions couvrantes ; l'atome central d'azote pour les ligands linéaires et certains atomes d'azote pour les ligands macrocycliques, tendent donc à occuper un coin prismatique. Il y a alors une légère déformation. Les ligands linéaires ne sont pas assez grands pour envelopper complètement l'ion métal. Les emplacements restants de coordination sont alors occupés par des molécules d'eau. Avec les ligands macrocycliques de huit ou neuf atomes donneurs, le Gd possède une meilleure affinité qu'avec les ligands linéaires.

D. Géométrie et flexibilité

Lorsque le ligand est libre (non complexé), il arrive qu'il se préorganise, c'est-à-dire qu'il adopte un arrangement spatial préférentiel des unités de liaisons appelé cadre de ligand (Figure 88). Le cadre de ligand réduit la liberté de mouvement des atomes donneurs donc le nombre d'isomères conformationnels du ligand. Le ligand est alors peu flexible et la perte d'entropie en formant le complexe est moindre. Le complexe possède donc une plus grande stabilité thermodynamique et une inertie cinétique plus élevée.

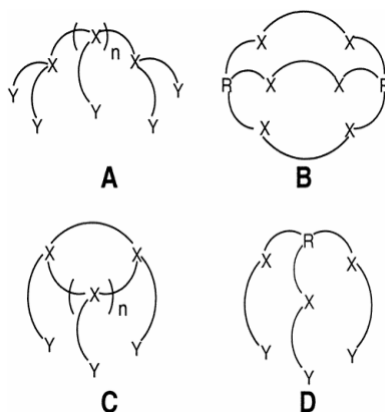


Figure 88 : Cadres de Ligand pour des ligands polydentates. X et Y représentent des hétéroatomes incorporés au ligand.

Mais les ligands utilisés couramment contiennent des atomes d'azote (groupes aminocarboxylates). Ceux-ci s'inversent facilement et donnent lieu à différents isomères (Figure 89).

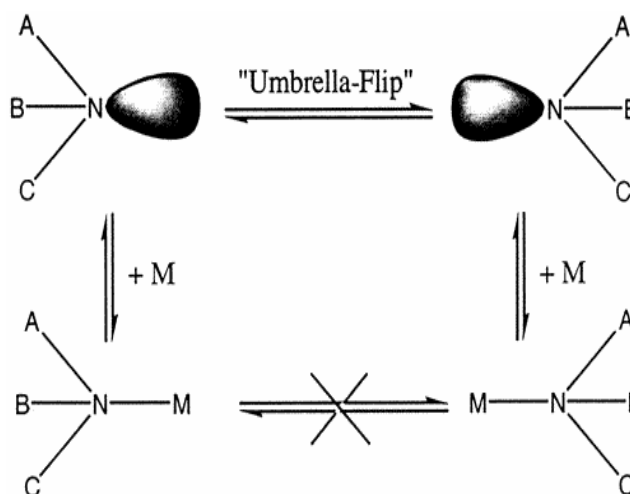


Figure 89 : Inversion à l'Amine-Azote coordonné et non coordonné.

Cependant, une fois que ces atomes d'azote donneurs sont liés à l'ion métallique Gd^{3+} , l'inversion devient plus difficile car elle implique la dissociation du lien de coordination. En général, ce phénomène de dissociation a lieu à des températures élevées.

E. Affinité du complexe avec l'organisme (spécificité)

Ces complexes sont des traceurs de l'espace extracellulaire, hydrophiles par leur fonction carboxylate, ne se liant donc pas aux protéines, ils ne passent pas la barrière hémato-encéphalique saine. Peu résorbés par voie orale, ils se distribuent rapidement dans l'eau extracellulaire de l'organisme sans organe cible. Ces traceurs des espaces extracellulaires sont ensuite excrétés rapidement dans l'urine sous forme inchangée (demi-vie de l'ordre de 80 à 100 minutes).

La pharmacocinétique du complexe est aussi déterminée par la structure géométrique de la molécule. En effet, la réduction de la distance entre les molécules d'eau et la substance paramagnétique augmentera le temps de résidence de l'eau, la relaxation de ses protons et le contraste de l'image. C'est pour cette raison que l'on préférera un ligand de structure symétrique et formant une enveloppe fine.

Les chélates actuellement commercialisés s'intègrent dans les produits suivants : Gd-DTPA (linéaire ionique), Gd-DOTA (macrocyclique ionique), DTPA-BMA-Gd (linéaire non-ionique), Gd-HP-DO3A (macrocyclique non-ionique).

Ces produits n'ont pas de spécificité d'organe particulière. Ils ont une pharmacocinétique avec une élimination rénale rapide (demi-vie de l'ordre de 80 à 100 minutes) et sont des traceurs des espaces extracellulaires.

Les doses préconisées sont de 0,1 mM/kg ou encore 0,2 mL/kg d'une solution 0,5 M. Des doses deux à trois fois plus élevées sont couramment utilisées sans risque.

Les réactions d'intolérance observées n'apparaissent pas liées à une dissociation du complexe mais restent toutefois plus rares et sont généralement plus minimes. Bien que ces produits, soient hyperosmolaires (Gd-DTPA: 1960 mOsm/k, Gd-DOTA 1170 mOsm/k), les volumes injectés sont, du fait de la plus grande efficacité de ces produits, beaucoup plus faibles et les réactions liées à l'osmolalité beaucoup plus limitées.

ANNEXE V : synthèse de nanoparticules par la voie citrate

L'élaboration des différentes méthodes de synthèse or/citrate a nécessité, dans un premier temps, des mises aux points des modes opératoires à partir de ceux décrits dans la littérature. Ces travaux ont été réalisés par mes prédécesseurs (T.Clerc, C. Hilleriteau), sur les synthèses par voie citrate et citrate/acide tannique. De la même façon, de nombreuses manipulations « de tâtonnement » ont été nécessaires avant d'aboutir à un mode opératoire permettant l'obtention de nanoparticules de taille contrôlée par la méthode de Brust en présence de DTDTPA.

A. Synthèse de nanoparticules par la voie citrate

1. Problématique

Afin de synthétiser des nanoparticules d'or nues, nous nous sommes appuyés sur la réaction suivante, connue depuis fort longtemps^{250 73}

La présence de citrate de sodium a alors une double utilité : elle permet la réduction de Au^{III} en Au⁰ et elle stabilise les nanoparticules en s'adsorbant à leur surface. Cette réaction, bien que très répandue, reste complexe dans la mesure où de nombreux facteurs peuvent modifier de façon appréciable son déroulement. Afin de mieux comprendre l'influence de chacun de ces facteurs et d'optimiser ceux-ci pour les applications qui nous intéressent nous avons eu recours à la chimométrie. Pour ce faire, il est nécessaire de définir les facteurs expérimentaux dont on veut évaluer les effets, les variables de réponse étudiées ainsi que le domaine d'intérêt.

2. Facteurs expérimentaux, réponses et domaine d'intérêt

Nous avons effectué notre étude sur un volume de solution de 30 mL d'eau ultra pure, en faisant varier les facteurs expérimentaux suivants :

- U₁ : concentration en HAuCl₄.
- U₂ : concentration en Na₃citrate.
- U₃ : température T de l'expérience.

Nous avons alors étudié en fonction des valeurs des facteurs expérimentaux les réponses suivantes :

- Y₁ : cinétique de disparition du complexe d'or.
- Y₂ : longueur d'onde λ_{max}. d'absorption maximale.
- Y₃ : cinétique de croissance des nanoparticules d'or.
- Y₄ : taille moyenne des nanoparticules.
- Y₅ : résistance des nanoparticules à l'aggrégation.
- Y₆ : rendement de la réaction.

Pour étudier ces réponses, nous avons défini le domaine de variation des facteurs expérimentaux, appelé domaine d'étude, en centrant ce domaine sur les conditions décrites dans la littérature²⁵⁰ et en nous assurant que l'étude de la cinétique soit toujours possible.

²⁵⁰ K. Grabar, R.Freeman, M.Natan, *Anal. Chem.*, **1995**, 67,735.

Nous avons ainsi fait varier les facteurs expérimentaux de la façon suivante :

$$U_1 \text{ entre } 6,3 \text{ et } 19,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$U_2 \text{ entre } 2,67 \text{ et } 8,0 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$U_3 \text{ entre } 20 \text{ et } 60 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Ces bornes nous permettent de définir les conditions au centre du domaine :

$$U_1^\circ = (U_{1\max} + U_{1\min})/2 = 12,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$U_2^\circ = (U_{2\max} + U_{2\min})/2 = 5,3 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$U_3^\circ = (U_{3\max} + U_{3\min})/2 = 40^\circ \text{ C}$$

Afin de pouvoir comparer directement les effets des facteurs expérimentaux, il est nécessaire de transformer ces derniers en variables codées, nombres sans dimension compris entre -1 et 1 et dont les effets sont directement comparables :

$$X_1 = (U_1 - U_1^\circ)/(U_{1\max} - U_{1\min}) \text{ associé à la concentration en HAuCl}_4$$

$$X_2 = (U_2 - U_2^\circ)/(U_{2\max} - U_{2\min}) \text{ associé à la concentration en Na}_3\text{citrate}$$

$$X_3 = (U_3 - U_3^\circ)/(U_{3\max} - U_{3\min}) \text{ associé à la température}$$

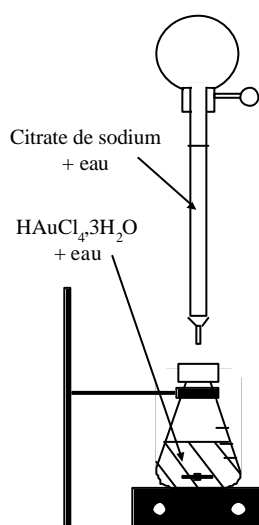
3. Etude détaillée d'une expérience

Afin de bien comprendre le déroulement de ces expériences, nous allons détailler le cas d'une expérience particulière correspondant à un point au centre du domaine d'étude .

a) Mode opératoire

Nous dissolvons 15,0 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 25 mL d'eau ultra pure contenue dans un erlenmeyer de 50 mL, puis nous ajustons la température à 40°C à l'aide d'un thermocouple . Nous dissolvons 41,3 mg de $\text{Na}_3\text{citrate}$ dans 5 mL d'eau ultra pure, et à l'instant $t = 0$ minute correspondant au début de la réaction nous ajoutons cette solution à celle contenue dans l'erlenmeyer.

