HAL
open science

Elaboration et caractérisations de nanocristaux organiques fluorescents insérés en coquille sol-gel : vers le développement d'un nouveau type d'agent imageant

Cécile Philippot

To cite this version:

Cécile Philippot. Elaboration et caractérisations de nanocristaux organiques fluorescents insérés en coquille sol-gel : vers le développement d'un nouveau type d'agent imageant. Chimie. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00580367

HAL Id: tel-00580367

https://theses.hal.science/tel-00580367v1

Submitted on 28 Mar 2011

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE
Spécialité **« Chimie Physique Moléculaire et Structurale »**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

PHILIPPOT CECILE

le 21 septembre 2010

ELABORATION ET CARATERISATIONS DE NANOCRISTAUX ORGANIQUES FLUORESCENTS INSERES EN COQUILLE SOL-GEL : VERS LE DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU TYPE D'AGENT IMAGEANT

Thèse dirigée par **Ibanez Alain** et codirigée par **Dubois Fabien**

JURY

Mr Perez Serge	DR - ESRF, Grenoble	Président
Mr Chaumont Denis	MdC - Univ. de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
Mr Parola Stéphane	Pr - Univ. Claude Bernard, Lyon	Rapporteur
Mr Baldeck Patrice-Lucien	DR - Univ. Joseph Fourier, Grenoble	Examinateur
Mme Brasselet Sophie	MdC - Univ. St Jêrome, Marseille	Examinatrice
Mr Dubois Fabien	MdC - Institut Néel CNRS, Grenoble	Examinateur
Mme Fery-Forgues Suzanne	DR - Univ. Paul Sabatier, Toulouse	Examinatrice
Mr Ibanez Alain	DR - Institut Néel CNRS, Grenoble	Examinateur

Thèse préparée au sein de L'Institut Néel – CNRS, département MCMF 25 rue des martyrs 38042 Grenoble dans l'Ecole Doctorale de Chimie et Science du Vivant.

Remerciements

3 ans déjà ! Le temps passe si vite. J'ai l'impression que c'était hier que je faisais ma rentrée en tant que doctorante à l'Institut Néel. Maintenant que se clôture ce chapitre palpitant de ma vie d'étudiante et que s'ouvre à moi de nouvelles aventures, je souhaiterais remercier une dernière fois toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces 3 années de thèse autant professionnellement que personnellement.

Dans un premier temps, je tiens à remercier Monsieur Benoit Boulanger pour m'avoir accueilli au sein du département MCMF de l'Institut Néel afin de travailler sur l'étude présentée dans ce manuscrit.

Je tiens ensuite à exprimer mes sincères remerciements à Messieurs Denis Chaumont et Stéphane Parola pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail et à Monsieur Serge Perez d'être président de ce jury de thèse. Je remercie également Mesdames Suzanne Fery-Forgues et Sophie Brasselet ainsi que Monsieur Patrice-Lucien Baldeck pour avoir bien voulu considérer ce travail.

Je remercie très chaleureusement mes directeurs de thèse, Fabien Dubois et Alain Ibanez, qui ont su me guider tout au long de ces 3 années semées d'embuches. Un immense merci pour ces discussions animées et riches en conseils et pour m'avoir accordé votre confiance ! Merci Fabien pour m'avoir initié aux mystères de la fonctionnalisation et de la purif' sur colonne mais aussi pour ces discussions autour du café sur l'avenir de la Belgique : bientôt la Wallonie avec ces bières trappistes et ces fromages sera française !! Merci Alain pour avoir su partager tes connaissances dans des domaines allant de la chimie sol-gel à la cristallogenèse, mais surtout merci pour ton accent si chantant qui me rappelle mon midi natal !

Cette thèse n'aurait pas été possible sans de nombreuses collaborations qui m'ont permis de sortir de temps en temps de ma salle de manip et de découvrir des domaines très variés allant de la synthèse de luminophores aux tests sur le petit animal en passant par les caractérisations physiques et spectroscopiques. Dans le désordre,

Messieurs Yves Usson et Alexeï Grichine qui m'ont respectivement accordée du temps et m'ont formée à la microscopie confocale et au FLIM.

Monsieur Patrice Baldeck, ainsi que toute l'équipe du MOTIV du laboratoire de spectrométrie physique de l'UJF, pour leur accueil, leur disponibilité et leur conseil sur les mesures spectroscopiques : Mathieu, Olivier, Jean, Jean-Claude.

Monsieur Denis Chaumont pour m'avoir accueilli à Dijon pour effectuer des mesures de potentiel zêta sur mes précieuses solutions.

A Madame Chantal Andraud mais aussi à Olivier Maury et Yann Bretonnière du laboratoire de Chimie de l'ENS-Lyon pour leur accueil, leur gentillesse, leur patience et leur aide durant la rédaction. Mais surtout aux thésards que j'ai traumatisé en demandant des quantités pharaoniques de produits que je détruisais sans remord car la température de four était trop élevée !!! Adrien, Julien et Quentin, je vous souhaite un bon début de 3eme année de thèse et beaucoup de courage pour la rédaction, c'est une étape difficile mais après c'est que du bonheur !

Un grand merci à Monsieur Boudewijn Van Der Sanden pour m'avoir accueillie au GIN lors des tests expérimentaux sur souris et pour avoir su trouver les mots lorsqu'on ne voyait pas de « lumière » au niveau du cerveau de l'animal.

Je n'oublie pas également Christophe Bouchard, Alain Prat et Rémi Bruyère qui m'ont permis d'avoir un super réacteur pour synthétiser mes poud'es !! Merci beaucoup pour votre disponibilité et pour m'avoir aidée, sans vous tout aurait été plus difficile.

Je remercie Sébastien Pairis pour m'avoir formée au MEB ce qui m'a permis d'avoir de magnifiques clichés de particules toutes lisses et bien sphériques mais aussi parfois des hérissons ou des balles de golf.

A Maria Bacia pour m'avoir formée au MET et m'avoir permis de visualiser le cœur cristallin de mes particules et de voir qu'il était possible d'obtenir du citron en pressant de l'orange, sacré CMONS !!!

Merci également à Cécile de la repro pour ses conseils pour avoir un poster nickel et qui m'a fait judicieusement remarquer que les titres en rouge/vert/bleu « c'est un peu scolaire » et que le mauve et le violet c'est tellement mieux !

Je remercie tous les membres de l'équipe MatONLP pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse. Grâce à eux, j'ai découvert l'optique non linéaire et les plasmons de surfaces et ils m'ont (un peu) réconcilié avec des termes physique et mathématiques synonymes de torture psychologique pour moi : tenseur, matrice, transformé de Laplace …

Un grand merci à l'ensemble des membres du MCMF qui font du bâtiment F un endroit si agréable. Je tiens à remercier les secrétaires du département pour leur gentillesse et leur aide durant ces 3 ans : Muriel, Françoise, Céline, Caroline et Valérie.

Et enfin, qu'aurait été ces 3 années de thèses sans les thésards et les post-docs !! Je tiens à vous remercier pour tous ces bons moments au labo mais aussi à l'extérieur (piscine, resto, soirées,…). Tout d'abord merci à mes co-bureaux qui ont supporté mes bavardages durant 3 ans : Julien (qui a finalement craqué au bout d'un an et demi, trop de pression, et qui a migré !), Yan (pour les débrief' sports en tout genre : hockey, foot, hand,…. Et les galères de la rédac), Marta (pour toutes ces franches rigolades), Vinicius (qui a su résister au froid et à la neige grenobloise grâce à son pantalon de ski) et Michelle (même si elle n'est pas souvent au bat F. et qu'elle préfère l'ESRF ☺). Un grand merci également à tous les autres : Houmed, Marcio, Audrey, Sandra, Issam, Pierre et Damien. Un merci tout particulier à Mariana pour les mercredis gym et à Marine (qui, après confirmation de nos mères respectives, n'est absolument pas ma sœur) pour les matins vélo/p'tit-déj, mais surtout pour les nombreux papotages autour du café, merci les filles !!!! Mais je pense également à tous ceux qui sont passés avant moi et qui se sont envolés vers des horizons plus ou moins lointain : Noélie, Greg, Emilie, Simon, Cédric, Catherine, Phung, …

La thèse est une aventure pour le thésard mais aussi pour son entourage. Je tiens donc maintenant à remercier tous ceux qui m'entourent et m'épaulent au quotidien. Je pense tout d'abord à ma famille, mes parents et mon grand-petit frère Gilles. Ils m'ont soutenue durant toutes mes études et ont su me pousser jusque dans mes derniers retranchements lorsque je baissais les bras car ils s'avaient de quoi j'étais capable. Tout simplement merci !!! Je pense également à Géraldine qui m'a suivie de loin par téléphone et qui a toujours répondu à mes très longs appels. Je te souhaite pleins de bonheur ainsi qu'à Damien et à la petite Zoé dans votre nouvelle vie parisienne. Une nouvelle fois merci à Gillou pour son séjour grenoblois de 4 mois et à Sophie pour le désormais célèbre classico gastronomique : lasagne/tiramisu. Mais également aux collègues qui sont devenus des amis à part entière : Noélie, Marine, Mariana et Greg, merci pour les sorties ciné, resto et pub !

Finalement, merci de tout mon cœur à Aurélien qui m'a permis de m'épanouir totalement et m'a fait apprécier à sa juste valeur Grenoble à travers les matchs de hockey, les journées skis bien fatigantes et les balades vélo/roller. Mais aussi pour tous ces moments, petits ou grands, en France ou ailleurs, merci !