Nous laissons alors la réaction se dérouler sous agitation modérée, en contrôlant son avancée régulièrement par spectroscopie U.V.-visible.



b) Résultats expérimentaux

La solution initialement jaune devient progressivement incolore avant de s'assombrir totalement, puis enfin de virer progressivement au rouge-violet. Ces changements de couleur s'accompagnent de modifications significatives des spectres U.V.-visibles qui nous permettent de comprendre les changements de couleur comme le montre la figure suivante:

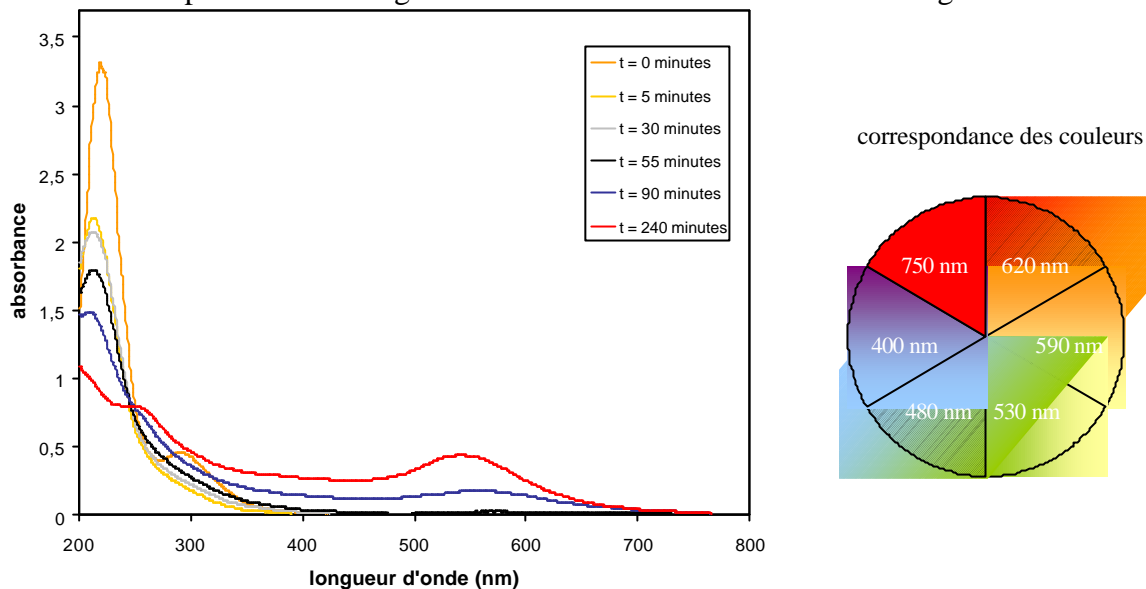
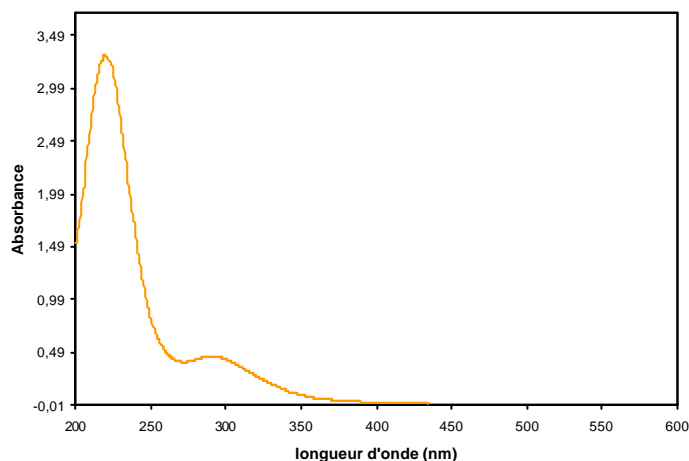


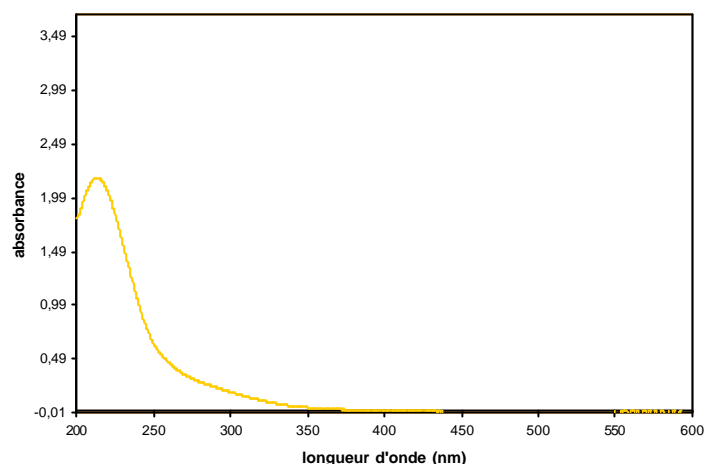
Figure 90 : évolution des spectres UV-visible au cours du temps et correspondance des couleurs

La bande d'absorption très large vers 290 nm responsable de la coloration jaune disparaît d'abord progressivement, traduisant la disparition du complexe d'or. On détermine alors le temps t_1 traduisant la réponse Y_1 au bout duquel la quasi totalité du complexe d'or a disparu. Pour cette expérience $Y_1=7$ minutes.

A l'instant initial

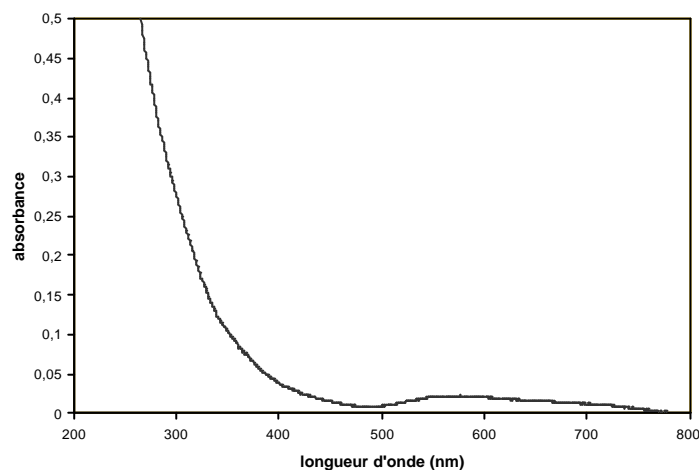


Après 5 minutes



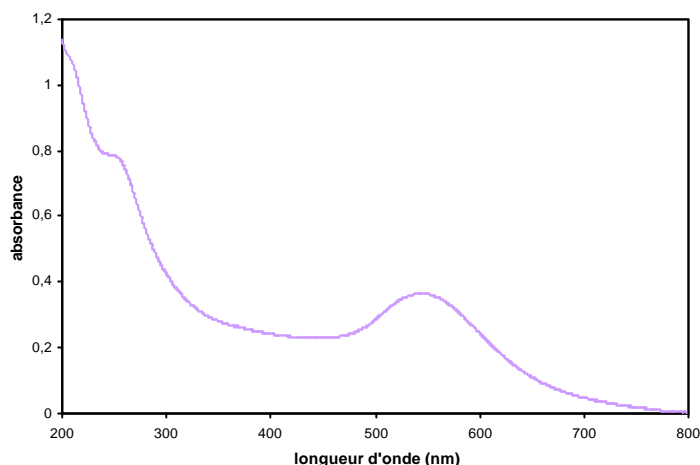
Puis une bande très large située dans le domaine visible émerge très lentement, se traduisant par la coloration noire de la solution.

Après 55 minutes

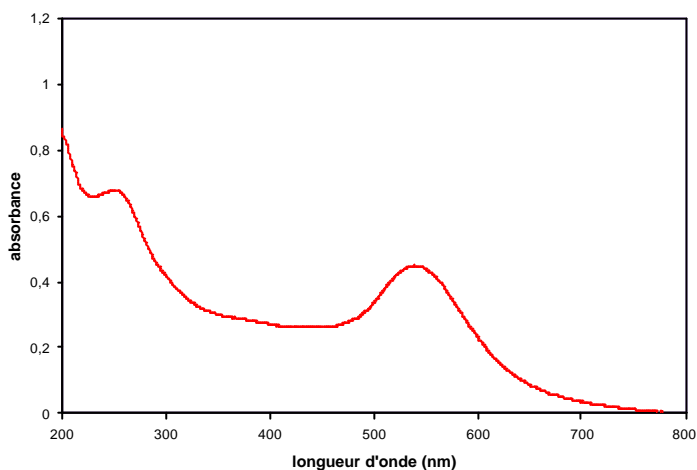


Enfin, cette bande large s'affine lentement, traduisant la croissance des nanoparticules d'or, pour se centrer sur 539 nm, ce qui correspond bien à la coloration rouge de la solution finale. Cette longueur d'onde correspond au λ_{max} d'absorption, c'est à dire à la réponse Y_2 . Pour cette expérience $l_{\text{max}} = Y_2 = 535 \text{ nm}$. Nous avons choisi de faire intervenir le temps t_2 pour lequel la largeur à mi-hauteur de cette bande visible est inférieure à 100 nm pour évaluer la cinétique de croissance des nanoparticules d'or, soit la réponse Y_3 . Pour cette expérience $Y_3 = t_2 = 120 \text{ minutes}$. Les spectres n'évoluent alors plus de façon significative sur plusieurs semaines. La réaction est alors terminée.

Après 160 minutes



Après 340 minutes



Le diamètre moyen des nanoparticules finales est alors déterminé grâce à un cliché de MET. On obtient pour cette expérience $Y_4 = 22 \text{ nm}$.

Afin d'évaluer la résistance des nanoparticules à l'aggrégation, nous concentrons les échantillons finaux à l'évaporateur rotatif. Pour une certaine concentration de nanoparticules les échantillons s'agrègent de façon irréversible. Cette concentration notée c_{\max} traduit la réponse Y_5 . Pour cette expérience nous avons obtenu $Y_5 = 2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$. Enfin, pour déterminer le rendement de la réaction, nous lavons les échantillons agrégés à l'eau et les séchons. La masse de solide récupéré permet d'estimer le rendement. Pour cette expérience nous trouvons $Y_6 = 0,92$.

4. Criblage des facteurs, matrices d'Hadamard

a) Théorie

Le criblage des facteurs consiste à déterminer quels sont parmi les facteurs expérimentaux ceux qui ont une réelle influence sur les variables de réponse. La construction de matrices d'expérimentation spéciales baptisées matrices d'Hadamard permet d'effectuer ce criblage

avec le maximum de précision pour le minimum d'expériences. Ainsi dans le cas de trois facteurs expérimentaux il est possible de déterminer leur influence à partir d'uniquement 4 expériences. La matrice d'expérimentation alors utilisée est une matrice d'Hadamard de taille 4 (H_4) qui a l'allure suivante :

Facteur X_1	Facteur X_2	Facteur X_3	
+1	+1	-1	Expérience 1
-1	+1	+1	Expérience 2
+1	-1	+1	Expérience 3
-1	-1	-1	Expérience 4

b) Résultats expérimentaux

Nous obtenons pour ces 4 expériences les résultats suivants :

Réponse Y_1 (minutes)	Réponse Y_2 (nm)	Réponse Y_3 (minutes)	Réponse Y_4 (nm)	Réponse Y_5 (mmol.L ⁻¹)	Réponse Y_6	
$Y_{11}= 8$	$Y_{21}= 535$	$Y_{31}= 110$	$Y_{41}= 23$	$Y_{51}= 2,7$	$Y_{61}= 0,8$	Expérience 1
$Y_{12}= 4$	$Y_{22}= 520$	$Y_{32}= 55$	$Y_{42}= 15$	$Y_{52}= 3,5$	$Y_{62}= 0,7$	Expérience 2
$Y_{13}= 2$	$Y_{23}= 523$	$Y_{33}= 11$	$Y_{43}= 17$	$Y_{53}= 3,2$	$Y_{63}= 0,9$	Expérience 3
$Y_{14}= 17$	$Y_{24}= 536$	$Y_{34}= 400$	$Y_{44}= 24$	$Y_{54}= 2,5$	$Y_{64}= 0,8$	Expérience 4

En supposant pour chaque réponse un modèle simpliste du premier degré de la forme $Y_i = b^i_0 + b^i_1 X_1 + b^i_2 X_2 + b^i_3 X_3$ nous pouvons alors déterminer pour chaque réponse les influences des différents facteurs expérimentaux en calculant les valeurs des coefficients b^i_j de la façon suivante :

- b^i_0 = valeur moyenne de la réponse $Y_i = (Y_{i1} + Y_{i2} + Y_{i3} + Y_{i4})/4$.
- b^i_1 = effet du facteur X_1 sur la réponse $Y_i = (Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} - Y_{i4})/4$.
- b^i_2 = effet du facteur X_2 sur la réponse $Y_i = (Y_{i1} + Y_{i2} - Y_{i3} - Y_{i4})/4$.
- b^i_3 = effet du facteur X_3 sur la réponse $Y_i = (-Y_{i1} + Y_{i2} + Y_{i3} - Y_{i4})/4$.