Table des matières

Glossaire ……...……ix

Introduction Générale …….…… 1

Chapitre I : Nanocristallisation de molécules organiques en matrice sol-gel …….……..…… 15

Introduction 17

1. Les matériaux hybrides organo-minéraux 17

1.1. Généralité.....…17

1.1.1. Définition d'un matériau hybride …….…….… 17

1.1.2. Méthodes d'élaboration ……..……...……...… 19

1.1.3. Rappel sur le procédé sol-gel ……...……...……..… 20

1.2. La chimie sol-gel …….....…… 22

1.2.1. Réactions d'hydrolyse et de condensation ……..... 22

1.2.2. Réactivité des alcoxydes en fonction du pH …….……...…. 24

1.2.2.1. Catalyse à pH < 2,5……...……... 24

1.2.2.2. Catalyse à 2,5 < pH < 7……...…....…. 25

1.2.2.3. Catalyse à pH > 7…….…… 26

1.2.2.4. Bilan : structure du gel en fonction du pH ……...……. 26

1.2.3. Influence du taux d'hydrolyse ……...…….. 27

1.2.4. Influence du taux de solvant ……...……. 27

1.2.5. Nature des précurseurs ……...……..… 28

2. Synthèse de nanocristaux organiques en matrice sol-gel …….…… 29

2.1. Rappel sur la cristallogenèse ……..…. 29

2.1.1. Solubilité et sursaturation ……...……. 29

2.1.2. Nucléation et croissance ……...……. 30

2.2. Cas particulier de la nucléation et croissance en milieu confiné ……..….. 31

3. Méthodes d'élaboration des nanoparticules sol-gel …….…… 34

3.1. Contexte des travaux de recherche sur les nanocristaux moléculaires dans l'équipe …….…… 34

3.2. Idée de départ ……...……. 37

3.3. Tests préliminaires pour valider la méthode d'élaboration ……. 39

3.3.1. Montage et synthèse ……..……. 39

3.3.2. Caractérisations des produits obtenus …….……. 42

3.3.2.1. Le microscope optique ……...……. 42

3.3.2.2. Microscopie électronique à balayage …….…. 43

3.3.2.3. Le microscope électronique à transmission : mode image …..... 45

3.3.2.4. La microscopie optique confocale ……...…. 48

3.2.3. Conclusion sur les premières synthèses et caractérisations de nanoparticules hybrides ……..…. 51

Conclusion ……. 51

Bibliographie ……. 52

Chapitre II : Optimisation des conditions expérimentales et des paramètres de synthèse …… 61

Introduction ……..…….. 63

1. Séchage d'aérosol par nébulisation pneumatique …….……..... 63

1.1. Montage …….…….. 63

1.2. Test du réacteur pneumatique et contrôle des premiers résultats ……..... 66

1.3. Conclusions sur les premiers tests d'élaborations ……..……... 69

2. Optimisation des paramètres physiques du procédé de nébulisation ……..…..... 70

2.1. Impact de la pression d'azote sur la nébulisation ……...….. 71

2.2. Températures du four et du filtre électrostatique ……..……... 74

2.2.1. Optimisation et profil thermique du four ……..……..... 74

2.2.2. Utilisation du filtre électrostatique ……...….. 76

2.3. Débit du gaz vecteur : air ……..……... 78

2.4. Conclusion …….....….. 80

3. Optimisation des paramètres chimiques du procédé sol-gel …….. 81

3.1. Rôle du solvant ……..….. 81

3.2. Nature de la matrice silicatée – Choix des précurseur sol-gel ……..…..... 84

3.3. Fluorophore de référence ……...….. 87

3.3.1. Choix du fluorophore …….….. 87

3.3.2. Optimisation du taux de fluorophore…….....….. 90

3.3.3. Affinité fluorophore / matrice ……..……...…….. 93

3.3.3.1. Matrice TMOS ……..…….. 93

3.3.3.2. Matrice TMOS + MTMOS ……..……...…….... 94

3.3.3.3. Matrice TMOS + TMSE ……..……...…... 96

3.3.3.4. Matrice TMOS + BTP …...……..…... 99

3.3.4. Première mise en évidence d'un cœur cristallin CMONS…..... 100

3.3.4.1. Observation du cœur organique de CMONS au MEB …….....100

3.3.4.2. MET en mode diffraction électronique ……..…….. 102

3.4. Conclusion ……...……... 106

4. Elaboration de nanoparticules hybrides avec d'autres types de fluorophores ... 107

4.1. Les molécules organiques …….. 107

4.2. 4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4*H*-pyran...108

4.3. Le 1,4-Bis[1-cyano-2-(4-diphenylamino)phenyl)vinyl]benzene …..…….. 109

4.3.1. Nanocristallisation du COPVB dans la matrice silicatée ……..... 111

4.3.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE ……..……..….. 111

4.3.1.2. Matrice 8 TMOS + 1 BTP ……..……...….. 113

4.3.2. Conclusion ……..….. 113

4.4. Les composés dicyanoisophorones et tricyanoisophorones ……..……. 114

4.5. Conclusion …….....….. 116

Conclusion du chapitre ……..….. 117

Bibliographie ……..….. 118

Chapitre III : Caractérisations physico-chimiques et spectroscopiques des nanoparticules ……..…. 123

Introduction ……..….. 125

1. Dispersion des nanoparticules en solution ……...…….. 125

1.1. Stabilité colloïdale ……..……...….. 125

1.2. Dispersion des nanoparticules ……...….. 127

1.2.1. Dispersion en milieu aqueux ou tampon biologique ……....….. 127

1.2.2. Dispersion en milieu alcalin ……..……...….. 128

1.2.3. Sélection en taille …….....…….. 129

1.3. Caractérisation des charges de surface et de la dispersion des nanoparticules ……..…..……..…..….. 131

1.3.1. Mesure ……..……..……..…….. 132

1.3.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE ……..…….. 132

1.3.1.2. Matrice 8 TMOS + 1 BTP ……...……...….. 134

1.4. Conclusion ……..……..…….…..... 135

2. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules hybrides ……..…….. 136

2.1. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules de CMONS ..…..... 136

2.1.1. Estimation de la concentration molaire en CMONS des solutions ..136

2.1.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du CMONS ….. 139

2.1.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du CMONS encapsulé en matrice sol-gel ……..……...…….. 142

2.1.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de CMONS …... 143

2.1.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de CMONS ……..……...……..... 144

2.1.6. Mesures en FLIM des nanoparticules ……..…..….. 146

2.1.7. Conclusion sur le CMONS cristallin inséré en coquilles silicatées …….147

2.2. Caractérisation spectroscopique de fluorescence à un photon de nanoparticules de COPVB en coquille silicatée ……..……..…... 147

2.2.1. Estimation de la concentration molaire des solutions en COPVB encapsulé en matrice sol-gel ……..……...…….. 147

2.2.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du COPVB 148

2.2.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du COPVB encapsulé en matrice sol-gel ……...…... 150

2.2.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de COPVB …..... 150

2.2.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de COPVB ……...……...…... 151

2.2.6. Conclusion sur le COPVB cristallin dans les coquilles silicatées ..153

Conclusion ……..….. 153

Bibliographie ……..….. 154

Chapitre IV : Conception de traceurs biologiques ……..…….157

Introduction …… 159

1. Tests préliminaires : nanoparticules dans des systèmes biologiques ……..... 159

1.1. Développement cellulaire en présence de nanoparticules ……..... 160

1.2. Stabilité colloïdale dans le sang de souris ……..... 162

2. Application *in-vivo* : test d'angiographie cérébrale ……..... 164

2.1. Méthode d'observation ……..... 164

2.2. Préparation des animaux ……..... 165

2.3. Visualisation de la microvascularisation ……..... 166

2.3.1. COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE ……..... 166

2.3.2. COPVB encapsulé dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP ……..... 168

2.4. Conclusion ……..... 169

3. Modification de surface des nanoparticules : application *in-vitro* et augmentation de la furtivité *In-vivo* ……..... 169

3.1. Intéraction biotine-stréptavidin ……..... 170

3.1.1. Synthèse de nanoparticules aminées (NP-NH_2) ……..... 171

3.1.1.1. Mode opératoire ……..... 171

3.1.1.2. Mesure du potentiel zêta ……..... 172

3.1.1.3. Test avec des billes de latex-streptavidine ……..... 173

3.2. Ciblage des intégrines αvβ3 par des nanoparticules fonctionnalisées par un peptide RGD ……..... 175

3.2.1. Synthèse de nanoparticules thiolées (NP-SH) ……..... 176

3.2.1.1. Mesure potentiel zêta ……..... 177

3.2.1.2. Tests d'interactions NP-RGD-integrines αvβ3 ……..... 178

3.2.2. Conclusion ……..... 180

3.3. Réaction de pégylation des nanoparticules ……..... 180

3.3.1. Couplage de PEG sur les NP-SH ……..... 181

3.3.2. Premières observations ……..... 182

3.3.3. Perspectives ……..... 184

Conclusion ……..... 184

Bibliographie 185

Chapitre V : Insertion de complexes de terres rares …… 187

Introduction …… 189

1. Les complexes de Lanthanides …… 189

2. Insertion des complexes de lanthanides dans les nanoparticules silicatées …… 190

2.1. Le complexe d'Europium : $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ …… 191

2.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE …… 193

2.1.2. Caractérisations préliminaires des particules dopées …… 195

2.1.3. Optimisation de la coquille silicatée …… 197

2.1.3.1. Effet de la proportion en alcoxyde réticulant TMOS …… 199

2.1.3.2. Stabilité en solutions biologiques …… 202

2.1.4. Conclusion …… 204

2.2. Le complexe d'ytterbium : $[NBu_4]_3Yb(DPA\text{-}NPEG)_3$ …… 205

2.2.1. Matrice 8 TMOS + 1 BTP …… 206

2.2.1.1. Spectroscopie de luminescence sur poudre …… 206

2.2.1.2. Stabilité en solutions biologiques …… 207

2.2.2. Conclusion sur l'insertion du complexe d'ytterbium …… 208

Conclusion sur le chapitre …… 208

Bibliographie …… 210

Conclusion générale …… 213

Annexes …… 221

Glossaire

APTES	3-aminopropyl-triethoxysilane
BTP	1,16-bis(triméthoxysilyl)4,7,10,13-tétrahexadécane
CMONS	cyano-méthoxy-nitro-stylbène
COPVB	cyano-oligo-phénylène-vinylène-benzène
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MET	Microscope Electronique en Transmission
MPS	3-(mercaptopropyl)-triméthoxysilane
MTMOS	Méthyltriméthoxysilane
TMOS	Tétraméthoxysilane
TMSE	1,2-bis(triméthoxysilyl)éthane

Introduction Générale

Depuis un soir de novembre 1896 où Wilhlem Röntgen a imagé pour la première fois à l'aide de Rayons X la main de sa femme, l'imagerie médicale n'a pas cessé d'évoluer au travers des différentes avancées scientifiques en électronique, informatique et plus récemment en nanotechnologie [1]. Les progrès substantiels obtenus ces dernières années pour fabriquer des nanoparticules et la compréhension de leurs propriétés physico-chimiques uniques ont fortement intéressé les scientifiques. Ceci s'est traduit par une explosion du nombre de brevets déposés, plus de 20.000 pour la seule année 2004 dans le domaine des nanotechnologies pour la détection biologique et chimique [2-8]. L'élaboration de nouveaux agents imageants polyfonctionnels va pouvoir être intégrées au développement de la nouvelle génération d'outils thérapeutiques mais également à celle des techniques d'imagerie pour faciliter les diagnostics [2-8].

Il existe de nombreuses techniques d'imagerie médicale utilisées cliniquement : la tomographie (CT) [9, 10], l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) [11, 12], la tomographie par émission de positron (PET), la tomographie par émission d'un photon (SPECT) [13, 14], l'ultra-sonographie (US) ou encore l'imagerie optique [13, 15].Toutes ces techniques sont différentes en terme de sensibilité et de résolution, mais également au niveau du temps d'acquisition. Elles sont généralement complémentaires et dépendent du type d'analyses ou d'informations recherchées [16-20]. L'imagerie optique est une technique très versatile [13, 21-26] et de nombreux agents de contraste sont envisageables pour imager en fonction de différents paramètres : intensité de fluorescence, longueur d'onde de fluorescence, polarisation de fluorescence [27], interférence [28, 29], durée de vie ou encore par effet non-linéaire du second ordre [26]. La méthode d'imagerie par microscopie de fluorescence est le mode d'imagerie optique le plus répandu et le plus efficace. Il peut être utilisé à la fois dans le cas de spécimens biologiques in-vitro et in-vivo. L'avantage de la microscopie de fluorescence est de pouvoir faire varier la longueur d'onde d'émission en sélectionnant différents fluorophores se trouvant dans le traceur [30]. Ceci est un paramètre très important car lorsqu'on souhaite imager in-vivo à l'aide de la microscopie optique de fluorescence, il faut s'affranchir de trois choses : l'autofluorescence [31] ainsi que de l'absorption et la diffusion des tissus [32]. En effet, il existe des critères de sélection des marqueurs lorsqu'on travaille in-vivo et plus spécifiquement sur le petit animal. En effet, les capacités d'un tissu biologique à absorber ou diffuser la lumière varient en fonction de la longueur d'onde des photons, mais également en fonction de la nature de ce tissu, figure 1 [32]. D'autre part, les tissus ainsi que les cellules possèdent

naturellement une autofluorescence, figure 2 [31]. Au vu des figures 1 et 2, il semble que l'imagerie optique de fluorescence in-vivo et in-vitro soit plus aisée dans la partie rouge du spectre visible et le proche IR, entre 600 et 1100 nm, appelée également fenêtre biologique, où l'absorption des tissus (figure 1) et l'autofluorescence (figure 2-c et 2-d) sont faibles.

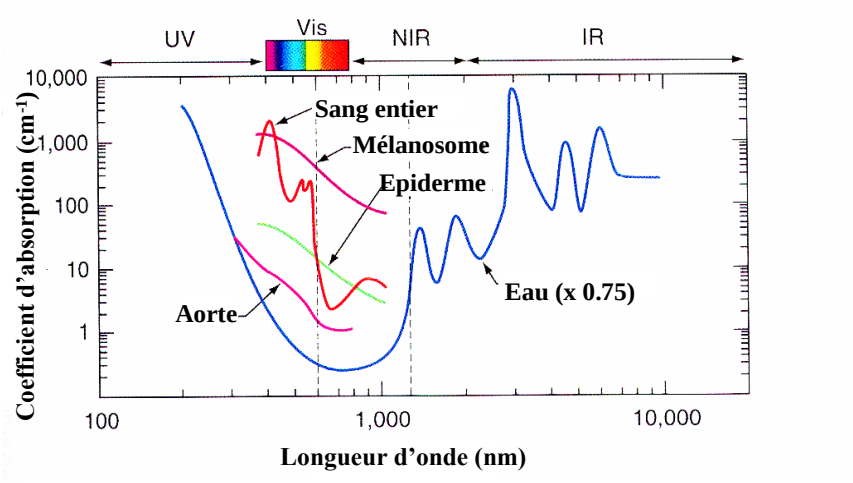


Figure 1 - Exemples de propriétés d'absorption de certains tissus en fonction de la longueur d'onde [32].

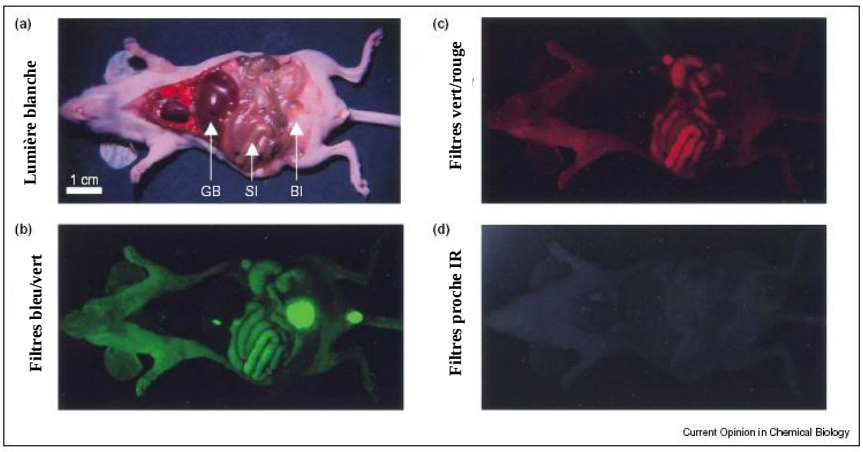


Figure 2 - Propriétés d'auto-fluorescence des tissus pour différents organes et sous différentes longueurs d'onde [31].

Il existe différentes familles de traceurs pour l'imagerie médicale par luminescence qui sont principalement tous des marqueurs dits « exogènes » [30]. Ceci signifie que les molécules ou les nanoparticules luminescentes qui seront utilisées comme agent de contraste sont étrangères à la cellule, au tissu ou au petit animal que l'on souhaite étudier par imagerie. Ces traceurs peuvent être regroupés en trois grandes catégories : les nanocristaux semi-

conducteurs luminescents ou « quantum dots », les nanocristaux d'oxydes de terres rares dopés et les nanoparticules de silice ou de polymère incorporant ou fonctionnalisées par les molécules organiques ou des complexes de terres rares [30].

- Les nanocristaux semi-conducteurs ont des propriétés optiques très attrayantes. Ce sont des nanocristaux inorganiques de taille nanométrique composés d'un noyau semi-conducteur inorganique luminescent (CdS, CdSe, ZnO, InP, InAS, …) de taille comprise entre 2 et 8 nm et d'une coquille inorganique de semi-conducteur à plus large bande interdite (ZnS) ce qui permet d'augmenter le rendement quantique et limiter les effets de défauts de surface. Cependant, il est nécessaire de passer par une étape de fonctionnalisation de ces nanoparticules cœur-coquille pour limiter leur toxicité [33-37].

- Les nanocristaux d'oxydes de terres rares dopées ont des tailles comprises entre 100 et 150 nm. Ils sont composés d'oxydes ou oxysulfures de terres rares tels que l'oxyde d'yttrium, de vanadium ou de gadolinium. Pour leur conférer des propriétés optiques, ces oxydes sont dopés avec des ions luminescents, majoritairement des cations lanthanides [38-40]. Ces nanocristaux possèdent des caractéristiques optiques très proches de celles des complexes de lanthanides, à savoir un déplacement de Stokes important et des durées de vie de luminescence longues (µs – ms) [38-43]. Comme dans le cas précédent, il est nécessaire de passer par une étape de fonctionnalisation qui se déroule en deux temps : d'abord une silanisation de la surface des nanoparticules suivie d'un greffage de biomolécules [41-43].