On obtient tous calculs faits les valeurs suivantes :

Réponse Y_1 (cinétique)	Réponse Y_2 ($\lambda_{max.}$)	Réponse Y_3 (cinétique)	Réponse Y_4 (taille)	Réponse Y_5 (agrégation)	Réponse Y_6 (rendement)	
$b^1_0 = 8$	$b^2_0 = 528,5$	$b^3_0 = 144$	$b^4_0 = 19,75$	$b^5_0 = 3$	$b^6_0 = 0,8$	Valeur moyenne
$b^1_1 = -2,75$	$b^2_1 = 0,5$	$b^3_1 = -83,5$	$b^4_1 = 0,25$	$b^5_1 = -0,025$	$b^6_1 = 0,05$	Effet du facteur X_1 (HAuCl₄)
$b^1_2 = -1,75$	$b^2_2 = -1$	$b^3_2 = -61,5$	$b^4_2 = -0,75$	$b^5_2 = 0,125$	$b^6_2 = 0,05$	Effet du facteur X_2 (citrate)
$b^1_3 = -4,75$	$b^2_3 = -7$	$b^3_3 = -111$	$b^4_3 = -3,75$	$b^5_3 = 0,375$	$b^6_3 = 0$	Effet du facteur X_3 (température)

c) Interprétation

Le rendement de la réaction (Y_6) reste toujours très élevé quelles que soient les conditions expérimentales. Nous pouvons supposer en première approximation qu'il est voisin de 100 % et indépendant des différents facteurs expérimentaux.

Les cinétiques de réaction, aussi bien de décomposition du complexe d'or (Y_1) que de croissance des nanoparticules (Y_2) dépendent énormément de la température mais aussi des concentrations en citrate et en complexe d'or:

- Plus la température est importante plus les cinétiques sont rapides.
- Plus les concentrations en complexe d'or et en citrate sont importantes plus les cinétiques sont rapides.

Ces variations sont conformes à celles observées pour la cinétique d'une réaction suivant la loi de Van't Hoff.

Les longueurs d'onde d'absorption maximale (Y_2) et la taille des nanoparticules (Y_4) vraisemblablement corrélées dépendent aussi beaucoup de la température, et un peu de la quantité de citrate et de complexe d'or :

- La taille des nanoparticules et la longueur d'onde d'absorption maximale diminuent fortement avec la température et faiblement avec la concentration en citrate.²⁵⁰
- La taille des nanoparticules et la longueur d'onde d'absorption maximale augmentent très faiblement avec la concentration d'or.

La résistance à l'agrégation semble suivre évoluer de la même façon que la taille des particules ou la longueur d'onde d'absorption maximale et pourrait donc y être corrélé. On peut en effet raisonnablement penser que plus les nanoparticules seront petites plus la résistance à l'agrégation sera importante. Ces derniers résultats ne sont cependant pas totalement sûrs étant donné la grande incertitude demeurant sur la mesure des concentrations critiques d'agrégation.

Pour poursuivre un peu plus cette étude il faudrait étudier la possibilité d'interactions entre les différents facteurs expérimentaux et pour cela faire intervenir de nouvelles matrices appelées matrices factorielles. Ainsi pour étudier toutes les interactions possibles entre les trois facteurs expérimentaux il faudrait avoir recours à une matrice factorielle 2^3 et faire alors 4 expériences supplémentaires.

Il faudrait enfin pour pouvoir construire un modèle réellement prédictif du second degré construire des surfaces de réponse. Pour cela on pourrait par exemple avoir recours une matrice composite centrée, ce qui entraînerait pour l'étude complète des trois facteurs encore au minimum 11 expériences supplémentaires.

5. Conditions opératoires finalement retenues

La température étant un facteur particulièrement influent nous avons intérêt pour obtenir des résultats reproductibles à travailler à température constante. Etant donné d'autre part que nous souhaitons obtenir rapidement des nanoparticules de taille relativement faible nous avons intérêt vu les résultats de chimométrie à travailler à haute température. Nous avons donc effectué la réaction de synthèse des nanoparticules d'or nues à la température constante de 100°C c'est à dire au reflux de l'eau.

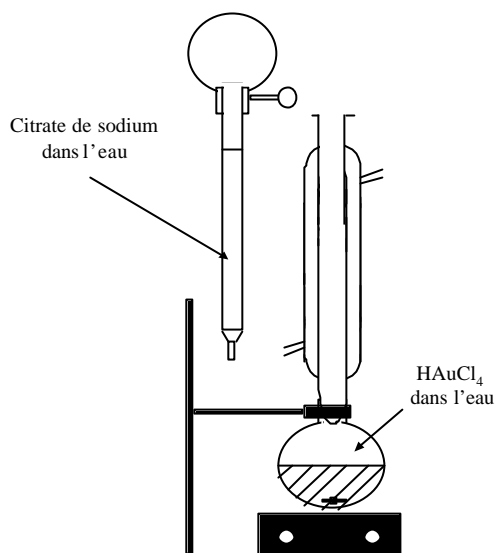
Les concentrations en complexe d'or et en citrate de sodium ayant également une certaine influence nous les avons fixé définitivement à des valeurs correspondant à un point assez proche du centre du domaine d'intérêt des expériences de chimométrie.

Nous avons donc finalement retenu le protocole expérimental suivant pour effectuer les synthèses de nanoparticules d'or nues :

Nous dissolvons 115,0 mg (0,29 mmol) de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 200 mL d'eau ultra pure contenue dans un ballon monocol de 250 mL muni d'un réfrigérant à eau, puis nous portons le mélange à reflux .

Nous dissolvons 266,0 mg de $\text{Na}_3\text{citrate}$ (1,03 mmol) dans 10 mL d'eau ultra pure et ajoutons cette solution à celle contenue dans le ballon.

Nous laissons alors la réaction se dérouler pendant une demi heure sous agitation modérée. La solution initialement jaune vire en quelques secondes au bleu noir puis au rouge violet, témoignant de cinétiques très rapides



Le produit formé a été caractérisé en TEM, révélant la présence de nanoparticules relativement monodisperses dont le diamètre moyen est de 15 nm.

De plus, les nanoparticules sont de nouveau cristallisées comme en témoigne le cliché de diffraction électronique présenté ci-dessous.

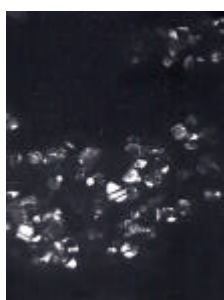
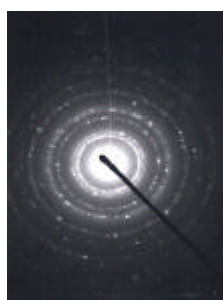
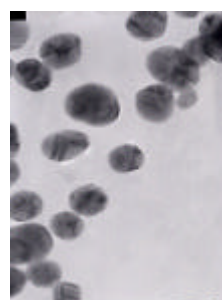


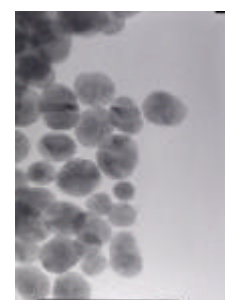
Photo de champ noir



Diffraction électronique



Faible concentration de nanoparticules grossies
590000 fois



Forte concentration de nanoparticules grossies
590000 fois

Figure 91: clichés MET des nanoparticules d'or nues.

D'autre part le spectre UV-visible de la solution présente une bande d'absorption centrée sur 526 nm caractéristique des nanoparticules d'or nues de petite taille.

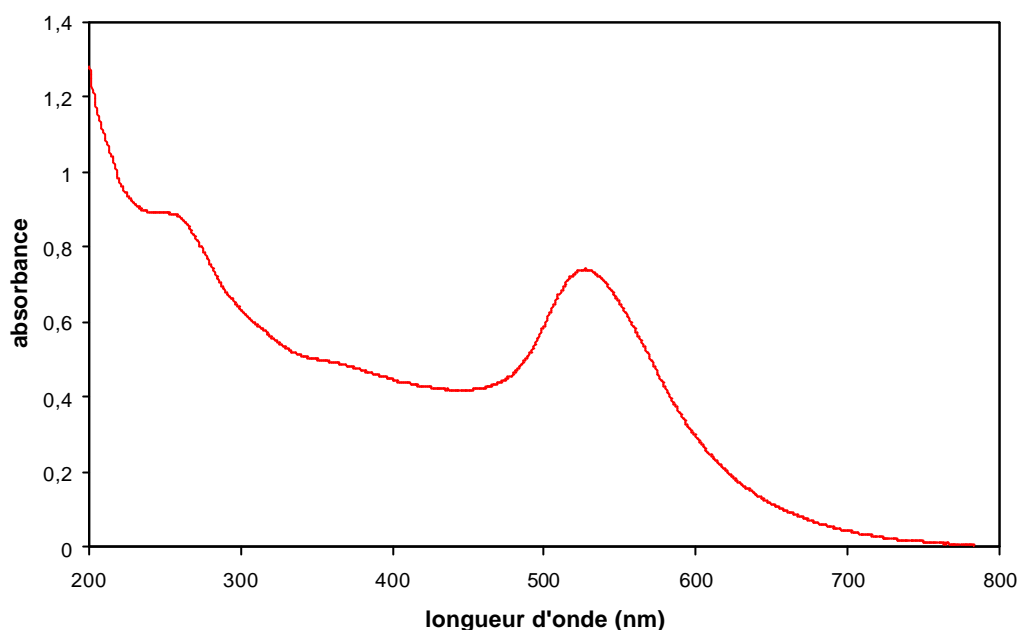


Figure 92: spectre UV-visible des nanoparticules d'or nues.

Il s'avère néanmoins impossible de sécher les solutions de nanoparticules sans les agréger irrémédiablement, même par lyophilisation, ce qui constitue l'inconvénient majeur de cette stratégie de synthèse.

Le mélange en solution aqueuse de citrate de sodium et de tétrachloroaurate (HAuCl_4) conduit à la formation de nanoparticules d'or nues dispersées dans l'eau. Le recours à la chimométrie permet de suivre les différentes étapes de cette réaction et de déterminer quels facteurs influencent le plus son déroulement.


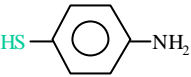
Pour effectuer ces synthèses nous avons finalement retenu des conditions opératoires conduisant à la formation de nanoparticules relativement monodispersées dans l'eau d'un diamètre moyen de 15 nm.

B. Greffage de dérivés thiolés

1. Différents dérivés

L'avantage de cette stratégie de synthèse est qu'il est normalement possible de greffer à la surface des nanoparticules nues de nombreux dérivés thiolés différents. Nous avons alors étudié le greffage de toute une série de dérivés thiolés aux fonctionnalités différentes, certaines favorisant la dispersion (groupements polaires) et d'autres présentant une réactivité intéressante (groupements phénoliques ou aminés).

Les dérivés thiolés finalement retenus sont les suivants :

4-hydroxythiophénol (4-mercaptophénol)	
4-aminothiophénol (4-mercaptoaniline)	
Acide thiomaléïque	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \underset{\text{SH}}{\text{CH}} - \text{COOH}$
2-mercaptoéthanesulfonate de sodium	$\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3^-, \text{Na}^+$
6-mercaptohexan-1-ol	$\text{HS} - (\text{CH}_2)_6 - \text{OH}$
L-cystine	$\begin{array}{c} \text{HOOC} & & \text{COOH} \\ & & \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH} - \text{NH}_2 \end{array}$

2. Mode opératoire

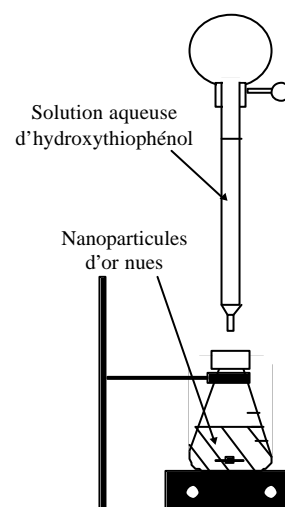
Pour effectuer ces réactions de greffage nous avons tout d'abord essayé d'ajouter à une solution de nanoparticules d'or nues des molécules de 4-hydroxythiophénol ou de 4-aminothiophénol en large excès espérant ainsi greffer à la surface des nanoparticules une couche de dérivés thiolés. Tous nos essais se sont alors soldés par des demi-échecs : les nanoparticules s'agrégeaient irrémédiablement quel que soit le pH en quelques minutes formant d'énormes particules noires visibles à l'œil nu impossibles à redisperser, la solution devenant incolore. Mais l'analyse de cette solution incolore en MET révélait tout de même la présence de quelques nanoparticules de 15 nm relativement agrégées recouvertes d'une couche de thiol.