- Les nanoparticules de silice ou de polymères encapsulant ou fonctionnalisées par des fluorophores sont la dernière sorte de sonde optique envisagée pour l'imagerie médicale de fluorescence. Les particules polymériques, utilisées généralement pour des applications in-vitro, sont le plus souvent de taille micrométrique (1 – 5 µm) et sont constituées d'une matrice polymère organique telle que le polystyrène ou le poly-méthylmétacrylate [44-46]. Les fluorophores sont piégés dans la matrice au cours de la synthèse ou postérieurement par gonflement du polymère et diffusion des molécules organiques à l'intérieur de la matière [44, 47-51]. Une autre méthode consiste à polymériser directement un monomère marqué par un fluorophore organique. Les particules peuvent être ensuite fonctionnalisées par des biomolécules. En ce qui concerne les particules de silice, elles sont dans la majorité des cas obtenues par la synthèse de Stöber modifiée [52-55]. Cette synthèse consiste en l'hydrolyse d'alcoxydes de silicium en présence du fluorophore à encapsuler dans la matrice silicatée en créant une microémulsion grâce à un

surfactant. Cette méthode permet de contrôler la taille des particules en la faisant varier de 20 à 1000 nm [20, 56-67] où le fluorophore est dispersé dans la matrice [47, 48]. Les procédés de greffage sur la silice étant connus, la surface des particules est facilement fonctionnalisée par des biomolécules. Cependant, la synthèse de Stöber inversée [52-55] s'effectue en deux temps et la quantité de nanoparticules produite est relativement faible avec un taux d'insertion en fluorophore limité. De plus, les molécules organiques sont dispersées dans la matrice et sont donc plus sensibles au photoblanchiment [48].

Nous nous sommes donc basés sur cet état de l'art pour développer un nouveau type de sonde optique en utilisant une technique originale de séchage d'aérosol [68]. Les nanoparticules sont des matériaux hybrides constitués d'une matrice silicatée amorphe et d'un fluorophore (molécules organiques ou complexes de terres rares) dont nous allons faire varier la nature en fonction des applications visées. En effet, dans ce travail de thèse les deux applications visées pour les nanoparticules sont:

- Une application comme agent imageant *in-vivo* pour l'angiographie du cortex cérébral du petit animal par fluorescence excitée à deux photons sous balayage laser femtoseconde.
- Une application *in-vitro* pour l'imagerie des tissus épais dans le proche infrarouge.

Dans le premier cas, nous utiliserons comme fluorophores des molécules organiques [47, 48] qui formeront un nanocristal au centre des nanoparticules silicatées. Ces molécules ont des durées de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde ce qui convient à la technique d'imagerie à balayage laser. Certaines molécules organiques sont fluorescentes dans l'état cristallin, ce qui nous permet de moduler les propriétés optiques de ce type de traceurs (longueur d'onde d'émission, effet non linéaire, …). Le choix des molécules organiques est primordial car nous souhaitons obtenir des nanoparticules hybrides constituées d'un cœur organique cristallin et d'une coquille silicatée amorphe. L'avantage par rapport à la méthode de Stöber inversée [52-55] est que le fluorophore est cristallisé dans la nanoparticule, ce qui lui confère une meilleure stabilité photochimique donc une bonne résistance au photoblanchiment [48]. De plus, le cœur cristallin est composé de 10^5 à 10^8 molécules, selon sa taille et celle des molécules, ce qui conduit à des sections efficaces d'absorption et d'émission importantes, d'où un signal en fluorescence intense. Afin de s'affranchir des problèmes d'autofluorescence et d'absorption des tissus [31, 32], nous

avons choisi de travailler avec des molécules organiques cristallines fluorescentes à deux photons, figure 3. Cette technique permet d'exciter les fluorophores dans le proche infrarouge, λ = 800 nm, ce qui réduit l'absorption du faisceau laser incident par les tissus mais également d'avoir un décalage suffisant entre l'excitation et l'émission de fluorescence pour éviter les problèmes de réabsorption contrairement à une excitation monophotonique.

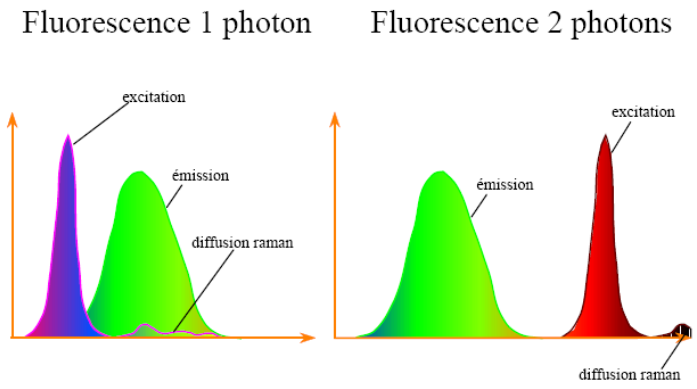


Figure 3 - Représentation schématique de l'excitation à un ou deux photons d'un fluorophore suivie de l'émission de fluorescence.

La coquille silicatée apporte quant à elle une bonne biocompatibilité au traceur [51, 69, 70] et la possibilité de fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec des biomolécules [71-74, 67]. De plus, la matrice silicatée est transparente ce qui permet à la lumière d'excitation et d'émission de traverser la coquille sol-gel sans générer une perte significative du signal [70].

Afin de considérer ces nanoparticules comme agents imageant *in-vivo* potentiels, il faut qu'elles réunissent deux conditions pour en faire des traceurs très luminescents et furtifs. D'une part, il est primordial que le fluorophore utilisé fluoresce dans l'état cristallin. D'autre part, le diamètre des particules doit être compris entre 20 et 100 nm afin qu'elles restent dans la circulation sanguine sans diffuser à travers les parois des vaisseaux et sans être reconnues comme corps étranger par le système immunitaire. Les nanoparticules présentent de plus l'avantage de posséder une coquille silicatée fonctionnalisable. Ainsi, des fonctions PEG (polyéthylèneglycol) pourront être greffées en surface afin d'améliorer les propriétés de furtivité des nanoparticules dans la circulation sanguine.

Dans le second type d'application, concernant l'imagerie in-vitro dans le proche IR des tissus épais, les luminophores utilisés sont des complexes de terres rares. Ils ont la particularité d'avoir un déplacement de Stokes très important entre l'excitation et l'émission ce qui évite tout risque de réabsorption [75-78]. D'autre part, l'émission de luminescence s'effectue généralement dans le rouge et le proche IR, c'est-à-dire pleinement dans la fenêtre biologique (600 – 1100 nm, figure 1) où l'autofluorescence [31] et l'absorption des tissus [32] sont très faibles. De plus, les lanthanides possèdent des durées de vie de luminescence relativement longues (µs – ms) ce qui permet également de les utiliser dans le cadre d'imagerie en microscopie de luminescence retardée dans le temps [76]. Dans ce cas, le temps d'acquisition des images est différé par rapport à l'excitation, ce qui permet de collecter uniquement le signal de luminescence dû à l'ion lanthanide en s'affranchissant de toutes réponses biologiques parasites, en particulier l'autofluorescence dont la durée de vie de fluorescence est nettement plus courte (~ ns). Dans ce cas, les complexes de terres rares seront dispersés dans la matrice silicatée qui permet de les stabiliser et de les protéger de l'eau.

Afin d'obtenir des traceurs efficaces pour l'imagerie *in-vitro*, il est nécessaire que les nanoparticules aient des diamètres compris entre 20 et 100 nm, comme dans le cas des applications *in-vivo*. Mais, il est également primordial que la matrice silicatée insérant le luminophore présente une porosité fermée pour éviter la diffusion de l'eau dans les particules pouvant entraîner la dissociation totale ou partielle des complexes de terres rares dispersés dans la matrice silicatée.

Ce mémoire de thèse comporte cinq chapitres :

- Dans le 1er chapitre, nous présenterons la méthode d'élaboration des nanocristaux organiques en matrice sol-gel. Dans un premier temps, nous définirons la notion de matériaux hybrides organo-minéraux, puis nous détaillerons le procédé de chimie sol-gel. Nous exposerons ensuite comment les nanocristaux organiques nucléent et croissent dans les pores de matrices sol-gel silicatées confinées en gouttelettes.

- Le 2ème chapitre sera consacré au développement et à l'optimisation de la méthode d'élaboration des nanoparticules hybrides. Pour cela, nous détaillerons à la fois les paramètres physiques et chimiques de la synthèse afin d'obtenir des nanoparticules hybrides qui présentent une distribution de taille relativement étroite et constituées d'un cœur organique cristallin confiné dans une coquille silicatée.

- Dans le 3ème chapitre, nous présenterons l'optimisation des conditions de dispersion des nanoparticules ainsi que les caractérisations en spectroscopie de fluorescence au vu des futures applications comme sonde optique à deux-photons.

- Le 4ème chapitre sera consacré aux premiers tests *in-vivo* des nanoparticules en temps que traceurs sur le petit animal, mais également aux premiers essais de fonctionnalisation de la surface des nanoparticules. Ces essais permettront d'augmenter non seulement la furtivité des nanoparticules mais aussi de combiner d'autres propriétés rendant possible par exemple le ciblage de cellules cancéreuses.