Devant ce demi-échec nous n'avons pas persévéré dans cette méthode de greffage, préférant ajouter très progressivement les dérivés thiolés à la solution de nanoparticules d'or nues. Voici à titre d'exemple le mode opératoire retenu pour greffer le 4-hydroxythiophénol :

Nous préparons tout d'abord une solution aqueuse très diluée ($5,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) de 4-hydroxythiophénol. Pour cela nous dissolvons 17,3 mg d'hydroxythiophénol dans 1 mL de méthanol et complétons avec de l'eau ultra pure jusqu'à 50 mL et nous diluons encore cette solution 50 fois.

Nous plaçons dans un erlenmeyer 30 mL de solution de nanoparticules d'or nues ($1,23 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$ de sites d'or accessibles) et y ajoutons sous agitation 1 mL de la solution diluée d'hydroxythiophénol toutes les demi-heures.

Nous surveillons alors régulièrement l'évolution de la solution, à la fois visuellement et par spectroscopie UV-visible.



Nous avons procédé exactement de la même façon avec les autres dérivés thiolés (mis à part pour la L-cystine où nous avons rajouté de l'acide chlorhydrique jusqu'à $\text{pH} = 2$ afin de rompre la liaison disulfure), en utilisant à chaque fois une solution diluée de dérivé thiolé de même concentration, à savoir $5,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Au bout d'un certain nombre d'ajouts la solution commence à s'agréger, ce qui se traduit tout d'abord sur les spectres UV-visibles par un affaïssement et un déplacement de la bande d'absorption des nanoparticules vers les longueurs d'onde plus élevées (nanoparticules moins nombreuses et plus grosses) puis visuellement par l'apparition de grosses particules noires en suspension.

3. Taux limites de greffage

D'après nos calculs 30 mL de solution de nanoparticules d'or nues correspondent à $1,23 \cdot 10^{-6}$ mol de sites d'or réellement accessibles. Or chaque mL de solution d'hydroxythiophénol apporte $5,5 \cdot 10^{-8}$ mol de dérivé thiolé, c'est à dire permet de greffer 4 % des sites d'or accessibles.

La détermination de l'ajout correspondant au début de l'agrégation permet de remonter au pourcentage maximal de sites d'or accessibles qu'il est possible de greffer sans agrégation. C'est ce que nous avons appelé taux limite de greffage.

Dans le cas de l'hydroxythiophénol l'agrégation débute lors du huitième ajout, ce qui correspond à un taux limite de greffage de 28 %.

Nous avons également vérifié par TEM. que pour un taux d'hydroxythiophénol inférieur au taux limite de greffage les nanoparticules étaient toujours relativement dispersées.

De la même façon nous obtenons pour les autres dérivés thiolés les taux limites de greffage suivants :

	Taux limite de greffage
4-hydroxythiophénol (4-mercaptophénol)	28 %
4-aminothiophénol (4-mercaptoaniline)	32 %
Acide thiomaléique	> 300 %
2-mercaptoéthanesulfonate de sodium	6 %
6-mercaptohexan-1-ol	16 %
L-cystine	37 %

Ces résultats peuvent s'interpréter de la façon suivante :

- Les dérivés 4-hydroxythiophénol et 4-aminothiophénol dont les caractères hydrophiles sont proches et relativement faibles vont être caractérisés par des taux de greffage comparables et assez faibles.
- Le dérivé 6-mercaptohexan-1-ol conduit à un taux de greffage inférieur.
- Le dérivé L-cystine présente un taux de greffage très légèrement supérieur, sans doute grâce à la présence d'un groupement acide carboxylique polaire.
- L'acide thiomaléique possédant deux groupements acides carboxyliques est encore beaucoup plus hydrophile et ne conduit à aucune agrégation, quel que soit le taux de greffage.
- Enfin le dérivé 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium, bien qu'il soit fortement hydrophile, ne conduit qu'à un taux de greffage médiocre.

Encouragés par ces premiers résultats nous avons essayé de combiner différents dérivés thiolés. Nous avons conservé l'acide thiomaléique qui semble favoriser la dispersion des nanoparticules ainsi que l'hydroxythiophénol et l'aminothiophénol dont les réactivités sont susceptibles de nous intéresser pour greffer des molécules fluorescentes ou l'acide folique. Nous avons alors procédé comme précédemment en ajoutant alternativement 1 mL de chacune des solutions de dérivé thiolé.

Nous avons alors obtenus les résultats suivants :

		Taux limite de greffage
Mélange 1	Acide thiomaléique	80 %
	Hydroxythiophénol	50 %
Mélange 2	Acide thiomaléique	40%
	Hydroxythiophénol	35 %
	Aminothiophénol	38 %

La présence d'acide thiomaléique favorisant la dispersion dans l'eau permet donc d'augmenter de façon assez conséquente le nombre de dérivés hydroxythiophénols et aminothiophénols qu'il est possible de greffer sur les nanoparticules d'or nues.

C. Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique

1. Protocole

Les travaux de J.W.Slot⁷⁴ nous ont permis d'établir le protocole suivant :

Nous dissolvons 10,0 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans 80 mL d'eau ultra pure que nous versons dans un ballon monocol de 100 mL muni d'un réfrigérant à eau, puis nous portons le mélange à 60 °C.

Dans un autre ballon monocol de 50 mL muni d'un réfrigérant à eau nous versons une solution contenant 40,0 mg de citrate de sodium et 10,0 mg d'acide tannique dissous dans 20 mL d'eau ultra pure que nous portons également à une température de 60 °C.

Lorsque les deux ballons ont atteint les 60 °C requis, nous versons le contenu du deuxième dans le premier. La solution devient rouge presque immédiatement comme dans la synthèse utilisant le citrate de sodium seul.

On laisse la réaction se dérouler à 60 °C pendant une heure et sous agitation modérée, puis on chauffe jusqu'à ébullition pendant 30 minutes pour bien homogénéiser la solution

2. Résultats

L'analyse granulométrique de la solution obtenue nous donne un pic monodisperse dont la taille moyenne en nombre est de 7,8 nm.

De plus le changement de couleur que nous avons vu également dans la synthèse précédente (jaune transparent à rouge) est caractéristique de la réduction des ions Au^{3+} en Au^0 et de la formation de nanoparticules d'or de petite taille.

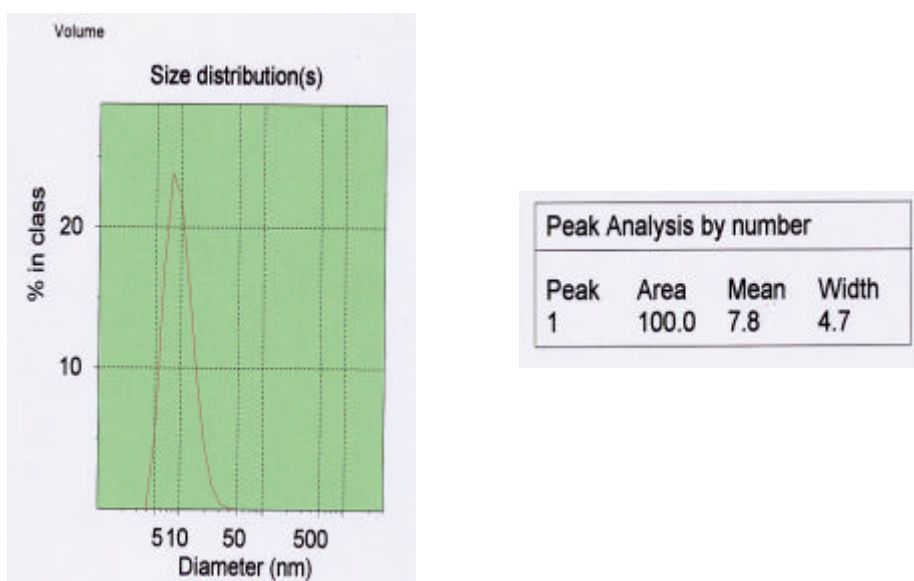


Figure 93: graphique et tableau récapitulatif obtenus par granulométrie laser

3. Discussion

Selon J.W.Slot,⁷⁴ dans la synthèse de nanoparticule d'or nue, l'acide tannique à un effet double :

- la taille des nanoparticules obtenues diminue de 15 nm à 3 nm lorsque la concentration d'acide tannique dans le mélange réactionnel augmente de 0,01 à 5 mL.
- le temps de la réaction de formation des particules se traduisant par un changement de coloration vers le rouge augmente lorsque la concentration de l'acide tannique diminue.

Dans une synthèse Au-citrate effectuée selon le protocole décrit précédemment, 0,1 mL d'une solution à 1 % en acide tannique est utilisé. L'évolution de la taille des nanoparticules formées est suivie par deux méthodes ; la granulométrie laser et la spectrophotométrie UV-visible.

Les résultats de la granulométrie représentés par le graphique de la Figure 94 montrent que la taille moyenne des nanoparticules est atteinte au bout de 7 minutes de réaction alors qu'en absence d'acide tannique, 60 minutes sont nécessaires pour que la réaction soit complète. Dès l'ajout des réactifs, il y a formation de nanoparticules primaires qui vont croître au cours du temps et qui très vite vont atteindre une taille stable (entre 16 et 20 nm).

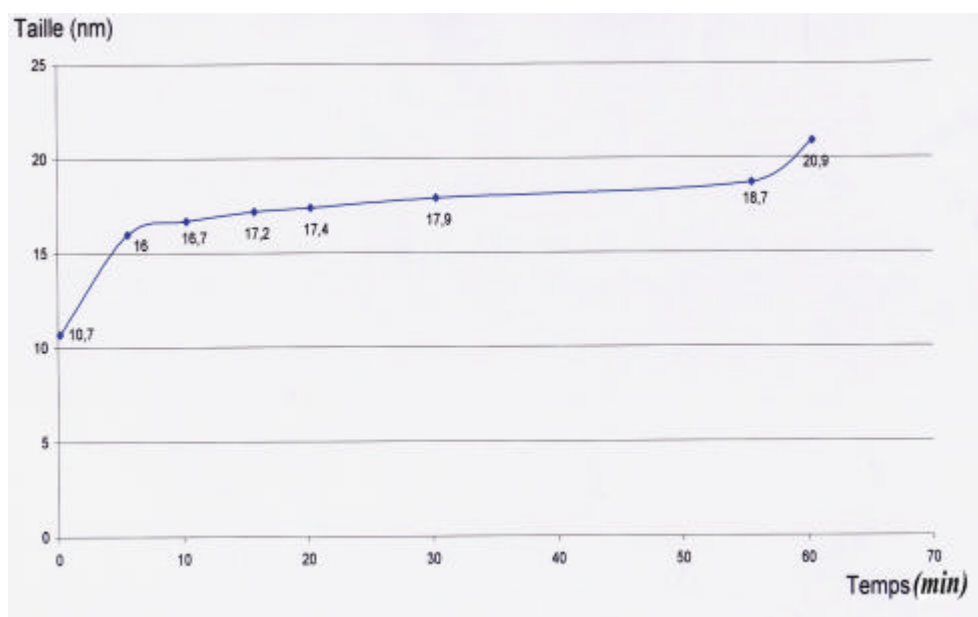


Figure 94: étude cinétique de la croissance des particules par la méthode utilisant le mélange citrate de sodium + acide tannique (suivie par granulométrie laser).

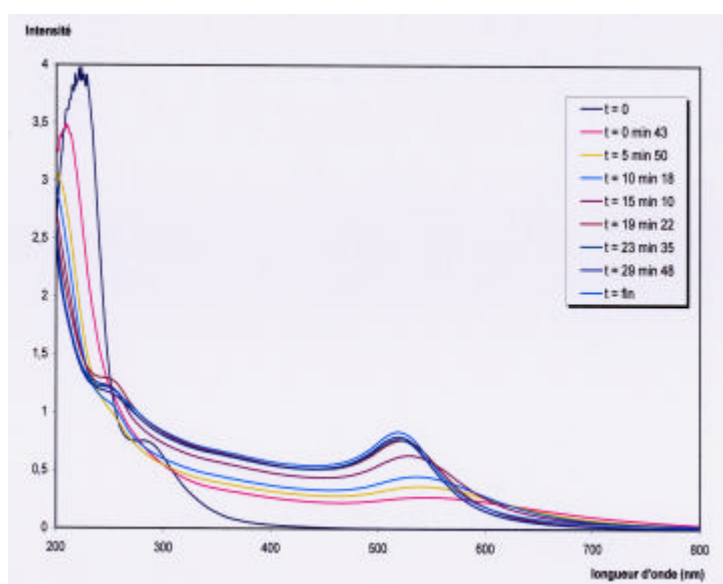


Figure 95: étude cinétique de la croissance des particules par la méthode utilisant le mélange citrate de sodium + acide tannique (suivie par spectrophotométrie UV-visible).

Les spectres UV-visible de la Figure 95 ont été obtenus par analyse de prélèvements réguliers au cours de la synthèse de nanoparticules d'or nues.

Le spectre $t = 0$ correspond au témoin. En effet, l'ajout de la solution citrate + acide tannique n'a pas encore eu lieu, donc la réaction n'a pas débuté. On remarque qu'il n'y a pas du tout d'absorption entre 450 et 800 nm.

Dès lors que tous les réactifs sont mis en contact, il y a apparition d'une absorption vers 550 nm. Son intensité augmente au cours de la réaction en même temps que diminue celle vers 230 nm. On peut penser que la concentration en ions Au^{3+} (pic vers 230 nm) baisse au profit de la formation des nanoparticules constituées d'atomes d'or au degré d'oxydation 0 (absorption vers 550 nm). Il y a donc bien eu réduction.

Cette augmentation est très rapide au début de l'expérience puis ralentit jusqu'à atteindre un palier au bout de 20 minutes (voir Tableau 13). Cette remarque s'ajoute à l'observation de

changement de couleur rapide au cours de la synthèse et confirme l'hypothèse d'une cinétique de réaction très rapide.

Temps (minutes)	0,72	5,83	10,3	15,17	19,37	23,58	29,8	120
Absorbance au maximum de la longueur d'onde	0,2752	0,3664	0,4527	0,6314	0,7626	0,7706	0,793	0,8338

Tableau 13 : évolution de l'absorbance au cours du temps

Temps (minutes)	0,72	5,83	10,3	15,17	19,37	23,58	29,8	120
Longueur d'onde maximum (nm)	549	542,5	537,5	529,5	522	518,5	519	519

Tableau 14: évolution de la longueur d'onde maximale au cours du temps

On note un décalage de la longueur d'onde maximale vers les longueurs d'ondes plus faibles au cours du temps. Cette longueur d'onde maximale passe de 549 nm à 520 nm environ en 20 minutes, exactement le même temps qu'il a fallu à l'absorbance pour atteindre son palier. Puis cette valeur reste constante jusqu'à la fin de l'expérience.

Elle correspond aux valeurs trouvées dans la littérature ²⁵⁰ qui représente la longueur d'onde ou l'absorption des nanoparticules synthétisées par la méthode utilisant le citrate comme réducteur est maximale.

Au début de l'expérience, tout l'or est sous forme d'ions Au^{3+} . La réduction de ces ions en Au^0 permet la formation de germes de nanoparticules. La concentration en ion Au^{3+} diminue très fortement (diminution très rapide de l'intensité du pic vers 230 nm en UV).

Ensuite les particules grossissent. Plus la taille augmente, moins il y a d'ions en solution donc plus la vitesse de croissance diminue jusqu'à atteindre le palier ou tout a été réduit en Au^0

Avantages

L'avantage de cette nouvelle méthode par rapport à la synthèse précédente est l'obtention de nanoparticules de tailles variables.

Nous avons réalisé 4 expériences dans lesquelles seule la quantité d'acide tannique ajoutée a été modifiée, le dispositif expérimental et le protocole restant identique.

Dans la première 0,05 mL d'une solution de concentration $0,1 \text{ gL}^{-1}$ en acide tannique a été ajouté, 0,1 mL dans la 2^{ème}, 1 mL dans la 3^{ème} et 7 mL dans la dernière.

Les résultats sont regroupés dans le Tableau 15.

Volume de solution ajouté	0,05 mL	0,1 mL	1 mL	7 mL
Taille	26,7 nm	20,9 nm	7,5 nm	5,8 nm

Tableau 15 : évolution de la taille en fonction du volume de solution d'acide tannique ajouté

Bilan : plus on ajoute d'acide tannique plus la taille des nanoparticules diminue.

L'obtention de nanoparticules de tailles inférieures à celles obtenues par la première méthode (8 nm contre 15 nm) permet d'augmenter le pourcentage de sites accessibles par rapport au nombre total d'atomes d'or, on passe de 3,9 à 7,3 %. En effet, plus la particule est petite, plus le rapport surface sur le volume est grand. Ce deuxième avantage permet de compenser la faible concentration en atomes d'or introduit au départ dans la solution.

D. Greffage des molécules organiques

1. Choix des ligands

En profitant de l'affinité particulière de l'or sous forme Au^+ (acide mou dans la théorie de Pearson) avec le soufre (base molle dans la théorie de Pearson), il est possible de greffer des dérivés thiolés sur les nanoparticules d'or par une liaison covalente assez forte.^{59 162251}

Nous avons choisi toute une série de composés thiolés afin de répondre aux spécificités de notre nanoparticule imposées par sa future application bio-médicale :

- mercaptoéthanesulfonate, ce composé permet d'améliorer la solubilité de notre nanoparticule.
- l'acide thiomaléique permet une dissolution légère de notre nanoparticule mais surtout, il joue un rôle protecteur à sa surface.
- l'hydroxythiophénol (4-mercaptophénol) : possibilité de réactions de substitutions nucléophiles, ainsi qu'une fonctionnalisation ultérieure de notre nanoparticule (ajout de l'acide folique pour la reconnaissance sur la membrane extérieure des cellules cancéreuses).
- pentafluorothiophénol : ce composé a été choisi uniquement pour développer des matériaux à mouillage forcé (composés mésoporeux pour le stockage et/ou la dissipation d'énergie mécanique).

Pour éliminer des possibles phénomènes d'échanges et pour assurer un meilleur accrochage à la surface des nanoparticules, nous avons choisi également de tester des disulfures :

- l'acide thioctique, a été choisi pour tester le renforcement du greffage et ainsi éviter la réversibilité dans l'eau.
- l'acide 3,3'-dithiodipropionique et l'acide 4,4'-dithiodibutyrique ont été choisis pour évaluer l'effet de la longueur de chaîne.
- la (L)-glutathione est une grosse molécule qui associe plusieurs fonctions, elle permet une meilleure solubilisation, une plus importante protection à la surface de la nanoparticule et un camouflage biologique.

²⁵¹ R.Nuzzo, D.Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4481.

2. Etude de stabilité des différentes nanoparticules greffées

a) Protocole

Cette étude a été réalisée sur des nanoparticules d'or nues synthétisées par la première méthode, mais le protocole reste identique avec l'utilisation de nanoparticules d'or nues synthétisées avec le mélange citrate de sodium + acide tannique. Chaque composé a été testé séparément et sa taille a été suivie par granulométrie laser au cours du temps après son greffage sur la nanoparticule d'or nue.

Afin d'éviter un ajout trop violent qui risquerait d'agréger irrémédiablement nos nanoparticules, nous avons choisi de préparer des solutions très diluées de composés thiolés.

Voici à titre d'exemple le mode opératoire retenu pour greffer l'hydroxythiophénol :

Nous plaçons dans un erlenmeyer 30 mL de solution de nanoparticules d'or nues ($1,62 \cdot 10^{-6}$ mol de sites accessibles). Nous y ajoutons goutte à goutte une solution aqueuse très diluée ($5,41 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹) de 4- hydroxythiophénol.

Nous parlerons de pourcentage de sites greffés qui correspond à la quantité de dérivés thiolés ajoutés par rapport au nombre de sites accessibles total sur la nanoparticule d'or nue. Les ajouts se font à température ambiante et sous agitation. On laisse une demi-heure d'agitation tous les 10 % de sites greffés pour laisser le temps à la réaction d'avoir lieu.

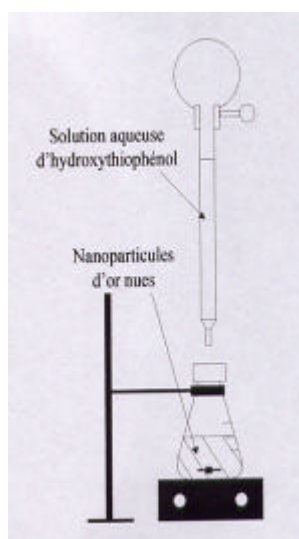


Figure 96 : schéma du mode opératoire lors du greffage des dérivés thiolés à la surface des nanoparticules d'or nues.

b) Résultats

Dès les premiers jours, les nanoparticules greffées par l'hydroxythiophénol seul s'agglomèrent. Plus le pourcentage de sites fonctionnalisés est important, plus l'aggrégation est importante. Cette remarque s'amplifie au cours du temps. Nous arrivons à une limite de 20 % au bout de 8 semaines.

En ce qui concerne le mercaptoéthanesulfonate, l'évolution est moindre. Il faut attendre 8 semaines pour constater une agglomération dès 20 % de greffage.

L'acide thiomaléique quant à lui est le composé qui a le moins d'influence sur l'aggrégation. Ce n'est qu'au bout de 8 semaines et 100 % de greffage que la taille des nanoparticules commence à augmenter.

Après les différents résultats que nous avons obtenus, nous avons choisi les dérivés thiolés suivants :

- 20 % d'hydroxythiophénol, pourcentage relativement faible pour éviter l'agglomération mais suffisant pour fonctionnaliser notre nanoparticule (permettre la fixation des fluorophores).
- 10 % de mercaptoéthanesulfonate pour améliorer la solubilité dans l'eau.
- 10 % d'acide thiomaléique pour protéger la surface de la nanoparticule.

Cette nanoparticule "idéale" sera noté (10/10/20) par la suite en référence aux pourcentages des différents thiols greffés à sa surface.