- Le 5ème chapitre sera quant à lui dédié à l'insertion de complexes de terres rares dans les particules silicatées afin de les stabiliser en milieux aqueux en évitant leur dissociation. Dans ce cas, les complexes de lanthanide seront dispersés au sein de la matrice sol-gel et non plus sous la forme d'un cœur cristallin car ces luminophores présentent des efficacités de luminescence très élevées par le biais d'effet d'antenne des ligands qui transfèrent très efficacement l'énergie absorbée vers l'ion lanthanide.

Une conclusion permettra enfin de dégager les principaux points forts de ce travail et de définir les perspectives à venir.

Bibliographie de l'Introduction Générale

1. Sharrna, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S., and Moudgil, B., *Nanoparticles for bioimaging*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **123**: p. 471-485.
2. *Micro and Nanotechnology comercialization eduction foundation*. Roadmap 2nd Edition, 2004(http://www.mancef.org).
3. Hochella, M. F., *Nanoscience and technology the next revolution in the Earth sciences.* Earth and Planetary Science Letters, 2002. **203**(2): p. 593-605.
4. http://www.biotechsystems.com.
5. Mazzola, L., *Commercializing nanotechnology* Nature Biotechnology, 2003. **21**(10): p. 1137-1143.
6. Murray, C. B., Kagan, C. R., and Bawendi, M. G., *Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies.* Annual Review of Materials Science, 2000. **30**: p. 545-610.
7. Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., Sinkula, M., *Investing in nanotechnology*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(10): p. 1144 - 1147.
8. Roco, M. C. and Bainbridge, W. S., *Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit*. Journal of Nanoparticle Research, 2005. **7**(1): p. 1-13.
9. Mahmood, U., *Near-infrared optical application in molecular imaging*. IEEE Eng Biol Mag, 2004. **23**(4): p. 58-66.
10. Mahmood, U. and Weissleder, R., *Some tools for molecular imaging*. Academic Radiology, 2002. **9**(6): p. 629-631.
11. Hogemann, D. and Basilion, J. P., *"Seeing inside the body": MR imaging of gene expression.* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2002. **29**(3): p. 400-408.
12. Hogemann, D., Basilion, J. P., and Weissleder, R., *Molecular imaging techniques in magnetic resonance imaging and nuclear imaging*. Radiologe, 2001. **41**(2): p. 116-+.
13. Pomper, M. G., *Molecular imaging: An overview.* Academic Radiology, 2001. **8**(11): p. 1141-1153.
14. Pomper, M. G., Hammound, D.A., *Positron emission tomography in molecular imaging*. IEEE Eng Biol Mag, 2004. **23**(4): p. 28-37.
15. Bremer, C., Ntziachristos, V., Mahmood, U., Tung, C. H., and Weissleder, R., *Advances in optical imaging.* Radiologe, 2001. **41**(2): p. 131-+.
16. Kayyem, J. F., Kumar, R. M., Fraser, S. E., and Meade, T. J., *Receptor-targeted cotransport of DNA and magnetic-resonnance contrast agents* Chemistry & Biology, 1995. **2**(9): p. 615-620.
17. Kircher, M. F., Mahmood, U., King, R. S., Weissleder, R., and Josephson, L., *A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation.* Cancer Research, 2003. **63**(23): p. 8122-8125.
18. Liang, Z. P., *Unification of the inverse radon transform in odd and even dimensions.* Ieee Transactions on Medical Imaging, 1995. **14**(4): p. 757-758.
19. Moats, R. A., Fraser, S. E., and Meade, T. J., *A "smart" magnetic resonance imaging agent that reports on specific enzymatic activity*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1997. **36**(7): p. 726-728.
20. Santra, S., Bagwe, R. P., Dutta, D., Stanley, J. T., Walter, G. A., Tan, W., Moudgil, B. M., and Mericle, R. A., *Synthesis and characterization of fluorescent, radio-*

opaque, and paramagnetic silica nanoparticles for multimodal bioimaging applications. Advanced Materials, 2005. **17**(18): p. 2165-2169.
21. Alivisatos, P., *The use of nanocrystals in biological detection.* Nature Biotechnology, 2004. **22**(1): p. 47-52.
22. Licha, K. and Olbrich, C., *Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(8): p. 1087-1108.
23. Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L. H. V., and Weissleder, R., *Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging.* Nature Biotechnology, 2005. **23**(3): p. 313-320.
24. Rudin, M. and Weissleder, R., *Molecular imaging in drug discovery and development.* Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(2): p. 123-131.
25. Weissleder, R., Ntziachristos V., *Shedding light onto live molecular targets.* Nature Medicine, 2003. **9**(1): p. 123-128.
26. Weissleder, R. and Mahmood, U., *Molecular imaging.* Radiology, 2001. **219**(2): p. 316-333.
27. Demos, S. G., Radousky, H. B., and Alfano, R. R., *Deep subsurface imaging in tissues using spectral and polarization filtering.* Optics Express, 2000. **7**(1): p. 23-28.
28. Dunn, A. K., Bolay, T., Moskowitz, M. A., and Boas, D. A., *Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle.* Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2001. **21**(3): p. 195-201.
29. Tearney, G. J., Brezinski, M. E., Bouma, B. E., Boppart, S. A., Pitris, C., Southern, J. F., and Fujimoto, J. G., *In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography.* Science, 1997. **276**(5321): p. 2037-2039.
30. Roncali, E., Tavitian, B., Texier, I., *Les marqueurs.* http://www.ist.cea.fr/publicea/exl-doc/20050000/25/.doc, 2005.
31. Frangioni, J. V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging.* Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 626-634.
32. Vo-Dinh, T., *Biomedical photonics handbook*, ed. Press, D. C. 2003.
33. Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X. H., Bailey, R. E., Han, M. Y., and Nie, S. M., *Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging.* Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(1): p. 40-46.
34. Gao, X. H., Yang, L. L., Petros, J. A., Marshal, F. F., Simons, J. W., and Nie, S. M., *In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots.* Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(1): p. 63-72.
35. Green, M., *Semiconductor quantum dots as biological imaging agents.* Angewandte Chemie-International Edition, 2004. **43**(32): p. 4129-4131.
36. Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., and Weiss, S., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics.* Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
37. Smith, A. M., Gao, X. H., and Nie, S. M., *Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging.* Photochemistry and Photobiology, 2004. **80**(3): p. 377-385.
38. Auzel, F., *Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids.* Chemical Reviews, 2004. **104**(1): p. 139-173.
39. Ostermay.Fw, *Preparation and properties of infrared-to-visible concersion phosphors.* Metallurgical Transactions, 1971. **2**(3): p. 747-&.
40. Zijlmans, H., Bonnet, J., Burton, J., Kardos, K., Vail, T., Niedbala, R. S., and Tanke, H. J., *Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting*

phosphors: A new reporter technology. Analytical Biochemistry, 1999. **267**(1): p. 30-36.

41. Corstjens, P., Zuiderwijk, M., Nilsson, M., Feindt, H., Niedbala, R. S., and Tanke, H. J., *Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay.* Analytical Biochemistry, 2003. **312**(2): p. 191-200.
42. Niedbala, R. S., Feindt, H., Kardos, K., Vail, T., Burton, J., Bielska, B., Li, S., Milunic, D., Bourdelle, P., and Vallejo, R., *Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology.* Analytical Biochemistry, 2001. **293**(1): p. 22-30.
43. van de Rijke, F., Zijlmans, H., Li, S., Vail, T., Raap, A. K., Niedbala, R. S., and Tanke, H. J., *Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays.* Nature Biotechnology, 2001. **19**(3): p. 273-276.
44. Santra, S., Xu, J. S., Wang, K. M., and Tan, W. H., *Luminescent nanoparticle probes for bioimaging.* Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2004. **4**(6): p. 590-599.
45. Laurencin, C. T., Botchwey, E. A., Baba, K., Ohulchanskyy, T. Y., Zheng, Q. D., Lin, T. C., Bergey, E. J., and Prasad, P. N., *Infrared emitting dye and/or two photon excitable fluorescent dye encapsulated in biodegradable polymer nanoparticles for bioimaging*. *Nanoscale Materials Science in Biology and Medicine*. 2005. p. 209-214.
46. Li, Z. F. and Ruckenstein, E., *Water-soluble poly(acrylic acid) grafted luminescent silicon nanoparticles and their use as fluorescent biological staining labels.* Nano Letters, 2004. **4**(8): p. 1463-1467.
47. Haugland, R., *Handbook of fuorescent probes and research products, 9th edition*, ed. Inc, M. P. 2002.
48. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy, 2nad edition*. 1999, New York: Kluwer Academics/Plenum Publisher.
49. Gaponik, N., Radtchenko, I. L., Sukhorukov, G. B., Weller, H., and Rogach, A. L., *Toward encoding combinatorial libraries: Charge-driven microencapsulation of semiconductor nanocrystals luminescing in the visible and near IR.* Advanced Materials, 2002. **14**(12): p. 879-882.
50. Han, M. Y., Gao, X. H., Su, J. Z., and Nie, S., *Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules.* Nature Biotechnology, 2001. **19**(7): p. 631-635.
51. Rosi, N. L. and Mirkin, C. A., *Nanostructures in biodiagnostics.* Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1547-1562.
52. Stober, W., Fink, A., and Bohn, E., *Controlled growth of monodisperse silica spheres in micron size range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62-69.
53. Vanblaaderen, A., Vangeest, J., and Vrij, A., *Monodisperse colloidal silica spheres from tetra-alkoxysilane - particle formation and growth mechanism.* Journal of Colloid and Interface Science, 1992. **154**(2): p. 481-501.
54. Vanblaaderen, A. and Vrij, A., *Synthesis and characterization of colloidal dispersion of fluorescent, monodisperse silica spheres.* Langmuir, 1992. **8**(12): p. 2921-2931.
55. Vanblaaderen, A. and Vrij, A., *Synthesis and characterization of monodisperse colloidal organo-silica spheres.* Journal of Colloid and Interface Science, 1993. **156**(1): p. 1-18.