ANNEXE VI : calculs de rapports atomes d'or/nanoparticule

Nombre d'atomes par particule $N_{at/part}$

$$N_{at/part} = C \left(\frac{r_{pAu}}{r_{Au}} \right)^3$$

soit r_{Au} le rayon atomique de l'or $r_{Au} = 0.146 \text{ nm}$

soit r_{pAu} le rayon de la nanoparticule d'or

soit C la compacité pour un empilement cubique face centrée $C = 0.74$

Nombre de particules n_{part}

$$n_{Au} = \frac{m_{Au}}{M_{Au}}$$

soit n_{Au} le nombre de moles d'or

soit m_{Au} la masse d'or introduite

soit M_{Au} la masse molaire de l'or $M_{Au} = 197 \text{ g}$

$$n_{part} = \frac{n_{Au}}{C \left(\frac{r_{pAu}}{r_{Au}} \right)^3}$$

Calcul du nombre d'atomes d'or surfaciques par nanoparticule

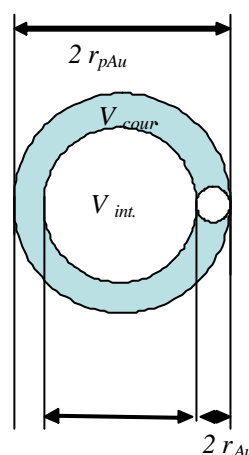
$$V_{ext} = \frac{4}{3} \pi (r_{pAu})^3$$

$$V_{int} = \frac{4}{3} \pi (r_{pAu} - 2r_{Au})^3$$

$$V_{cour} = \frac{4}{3} \pi (r_{pAu}^3 - (r_{pAu} - 2r_{Au})^3)$$

$$(N_{at})_{cour} = \frac{V_{cour}}{V_{at}} C$$

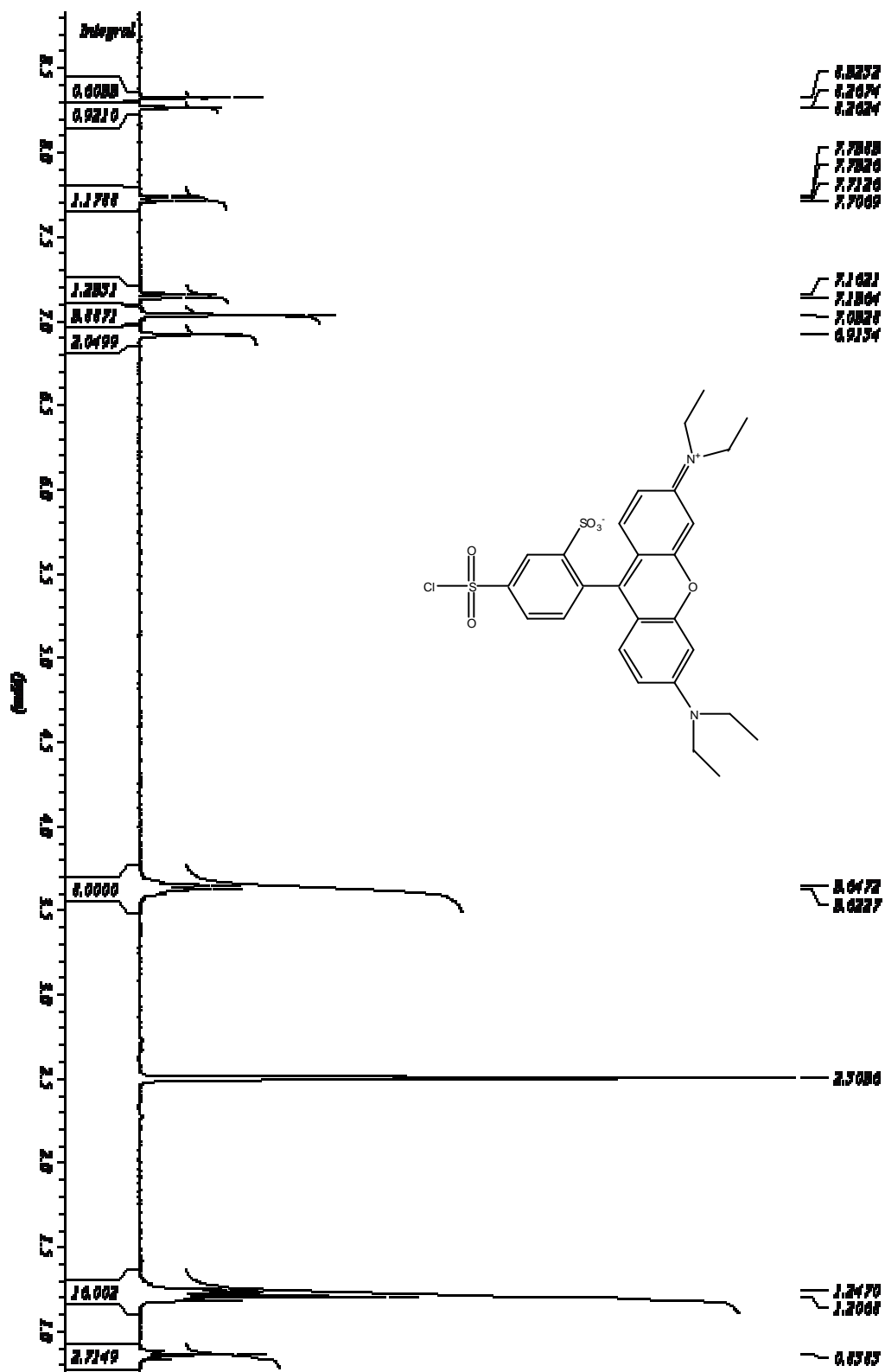
$$(N_{at})_{cour} = \frac{V_{cour}}{\frac{4}{3} \pi r_{Au}^3} C$$



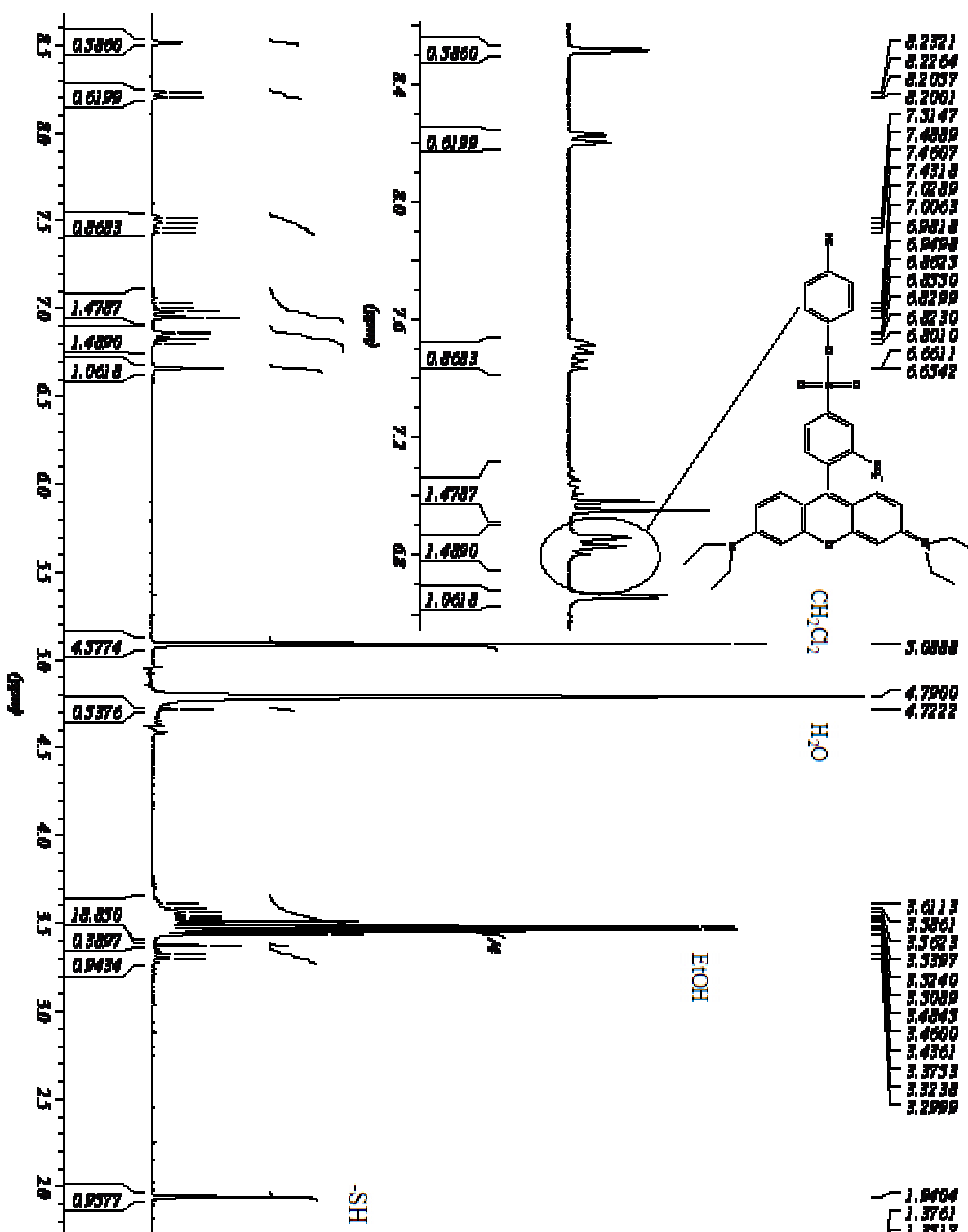
$\phi_{part} \text{ (nm)}$	$N_{at/part}$	$N_{at.sur./part}$	$N_{at.sur.acc./part}$	$C_{part} \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$
16	121743	12850	4240	-
12	51360	7139	2356	4,96E-09
8	15218	3095	1238	1,67E-08
2,5	464	255	128	-
2	238	153	79	-

C calculé pour une solution mère or/citrate/acide tannique de 100 mL contenant avant réaction 10 mg d' $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Le pourcentage de sites accessibles en surface $(N_{at})_{acc}$ varie en fonction de la courbure des particules (donc de la taille), les pourcentages utilisés ici sont donc ceux répertoriés par Murray *et al.*²⁵²

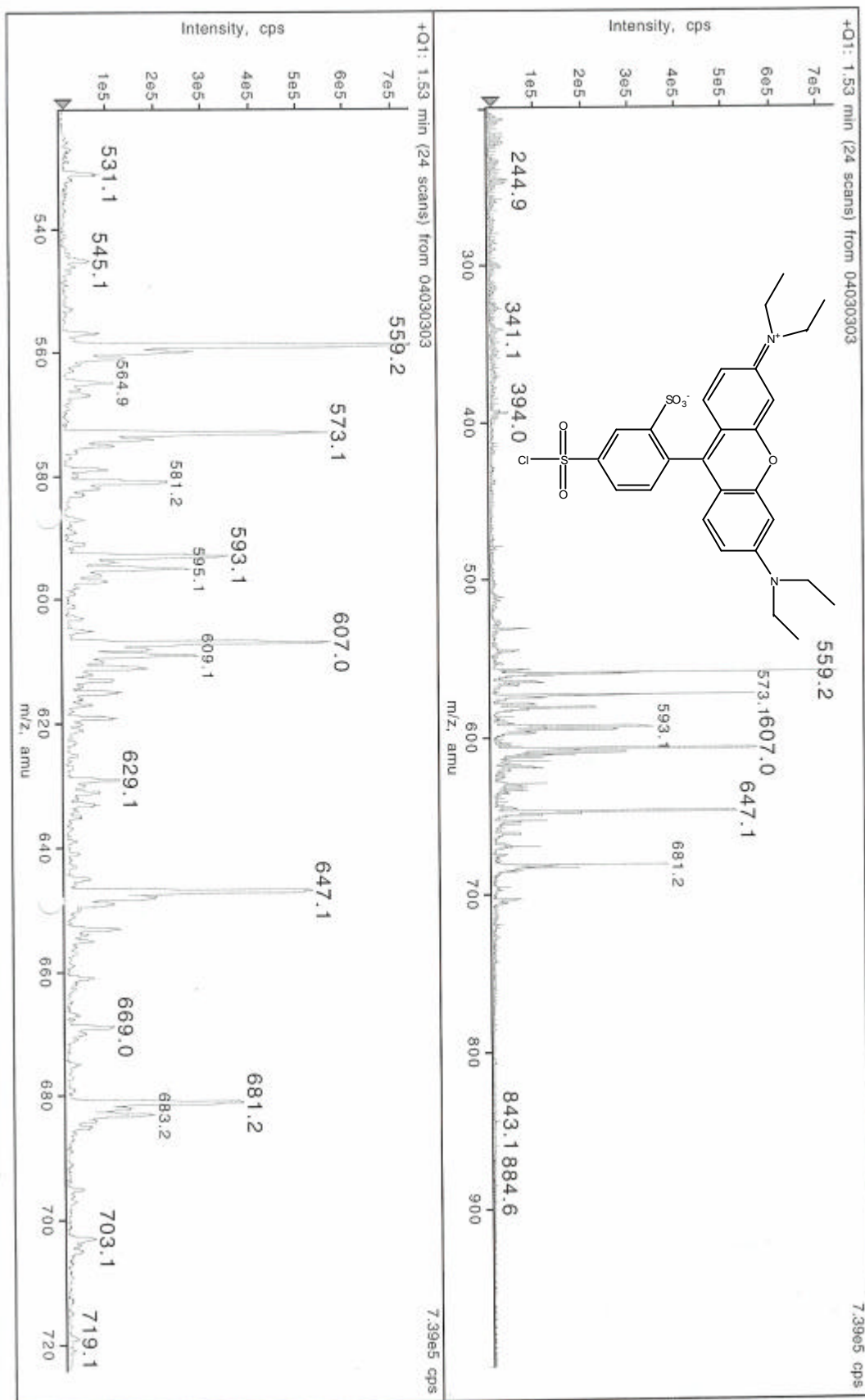
²⁵² M. Hostetler, R. Murray, S. Green, *Langmuir*, **1998**, 14, 17.