56. Battersby, B. J., Lawrie, G. A., Johnston, A. P. R., and Trau, M., *Optical barcoding of colloidal suspensions: applications in genomics, proteomics and drug discovery.* Chemical Communications, 2002(14): p. 1435-1441.
57. Burns, A., Ow, H., and Wiesner, U., *Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology*. Chemical Society Reviews, 2006. **35**(11): p. 1028-1042.
58. Burns, A. A., Zedayko, T. C., Herz, E., Sengupta, P., Baird, B., and Wiesner, U., *Fluorescent silica nanoparticles: Novel architectures with enhanced functionality.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2005. **230**: p. 309-COLL.
59. Fuller, J. E., Zugates, G. T., Ferreira, L. S., Ow, H. S., Nguyen, N. N., Wiesner, U. B., and Langer, R. S., *Intracellular delivery of core-shell fluorescent silica nanoparticles*. Biomaterials, 2008. **29**(10): p. 1526-1532.
60. Garcia, C. B. W., Zhang, Y. M., Mahajan, S., DiSalvo, F., and Wiesner, U., *Self-assembly approach toward magnetic silica-type nanoparticles of different shapes from reverse block copolymer mesophases.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(44): p. 13310-13311.
61. Herz, E., Ow, H., Bonner, D., Burns, A., and Wiesner, U., *Dye structure-optical property correlations in near-infrared fluorescent core-shell silica nanoparticles.* Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(35): p. 6341-6347.
62. Larson, D. R., Heikal, A., Ow, H., Srivastava, M., Wiesner, U., Baird, B., and Webb, W. W., *Development of fluorescent silica nanoparticles for biological imaging*. Biophysical Journal, 2003. **84**(2): p. 586A-586A.
63. Osinski, M., Yamamoto, K., Jovin, T. M., Herz, E., Burns, A., Lee, S., Sengupta, P., Bonner, D., Ow, H., Liddell, C., Baird, B., and Wiesner, U., *Fluorescent core-shell silica nanoparticles: An alternative radiative materials platform. Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications*. 2006.
64. Ow, H., Larson, D., Srivastava, M., Webb, W. W., Baird, B., and Wiesner, U., *Fluorescent silica nanoparticles for nanoscale biological imaging.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2003. **225**: p. 208-COLL.
65. Ow, H., Larson, D. R., Srivastava, M., Baird, B. A., Webb, W. W., and Wiesner, U., *Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles.* Nano Letters, 2005. **5**(1): p. 113-117.
66. Ow, H. S., Srivastava, M., Larson, D., Webb, W., Baird, B., and Wiesner, U., *Synthesis and characterization of silica nanoparticles for fluorescent detection in biosensor applications.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2002. **224**: p. 114-COLL.
67. Santra S, Yang H., Stanley J.T., et al., *Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS quantum dots*. Chemical Communications, 2005. **25**: p. 3144-3146
68. Philippot C., Marcellin N., Djurado E., Ibanez A., *Nanocristaux fluorescents enrobés d'une coquille silicatée inorganique.* FR N°08/51830; Ref PCT/FR2009/000294, 2009.
69. Smith, P. W., *Fluorescence emission-based detection and diagnosis of malignancy.* Journal of cellular biochemistry, 2002. **Suppl. 39**: p. 54-59.
70. Velikov KP, van Blaaderen A., *Synthesis and characterization of monodisperse core-shell colloidal spheres of zinc sulfide and silica*. Langmuir, 2001. **17**(16): p. 4779-4786.
71. Qhobosheane M, Santra S., Zhang P, Tan, W.H., *Biochemically functionalized silica nanoparticles.* Analyst, 2001. **126**(8): p. 1274-1278.

72. Qhobosheane M, Z. P., Tan WH, *Assembly of silica nanoparticles for two-dimensional nanomaterials.* Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2004. **4**(6): p. 635-640.
73. Santra, S., Zhang, P. Wang, K.M., Tapec, R., Tan, W.H., *Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers.* Analytical Chemistry, 2001. **73**(20): p. 4988-4993.
74. Santra, S., Wang, K.M., Tapec, R., Tan, W.H., *Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application*. Journal of Biomedical Optics, 2001. **6**(2): p. 160-166.
75. Hemmila, I., Harju, R., *Chapter 5, in bioanalytical applications of labeling technologies,* ed. Hemmila, I., Stahlberg, T., Morttram, P. Editors. 1995: Walac Oy and EG&G Cie Pb.
76. Hemmila, I. and Webb, S., *Time-resolved fluorometry: an overview of the labels and core technologies for drug screening applications.* Drug Discovery Today, 1997. **2**(9): p. 373-381.
77. Piszczek, G., Gryczynski, I., Maliwal, B. P., and Lakowicz, J. R., *Multi-photon sensitized excitation of near infrared emitting lanthanides.* Journal of Fluorescence, 2002. **12**(1): p. 15-17.
78. White, G. F., Litvinenko, K. L., Meech, S. R., Andrews, D. L., and Thomson, A. J., *Multiphoton-excited luminescence of a lanthanide ion in a protein complex: Tb3+ bound to transferrin*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(1): p. 47-55.

Chapitre I :

Nanocristallisation de molécules organiques en matrice sol-gel

Introduction **17**

1. Les matériaux hybrides organo-minéraux **17**
1.1. Généralité 17
1.1.1. Définition d'un matériau hybride 17
1.1.2. Méthodes d'élaboration 19
1.1.3. Rappel sur le procédé sol-gel 20
1.2. La chimie sol-gel 22
1.2.1. Réactions d'hydrolyse et de condensation 22
1.2.2. Réactivité des alcoxydes en fonction du pH 24
1.2.2.1. Catalyse à pH < 2,5 24
1.2.2.2. Catalyse à 2,5 < pH < 7 25
1.2.2.3. Catalyse à pH > 7 26
1.2.2.4. Bilan : structure du gel en fonction du pH 26
1.2.3. Influence du taux d'hydrolyse 27
1.2.4. Influence du taux de solvant 27
1.2.5. Nature des précurseurs 28
2. Synthèse de nanocristaux organiques en matrice sol-gel **29**
2.1. Rappel sur la cristallogenèse 29
2.1.1. Solubilité et sursaturation 29
2.1.2. Nucléation et croissance 30
2.2. Cas particulier de la nucléation et croissance en milieu confiné 31
3. Méthodes d'élaboration des nanoparticules sol-gel **34**
3.1. Contexte des travaux de recherche sur les nanocristaux moléculaires dans l'équipe 34
3.2. Idée de départ 37
3.3. Tests préliminaires pour valider la méthode d'élaboration **39**
3.3.1. Montage et synthèse 39
3.3.2. Caractérisations des produits obtenus 42
3.3.2.1. Le microscope optique 42
3.3.2.2. Microscopie électronique à balayage 43
3.3.2.3. Le microscope électronique à transmission : mode image 45
3.3.2.4. La microscopie optique confocale 48
3.2.3. Conclusion sur les premières synthèses et caractérisations de nanoparticules hybrides **51**

Conclusion **51**

Bibliographie **52**

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps donner quelques généralités et définitions sur les matériaux hybrides et sur le procédé sol-gel. Dans un deuxième temps, nous introduirons les bases de la chimie sol-gel : réactions chimiques et paramètres expérimentaux qui entrent en jeu lors de la formation du « gel ». Enfin, nous décrirons le principe et le procédé expérimental que nous avons développé dans ce travail, utilisant le procédé sol-gel et permettant la synthèse de nanoparticules hybrides constituées d'un cœur organique et d'une coquille silicatée. L'élaboration de ces nouveaux matériaux hybrides organo-minéraux basés sur la cristallisation confinée de nanocristaux organiques dans des matrices silicatées par voie sol-gel, permet d'obtenir de nouveaux types de matériaux nanocomposites. Ces matériaux combinent les propriétés à la fois de la matrice silicatée (stabilité, facilité de mise en forme) et des nanocristaux organiques (fluorescence, photostabilité).

1. Les matériaux hybrides organo-minéraux

1.1. Généralités

1.1.1. Définition d'un matériau hybride

Depuis la préhistoire les hommes ont combiné les propriétés des composants organiques et inorganiques pour élaborer des matériaux très colorés tels que des colorants stables (fresques préhistoriques, encres égyptiennes, ornements de couleur verte des céramiques chinoises, …) [1]. Néanmoins, les hybrides organo-minéraux ne sont pas de simples mélanges. Les propriétés de ces matériaux découlent non seulement des propriétés intrinsèques de chaque composant mais aussi de la nature des interactions entre les deux phases [2]. La nature de cette interface permet de diviser en deux classes ce type de matériaux :

i) Dans la classe I, la cohésion entre les composantes organiques et minérales est uniquement due aux liaisons faibles (liaisons Van der Waals ou hydrogène).

ii) Dans la classe II, les deux phases interagissent via des liaisons chimiques fortes (covalentes ou iono-covalentes).

L'un des plus beaux exemples de matériau hybride de classe I est le Bleu Maya [3, 4]. Cette couleur d'un bleu profond fut largement utilisée dès 800 avant J-C dans la Mésoamérique (Yucatan) dans l'art précolombien (sculpture, fresques murales, codex, …). En 1931, l'archéologue Raymond Edwin Merwin mit en lumière des fresques murales vieilles de 1000 ans dans le temple des guerriers sur le site de Chichen Itza dans un état de conservation parfait (figure 1).

Figure 1 - Fresque murale Maya.

Cette stabilité du Bleu Maya résulte de l'encapsulation de l'indigo, colorant organique naturel, à l'intérieur des canaux d'une argile naturelle, la paligorskite [5]. Ce matériau combine ainsi la couleur bleue du pigment organique avec la résistance de la matrice-hôte minérale, d'où son exceptionnelle conservation au fil des âges. Dans ce cas, les molécules organiques sont simplement dispersées dans la matrice minérale.

De nos jours, c'est la synthèse de matériaux hybrides de classe II qui est la plus développée : les molécules organiques sont directement greffées sur la composante minérale. Ainsi, l'interface organo-minérale permet de modifier le réseau et d'obtenir un arrangement bien spécifique des molécules greffées [6]. Ceci a permis un essor de l'utilisation des matériaux hybrides dans divers domaines : revêtements colorés décoratifs [7-9], matériaux photochromiques ou électrochromiques [10-22], revêtements pour l'industrie automobile [23], protection contre la corrosion [24-33], application pour l'optique et l'optoélectronique [34-36], conversion et le stockage de l'énergie [37-39], membrane [40-46] ou capteurs [47-57] par exemple.

1.1.2. Méthodes d'élaboration

De nombreuses voies de synthèses chimiques sont envisageables pour obtenir des matériaux hybrides dont le procédé sol-gel, l'assemblage de blocs et l'auto-assemblage (figure 2) [1].

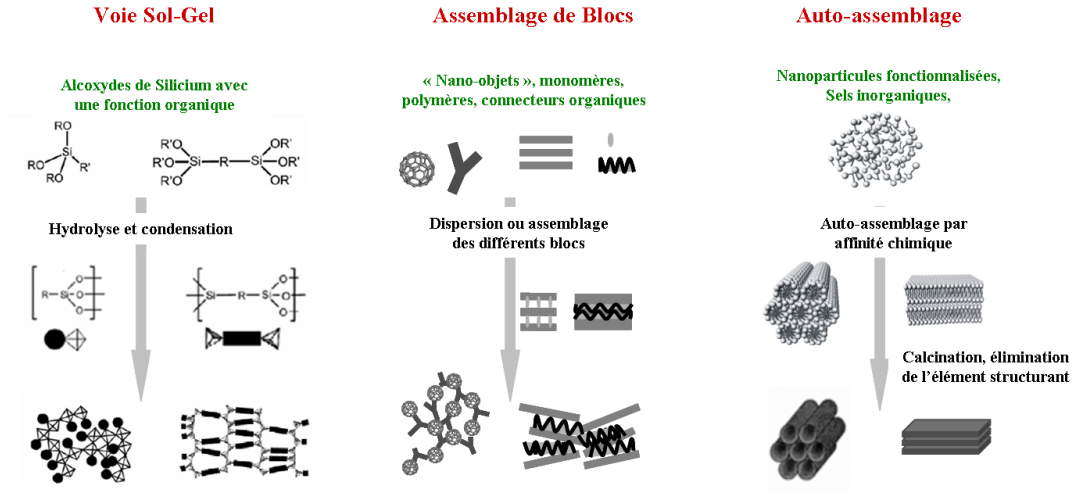


Figure 2 - Les trois voies de synthèse pour obtenir des matériaux hybrides : la voie sol-gel, l'assemblage de blocs et l'auto-assemblage.

- <u>Le procédé sol-gel</u>

En 1984, les premières expériences de D. Avnir ont montré [58] qu'il était possible de synthétiser des matériaux hybrides de classe I par chimie « douce », c'est-à-dire par une méthode sol-gel, que nous décrirons plus précisément dans le paragraphe suivant. Dans ce cas, des précurseurs moléculaires (majoritairement des alcoxydes de silicium) réagissent entre eux pour former un réseau amorphe minéral dans lequel des molécules organiques peuvent être encapsulées [6]. La structure finale du matériau dépend non seulement de la nature des précurseurs mais aussi des conditions de réaction (hydrolyse, condensation des alcoxydes). Cette méthode d'élaboration présente de nombreux avantages de part sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût. D'autre part, elle permet d'obtenir des chaînes polymériques conduisant à des gels et xérogels polymériques transparents, faciles à mettre sous forme de matériaux massifs, de couches minces ou de nanoparticules. Ce procédé permet la fabrication de matériaux hybrides de classes I ou II.

- L'assemblage de blocs

Cette méthode consiste à assembler des entités structurales parfaitement calibrées qui conservent leur intégrité dans le matériau final [6]. Il est ainsi possible de prévoir la structure et les propriétés du matériau final. Ces «blocs de construction » peuvent être des nano-objets tels que des oxydes métalliques pré ou post-fonctionnalisés et des blocs polymères [59]. Ils peuvent servir à l'encapsulation de divers types de molécules, notamment de molécules biologiques [60].

- L'auto-assemblage

Depuis les quinze dernières années, une nouvelle voie d'élaboration est explorée qui consiste à organiser la croissance de réseaux inorganiques ou hybrides grâce à l'ajout d'agents structurants organiques. Par cette méthode, il est possible de fabriquer des réseaux poreux parfaitement ordonnés. En général, le réseau à structurer est de type sol-gel. Quant à l'agent structurant il peut être de différentes natures : billes de latex (fonctionnalisées ou non) d'une centaine de nanomètres [61], tensioactifs formant des micelles qui peuvent ensuite être auto-organisées et permettre de structurer une matrice [62]. Les matériaux sont ensuite traités thermiquement de manière à rigidifier le réseau et à libérer la porosité par élimination de l'agent structurant organique. On obtient ainsi un réseau ordonné dont les caractéristiques de porosité (volume poreux, morphologie, taille, orientation et arrangement des pores) découlent directement de l'empreinte laissée par l'agent de structuration.

Dans le cas de notre étude, nous avons élaboré par voie sol-gel des matériaux hybrides de classe I faisant intervenir des interactions faibles entre la matrice minérale et les nanocristaux organiques. Nous allons à présent développer plus amplement cette méthode de synthèse.

1.1.3. Rappel sur le procédé sol-gel

- Historique

Le 25 août 1845, un chimiste français, J.J. Ebelmen, a décrit la première synthèse sol-gel au cours d'une séance de l'Académie des Sciences [63]. Il a ainsi montré que sous l'action d'une atmosphère humide, un ester silicique se solidifie en une masse transparente. Plus spécifiquement, l'hydrolyse en milieu acide d'alcoxydes de silicium ($Si(OR)_4$ où R est un groupement alkyle) mène à l'obtention d'un réseau silicaté SiO_2, présentant une très bonne transparence optique. Il a fallu ensuite près d'un siècle avant que le premier brevet

sur la technologie sol-gel soit déposé. En 1939, un premier brevet fut déposé par la société Schott Glaswerke sur le dépôt de films minces sur verre par trempage [64]. La commercialisation en 1959 de rétroviseurs utilisant ce procédé sol-gel a été suivie par la publication de nombreux brevets et applications industrielles tels que l'obtention de poudres [65], de fibres [66], de matériaux catalytiques [67], de céramiques [68] et de revêtements de verres technologiques [69]. Les nombreux progrès réalisés sur la technologie sol-gel ont permis de dynamiser divers domaines comme les hybrides organo-métalliques, les biomatériaux et même la conservation et restauration d'œuvre d'art [1].

- Définitions

Le procédé sol-gel repose sur des réactions de polymérisation entrainant la formation de réseaux de plus en plus interconnectés qui conduisent à la formation soit de réseaux continus, soit de particules colloïdales qui constituent des sols ou des gels.

Les **colloïdes** sont des suspensions constituées de particules de tailles suffisamment petites (inférieures au micromètre) de sorte que les forces gravitationnelles qui s'exercent sur elles deviennent négligeables par rapport aux forces dispersives. Il y a dans ce cas uniquement des forces à courte distance de type Van der Waals qui régissent les interactions entre les particules. Le **sol** est donc une suspension colloïdale de particules solides dans une phase liquide [70, 71]. Un **gel** est « constitué d'un réseau d'oxyde gonflé par le solvant, avec des liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui donnant un caractère rigide, non déformable (un gel peut présenter un caractère élastique, mais pas de viscosité macroscopique) » [70]. La structure d'un gel peut évoluer au cours du temps, il peut y avoir création de nouvelles liaisons (polycondensation) mais aussi rupture d'autres liaisons (redissolution). C'est un colloïde dans lequel la phase dispersée s'est combinée avec le milieu de dispersion pour former un réseau solide tridimensionnel interconnecté.