ANNEXE VII : spectre RMN ^1H sur LRSCB

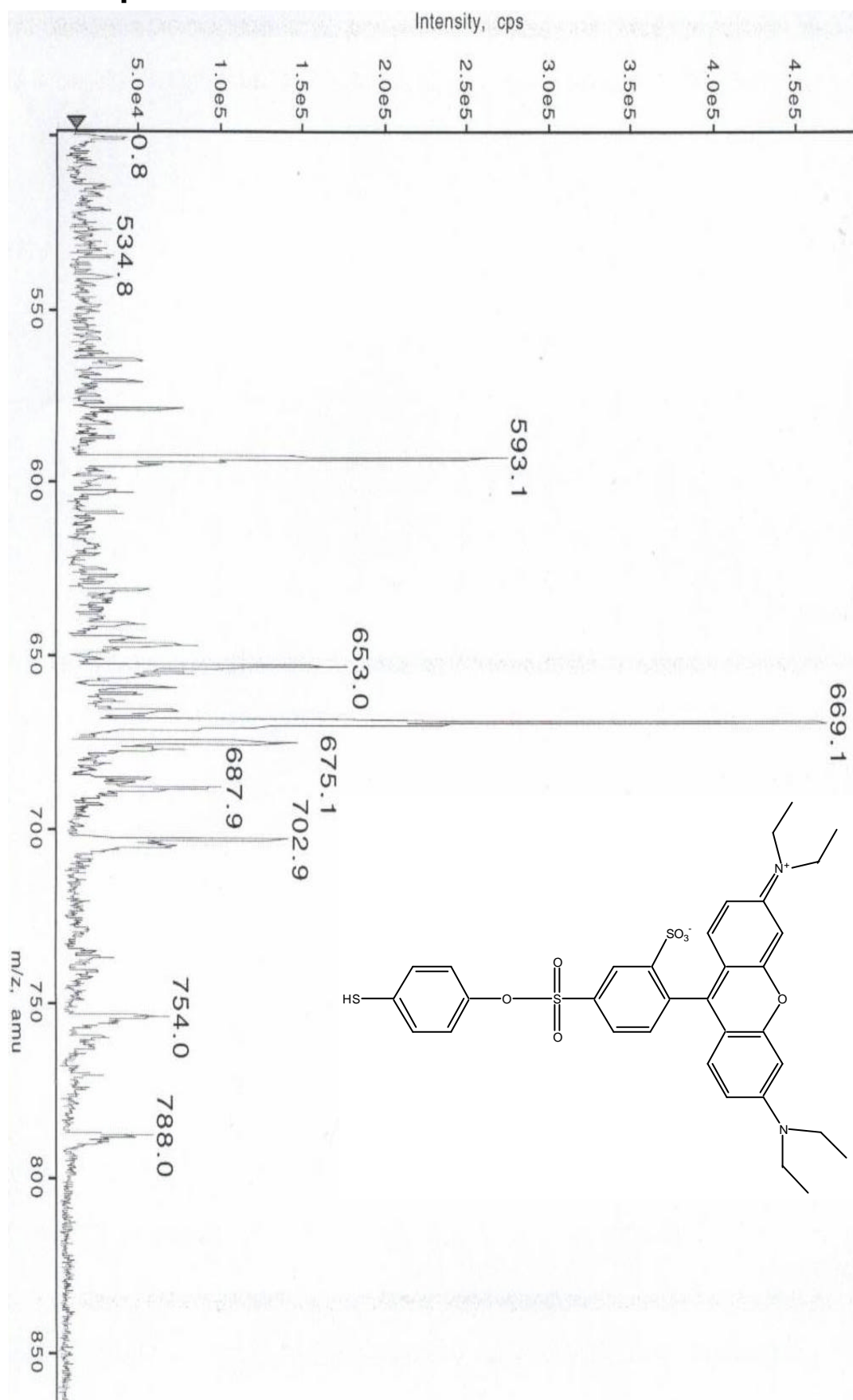
ANNEXE VIII : spectre RMN ¹H sur Rhoda-SH



ANNEXE IX : spectre de masse sur LRSCB



ANNEXE X : spectre de masse sur Rhoda-SH



Corrections IRM

ANNEXE XI : synthèse Au@DTDTPA

Afin de réaliser la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes de dérivés DTDTPA, nous nous sommes basés dans un premier temps sur un protocole utilisé pour la synthèse de nanoparticules protégées par l'acide dihydrolipoïque (DHLLA). Le DHLLA présentant comme le DTDTPA une fonction acide carboxylique, on pouvait en effet attendre des conditions d'élaboration de nanoparticules comparables. Nous avons donc dans un premier temps réalisé une synthèse avec un rapport molaire Au/DTDTPA de 1. Nous avons ensuite fait varier différents paramètres de la synthèse jusqu'à obtenir une poudre de nanoparticules possédant des caractéristiques satisfaisantes. Au niveau de la synthèse proprement dite, nous avons essentiellement fait varier le rapport molaire Au/DTDTPA et trouver un optimum pour un rapport de 1/4. Par rapport au protocole de départ, nous nous sommes d'autre part affranchis de l'ajout en fin de synthèse de 5 mL d'HCl 1N qui d'après les observations entraînait la redispersion des nanoparticules.

	DTPA 1	DTPA 2	DTPA 3	DTPA 4
date	07/02/2005	08/02/2005	09/02/2005	10/02/2005
HAuCl ₄ .3H ₂ O	73	20	20	20
DTDTPA	176	48.2	24.1	48.2
acide acétique	0	0.2	0.2	0.2
NaBH ₄	70.2	19.23	19.23	19.23
H ₂ O	5	1.4	1.4	1.4
Méthanol	60	17	17	17
Observation	pas de précipitation	floculation	floculation	floculation
Traitement	non	non	non	ajout de 5ml d'HCl 1N redispersion
Filtration	non	OK	OK	passage dans le filtrat
Traitement 2	NaCl	50ml HCl 10-3N	50ml HCl 10-3N	50ml HCl 10-3N
	HCl 0.1N	50ml H ₂ O	50ml H ₂ O	50ml H ₂ O
	Et ₂ O	50ml Et ₂ O	50ml Et ₂ O	50ml Et ₂ O
Redispersion	Et ₂ O éliminé puis redispersion dans NaOH	NaOH 10-4M/pas de redispersion NaOH 10-2M/redispersion rapide veronal/NaCl/redispersion lente	NaOH 10-4M/pas de redispersion NaOH 10-2M/redispersion lente veronal/NaCl/redispersion lente	NaOH 10-2M/redispersion lente veronal/NaCl/redispersion lente HCl 1N / pas de redispersion+MeOH MeOH / pas de redispersion+NaOH ok
Sur filtrat				Réduction à l'évaporateur rotatif essai précipitation avec NaOH et NaCl-Veronal précipité puis dispersion
Granulométrie	100-200nm dilution par 10	NaOH 100 - 700 nm veronal		NaOH 100-500 + pic entre 20 et 50
UV	bande à 665 nm	NaOH pas de bande plasmon veronal pas de bande plasmon		pas de bande
	DTPA 8	DTPA 9	DTPA 10	DTPA 11
date	01/03/2005	02/03/2005	03/03/2005	04/03/2005
HAuCl ₄ .3H ₂ O	100	20	100	50
DPTA2SH	462	48.2	241	120.5
acide acétique	1	0.2	1	1
NaBH ₄	61	19.2	96	24
H ₂ O	7	1.4	7	3.5
Méthanol	83	16.6	83	40
Observation	précipitation du DTPA après introduction			
Traitement	floculation marron/blanche pas d'ajout d'HCl	floculation marron/blanche pas d'ajout d'HCl	floculation marron/blanche pas d'ajout d'HCl	floculation marron/blanche pas d'ajout d'HCl
Filtration		OK	OK	OK membrane 0.45um
Traitement2	50ml HCl 10-3N	50ml HCl 10-3N	50ml HCl 10-3N	50ml HCl 10-3N
	100ml H ₂ O	100ml H ₂ O	100ml H ₂ O	100ml H ₂ O
	50ml Et ₂ O	50ml Et ₂ O	50ml Et ₂ O	50ml Et ₂ O
		16mg de poudre		poudre marron verte
Redispersion	NaOH 1N redispersion	NaOH 1N redispersion	NaOH 1N redispersion	NaOH 1N redispersion
Sur filtrat	évaporation sous vide à Tamb reste 170mg à sec aspect hétérogène noir et brun			
Granulométrie	pas de résultat	pas de résultat	pas de résultat	pas de résultat
UV		PAS DE BANDE PLASMON TEM 2,5 nm	PAS DE BANDE PLASMON	PAS DE BANDE PLASMON TEM 2,6 nm
Purification				

Tableau 16 : résumé des synthèses d'Au@DTDTPA

Les nanoparticules synthétisées ne présentant pas de bande plasmon qui nous permettrait d'évaluer leur taille moyenne, des essais de caractérisation par granulométrie sur Zetasizer ont été réalisés. Ces essais se sont révélés infructueux, comme bien souvent sur les nanoparticules d'or, l'appareil donnant des ordres de taille totalement aberrants. Seul le MET s'est montré efficace pour caractériser la taille de ces nanoparticules. Quelques essais de redispersion des nanoparticules ont été réalisés. Ces essais nous indiquent que les nanoparticules obtenues sous forme de poudre sont redispersables en milieu basique de manière assez lente à faible concentration et de manière beaucoup plus rapide à forte concentration.

	Observation
Solution NaOH 10^{-4} N	pas de redispersion
Solution NaOH 10^{-2} N	redispersion lente
Solution NaOH 1 N	redispersion rapide
Veronal/NaCl	redispersion lente
HCl 1 N	pas de redispersion

Tableau 17 : essais de redispersion

Les solutions colloïdales obtenues présentant des concentrations élevées en DTDTPA évaluées soit par dosage colorimétrique de la complexation du Gd^{3+} , soit par ATG, des expériences ont été menées afin d'éliminer toute présence résiduelle de DTDTPA non greffé sur les nanoparticules.

Agitation prolongée en milieu acide :

Le DTDTPA étant soluble en milieu aqueux acide, on agite de manière prolongée une poudre d'Au@DTDTPA en milieu acide, on filtre et l'on compare la masse résiduelle à celle initiale. On introduit pour cela 55,2 mg d'une poudre Au@DTDTPA dans un ballon contenant 100 mL d'une solution d'HCl à pH1.5. On agite cette solution durant 72 H puis on filtre sur membrane millipore 0,22 μ m, on lave avec 100 mL d'eau puis 100 mL d'éther. On évapore sous vide la poudre récupérée et on pèse alors une masse résiduelle de 54,0 mg. On peut alors considérer que la perte de masse observée de 1,2 mg correspond aux pertes dans la verrerie et sur la membrane de filtration.

Tests de redispersion/précipitation/lavage

Afin d'éliminer, d'éventuels molécules de DTDTPA libres, nous avons procédé à des opérations de redispersion/précipitation/lavage sur les poudres Au@DTDTPA obtenues. On dissout ainsi 50 mg de poudre dans 10 mL d'eau et 1 mL de soude molaire. On précipite ensuite des échantillons de 2 mL par ajout de différents volume d'acétone comme rapporté dans le tableau suivant.

V de solution colloïdale (mL)	2	2	2	2
V HCl 1N (mL)			0,5	0,5
V acétone (mL)	2	4	2	4
Observation	Précipitation	Précipitation	Précipitation incomplète	Précipitation incomplète

Tableau 18 : essais de redispersion / précipitation

Le précipité obtenu est ensuite filtré sur membrane millipore et lavé avec 20 mL d'acétone.

Elaboration de la méthode de dosage du DTDTPA

Les premiers tests ont été effectués directement sur une solution de DTDTPA afin de tester la validité de la méthode sur une solution de concentration connue.

On dilue donc 100 mg de DTDTPA dans 100 mL d'eau et l'on divise la solution en 10 échantillons de 10 mL soit $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol. Sur ces solutions, on ajoute des quantités variables d'une solution de $GdCl_3$ à $1,96 \cdot 10^{-2}$ M (72,8 mg dans 10 mL). Enfin on ajoute 1 mL d'une solution de xylénol (2 mg dans 50 mL) et on complète à 12 mL avec de l'eau.

Echantillon	Ajouts de $GdCl_3$ (mL)	Xylénol orange (mL)	Solution DTDTPA (mL)	Complément H_2O (mL)	Couleur
1	0,1	1	10	1,9	jaune
2	0,2	1	10	1,8	jaune
3	0,5	1	10	1,5	jaune
4	1	1	10	1	orange
5	1,1	1	10	0,9	orange
6	1,2	1	10	0,8	orange
7	1,5	1	10	0,5	orange
8	2	1	10	0	orange
0	1	1	0	10	rose

Tableau 19 : dosage colorimétrique test sur une quantité connue de DTDTPA

On observe ainsi le virage pour la quantité attendue de $GdCl_3$ soit une quantité molaire équivalente à celle de DTDTPA ce qui valide donc la méthode de dosage.

On effectue le même type de dosage sur une solution colloïdale.

On dilue donc 20 mg d' $Au@DTDTPA$ dans 1 mL de NaOH 1 N + 50 mL d'eau et on divise la solution en 5 échantillons de 10 mL soit $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol. Sur ces solutions, on ajoute des quantités variables d'une solution de $GdCl_3$ à $1,96 \cdot 10^{-2}$ M (58.2 mg dans 10 mL). Enfin on ajoute 1 mL d'une solution de xylénol (2 mg dans 50 mL) et on complète à 12 mL avec de l'eau.

Les résultats observés ne nous indiquent cependant pas la zone de virage dans la mesure où la solution de xylénol se trouve sous sa forme de couleur rose même en l'absence de Gd^{3+} .

Echantillon	Ajouts de $GdCl_3$ (mL)	Xylénol orange (mL)	Solution $Au@DTDTPA$ (mL)	Complément H_2O (mL)	Couleur
1	0,2	1	10	1,8	rose
2	0,5	1	10	1,5	rose
3	1	1	10	1	rose
4	1,2	1	10	0,8	rose
5	1,5	1	10	0,5	rose
0	1	1	0	10	rose

Tableau 20 : dosage colorimétrique sur une solution d' $Au@DTDTPA$ à pH non contrôlé (basique).

Ces résultats ont ainsi révélés que le dosage devait être réalisé dans des conditions de pH précises comme évoqués dans la littérature.²¹⁷

Nous avons donc réalisé une étude UV/visible de la couleur du xylénol orange en fonction du pH et de la complexation du Gd. Pour cela, sur 50 mL d'une solution aqueuse de xylénol orange à $1,3 \cdot 10^{-5}$ M, on ajoute des quantités négligeables d' HCl 1N et NaOH 1N de manière à faire varier le pH. Pour une solution à pH 3 et 1,7, on ajoute 1 mL d'une solution de $GdCl_3$ à

$4,10^{-3}$ M. On observe sur spectrophotomètre UV-visible la longueur d'onde d'absorption des solutions (résultats figure 72).

ANNEXE XII : liste des agents de contraste

Predominantly positive enhancers						
NAME OF COMPOUND	CENTRAL MOIETY	RELAXIVITY	DISTRIBUTION	INDICATION	DEVELOPMENT STAGE	TRADE MARK
Gadopentate dimeglumine, Gd-DTPA	Gd ³⁺	r1=3.4, r2=3.8, B0=1.0T, Xm=2.7 10 ⁻²	intravascular, extracellular	neuro/whole body	for sale	Magnevist
			gastrointestinal	bowel marking	for sale	Magnevist enteral
Gadoterate meglumine, Gd-DOTA	Gd ³⁺	r1=3.4, r2=4.8, B0=1.0T, Xm=2.7 10 ⁻²	intravascular, extracellular	neuro/whole body	for sale	Dotarem
Gadodiamide, Gd-DTPA-BMA	Gd ³⁺	r1=3.9, r2=4.3, B0=1.0T, Xm=2.7 10 ⁻²	intravascular, extracellular	neuro/whole body	for sale	Omniscan
Gadoteridol, Gd-HP-DO3A	Gd ³⁺	r1=3.7, r2=4.8, B0=1.0T, Xm=2.7 10 ⁻²	intravascular, extracellular	neuro/whole body	for sale	Prohance
Gadobestrol	bowel marking	Phase III, oral suspension	Gadolite 60			
MnCl2	Mn ²⁺	paramagnetic	gastrointestinal	bowel marking		Lumenhance
Fatty emulsion	fatty liquid	short T1-relaxation time	gastrointestinal	bowel marking		
Vegetable oils	fatty liquid	short T1-relaxation time	gastrointestinal	bowel marking		
Sucrose polyesters	fatty liquid	short T1-relaxation time	gastrointestinal	bowel marking		
Mangafodipir trisodium MN-DPDP, Managnese dipyrroxyl diphosphate	Mn ²⁺	r1=2.3, r2=4.0, B0=1.0 T	hepatobiliary, pancreas, adrenal	liver lesions	approved	Teslascan
Gadobenate dimeglumine, Gd-BOPTA	Gd ³⁺	r1=4.6, r2=6.2, B0=1.0 T	intravascular, extracellular, hepatobiliary	neuro/whole body, liver lesions	Phase III	Multihance
Gadoxetic acid, Gd-EOB-DTPA	Gd ³⁺	short T1-relaxation time	hepatobiliary	liver lesions	Phase III	Eovist
Fe-HBED	Fe ²⁺		hepatobiliary	liver lesions		
Fe-EHPD	Fe ²⁺		hepatobiliary	liver lesions		
Liposomes, paramagnetic	Gd ³⁺		RES-directed	liver lesions		
Mn-EDTA-PP (liposomes)	Mn ²⁺	r1=37.4, r2=53.2, B0=0.5 T				Memosomes
Polylysine-(Gd-DTPA)-dextran	Gd ³⁺		lymph nodes	staging of lymph nodes		
Diphenylcyclohexyl phosphodiester-Gd-DTPA, MS 325 EPIX	Gd ³⁺		intravascular, short elimination half life	MR-angiography, vasc. capillary permeability	Phase I	
MP 2269, 4-pentyl-bicyclo [2.2.2] octan-1-carboxyl-di-L-aspartyllysine-DTPA	Gd ³⁺	r1=6.2, B0=1.0 T	intravascular	MR-angiography	preclin.	
(Gd-DTPA)-17, 24 cascade polymer	Gd ³⁺	r1=11.9, B0=1.0 T, (r2=16.5)	intravascular	MR-angiography vascularis	preclin.	Gadomer-17, 24
Gd-DTPA-PEG polymers (polyethylene glycol)	Gd ³⁺	r1=6.0, B0=1.0 T	intravascular	MR-angiography vascularis, capillary permeability	preclin.	
(Gd-DTPA)n-albumin, (Gd-DOTA)n-albumin	Gd ³⁺	r1=14.4, B0=0.23 T	intravascular	MR-angiography vascularis, MR-mammography	preclin.	
(Gd-DTPA)n-polylysine	Gd ³⁺	r1=13.1, B0=0.23T	intravascular	MR-angiography	preclin.	
(Gd-DTPA)n-dextran	Gd ³⁺		intravascular	MR-angiography	preclin.	

ANNEXE XIII : Liste des abbréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique
 AFM: Microscopie à Force Atomique
 AT: Acide Thiomaléique
 ATG: Analyse ThermoGravimétrique
 AuNP: NanoParticules d'or
 CCD: Charge Coupled Device
 CFC: Cubique Faces Centrées
 Cy: cyanine
 DHLA: Acide DiHydroLipoïque
 DMF: DiMéthylFormamide
 DOTA: acide 1,4,7,10-Tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
 DRX: Diffraction des Rayons X
 DTDTPA: acide dithioldiéthylènetriaminepentacétique
 DTPA: acide diéthylènetriaminepentacétique
 DTPA-BA: acide diéthylènetriaminepentacétique bis-anhydre
 EDTA: acide éthylènediaminotétraacétique
 EGF: Epidermal Growth Factor
 EPR :Enhanced Permeation and Retention effect
 FID: Free Induction Decay
 FITC: Fluorescéine IsoThioCyanate
 FT: Transformée de Fourier
 IR: InfraRouge
 IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
 LRSCB: Lissamine Rhodamine SulfonylChloride B
 MET: Microscopie électronique à Transmission
 MFM: Microscope à Force Magnétique
 MP: 4-MercaptoPhénol
 MS: Mercaptoéthane Sulfonate
 PACA: polyalkylcyanoacrylate
 PVC: PolyVinylChloride (polychlorure de vinyl)
 QD: Quantum Dots (points quantiques)
 RE: Récepteurs d'endocytose
 RF: Radio Fréquences
 RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
 SERS: Spectroscopie par Effet Raman de Surface
 SLN: Signal de Localisation Nucléaire
 SPIO: Small Paramagnetic Iron Oxide
 SPR: Résonance Plasmon de Surface
 SRE: Système réticulo endothélial
 STM: Microscopie à effet Tunnel
 TAMRA-SE: carboxytétraméthylrhodamine succinimide ester

TRITC: TetraméthylRhodamineIsoThioCyanate

USPIO: Ultra Small Paramagnetic Iron Oxide

UV: Ultra Violet

XO: Xylénol Orange

XPS: Spectroscopie de photoélectrons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques

Résumé

Les nanoparticules d'or représentent des plates-formes idéales pour l'immobilisation et le transport d'un nombre élevé de molécules organiques. Cette propriété revêt des applications potentielles en microscopie par fluorescence et en imagerie par résonance magnétique dans l'abaissement du seuil de détection. Une étude a donc été menée sur ce sujet aboutissant à la synthèse de nanoparticules d'or (8-12 nm), porteuses de plusieurs centaines de fluorophores. Une étude menée sur des puces ADN a ainsi démontré que ces nouvelles sondes luminescentes nanométriques possèdent un réel potentiel permettant d'abaisser le seuil de détection de deux ordres de grandeurs. Parallèlement, la synthèse de nanoparticules d'or (2-2,5 nm) recouvertes d'une multicouche d'un dérivé dithiolé (DTDTPA), particulièrement stables en solution ont permis la complexation d'ions gadolinium. L'étude IRM pratiquée sur ces nanoparticules révèle en effet une augmentation significative du contraste par rapport au DTPA:Gd.

Design of functionalized gold nanoparticles for biologic detection and imaging

Abstract

Gold nanoparticles seem to be ideal templates for immobilizing and carrying a high number of organic molecules. This property might have potential application in the field of microscopy by fluorescence and magnetic resonance imaging in order to lower the detection threshold. A study on this subject has also been launched and led to synthesis of gold nanoparticles (8-12 nm), functionalized with several hundreds of fluorophores. A study performed on biochips demonstrated that these new luminescent nanoprobe have a real potential for the biological detection since signal is enhanced occur by two orders of magnitude. At the same time, the synthesis of gold nanoparticles (2-2.5 nm) surrounded by a multilayer of dithiolated derivatives (DTDTPA), especially stable in solution, are able to chelate gadolinium ions. MRI study of these nanoparticles reveal a significant enhancement of the contrast in comparison to DTPA:Gd.