Un sol se transforme en gel en passant par un point de gélification qui correspond au moment où la viscosité du gel est infinie. La réponse mécanique du gel est alors comparable à celle d'un solide. Le temps nécessaire pour cette transition d'état est appelé **temps de gélification** et est noté t_g. Au cours du temps, le gel vieillit et le phénomène de polymérisation/réticulation conduit à la contraction du matériau et donc à l'expulsion d'une partie du solvant : c'est la **synérèse**. Le séchage des gels peut avoir lieu en conditions supercritiques où l'on dépasse le point critique du solvant, le gel est alors appelé **aérogel** [72, 73]. Ce type de séchage conduit à des matériaux très poreux. Lorsque le séchage a lieu

en conditions atmosphériques, on parle alors de **xérogel** [74, 75]. Dans ce cas, la contraction se poursuit pendant le séchage du gel. D'un côté, le solvant résiduel et les sous-produits de réaction (eau et alcools) s'évaporent générant des forces capillaires importantes. De l'autre, il reste de nombreux groupements hydroxyles -OH non-pontants pouvant se condenser par la suite entre eux. Les réactions de condensation se poursuivent donc bien après la gélification. Le réseau se densifie progressivement induisant des matériaux faiblement poreux voire très denses.

1.2. La chimie sol-gel

Dans cette partie, nous allons introduire les points les plus importants de la chimie sol-gel qui nous ont servi à contrôler l'élaboration de ce milieu de nucléation et de croissance des nanocristaux organiques. Cette description ne sera donc pas exhaustive, car ne seront présentés que les principaux mécanismes intervenant dans la préparation des nanoparticules silicatées élaborées dans cette thèse. Cependant, le contrôle des conditions de nanocristallisation confinée de la phase organique dans les nanoparticules sol-gel requiert une parfaite maîtrise de cette chimie. Le procédé sol-gel fait intervenir des précurseurs moléculaires sous forme d'alcoxydes métalliques de formule générale $R_nM(OR)_{4-n}$ où M est un métal de transition (Ti, Zr, Sn, …) ou non (Si, Y, …) et R un groupement alkyle C_nH_{2n+1}. Leur utilisation se fait le plus souvent à température voisine de l'ambiante. Les réactions chimiques à la base du procédé sont déclenchées lorsque les précurseurs sont mis en présence d'un mélange eau/solvant : dans un premier temps il se produit l'hydrolyse des groupements alcoxydes, puis dans un second temps la condensation des produits hydrolysés ce qui entraine la gélification du système.

1.2.1. Réactions d'hydrolyse et de condensation

De par leur grande différence de réactivité, les alcoxydes sont souvent divisés en deux groupes : les alcoxydes de silicium (Si : groupe p du tableau périodique) et les autres alcoxydes métalliques (alcoxydes de titane, alcoxydes de zirconium, … appartenant au groupe d du tableau périodique). Dans notre étude, nous avons choisi les alcoxydes de silicium qui ont été largement utilisés en chimie sol-gel car ils sont miscibles à un grand nombre de solvants organiques, ils présentent une bonne stabilité thermodynamique et leur réactivité avec l'eau est sensiblement plus faible que celle des autres alcoxydes métalliques [76]. En effet, la charge partielle positive de l'atome de silicium dans une molécule d'alcoxyde est nettement plus faible que celle d'un atome de zirconium ou de titane dans

les mêmes conditions. Ainsi, les réactions d'hydrolyse des alcoxydes de Si sont plus facilement contrôlables que celles des alcoxydes métalliques. Toutes les réactions chimiques seront donc maintenant écrites avec les alcoxydes de silicium et l'élaboration des matériaux correspondants concernera uniquement des nanoparticules. Les réactions chimiques se décomposent en deux étapes :

- L'hydrolyse qui correspond à la réaction d'activation.
- La condensation (ou polymérisation) qui correspond à la croissance des chaînes silicatées.

- Réaction d'hydrolyse

La réaction d'hydrolyse (1) conduit au remplacement d'un groupement alcoxyde (-OR) par un groupement hydroxyle (-OH). Elle débute dès l'ajout d'une faible quantité d'eau dans la solution et consiste en une substitution nucléophile sur l'atome de silicium avec transfert de proton et départ d'une molécule d'alcool :

$$R_3Si - OR + H_2O \rightarrow R_3Si - OH + ROH \qquad (1)$$

La réaction d'hydrolyse est généralement catalysée par un acide ou une base.

- Réactions de condensation

Les molécules hydrolysées ou partiellement hydrolysées $R_3Si–OH$ (silanols) réagissent ensuite entre elles ou avec des alcoxydes non hydrolysés pour former des ponts siloxanes Si-O-Si : c'est la condensation. Lors de la condensation, deux mécanismes entrent en compétition : l'oxolation (2) et l'alcoxolation (3) [77, 78]. L'oxolation se produit entre deux alcoxydes partiellement hydrolysés et l'alcoxolation entre un alcoxyde partiellement hydrolysé et un autre non hydrolysé. La condensation se produit donc soit par élimination d'une molécule d'eau (déshydratation, 2), soit par élimination d'une molécule d'alcool (désalcoolisation, 3).

$$R_3Si - OH + HO - SiR_3 \underset{\textit{hydrolyse}}{\overset{\textit{condensation avec formation d'eau}}{\rightleftharpoons}} - O - SiR_3 + H_2O \qquad (2)$$

$$R_3Si - OR + HO - Si\,R_3 \underset{\textit{alcoolyse}}{\overset{\textit{condensation avec formation d'alcool}}{\rightleftharpoons}} - O - SiR_3 + ROH \qquad (3)$$

Les réactions (1), (2) et (3) interviennent simultanément et conduisent à la polymérisation des silanols. Il se forme ainsi progressivement dans la solution mère un réseau interconnecté de chaînes polymères silicatées. Pour obtenir un gel polymérique, on se place dans des conditions expérimentales qui déplacent ces réactions dans le sens de la condensation limitant la réhydratation ou la ré-alcoolysation des chaînes polymères formées (réactions 2 et 3 inversées). Les cinétiques relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation vont donc régir la structure finale du réseau silicaté ainsi que sa rigidité et sa porosité. Les principaux paramètres influençant les cinétiques relatives des réactions sont le pH qui joue sur la vitesse des réactions et la charge superficielle des particules formées, la proportion d'eau et de solvant ainsi que la nature des précurseurs.

1.2.2. Réactivité des alcoxydes en fonction du pH

Les cinétiques des réactions d'hydrolyse et de condensation des alcoxydes sont très fortement influencées par le pH du milieu, ceci a fait l'objet de nombreuses études [79-82]. En effet, la modification du pH permet de moduler les propriétés physiques du matériau final (porosité, hydrophobicité, …) et impacte les propriétés physiques du xérogel obtenu.

Les mécanismes d'hydrolyse et condensation des alcoxydes peuvent être divisés en trois domaines de pH [83]: pH < 2,5 ; 2,5 < pH< 7 et pH > 7, selon les cinétiques relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation. A pH = 2,5, on se situe au point isoélectrique de la silice, c'est-à-dire que la mobilité électrique des particules de silice est nulle ou encore que la charge globale des particules est nulle [84].

1.2.2.1. Catalyse à pH < 2,5

En milieu acide, Timms propose le mécanisme d'hydrolyse présenté en figure 3. Les groupements R_n (n=1 à 6) représentent soit des fonctions alcoxydes, soit des substituants organiques.

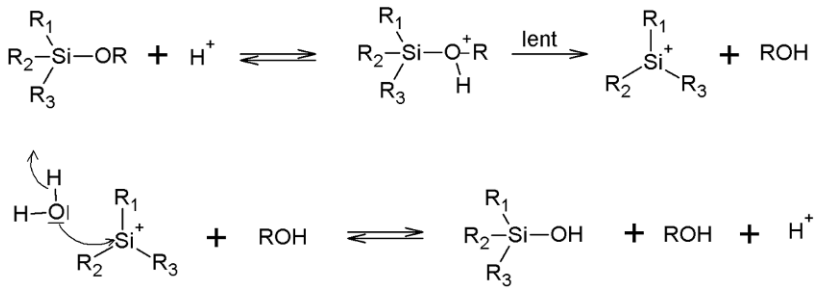


Figure 3 - Mécanisme de la réaction d'hydrolyse à pH < 2,5.

Une fonction alcoxyde –OR est rapidement protonée puis, lors d'une étape plus lente, un ion siliconium R_3Si^+ est formé par le départ d'une molécule d'alcool. La protonation permet au groupe alcoxyde –OR de devenir un meilleur groupe partant. L'eau réagit ensuite avec l'ion silicium pour former un silanol avec génération d'un proton. Ensuite, la polymérisation du sol en gel se produit par établissement de ponts –Si–O–Si– par condensation selon le mécanisme proposé par Pohl et Osterholtz (figure 4) [85].

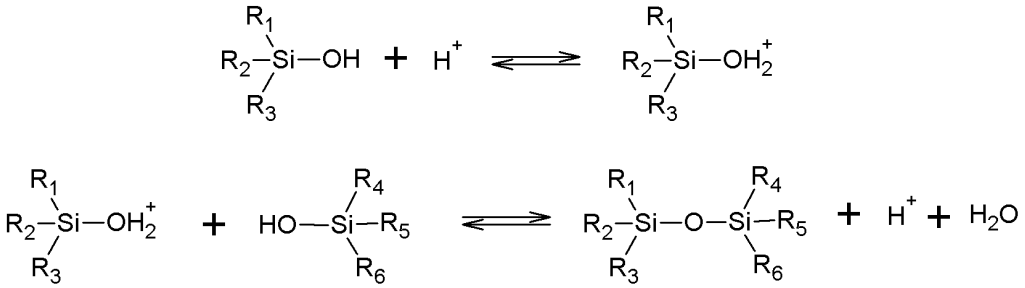


Figure 4 - Mécanisme de la réaction de condensation à pH < 2,5.

En milieu acide, la vitesse est donc gouvernée par la concentration en protons $[H^+]$. Si le milieu est très acide (pH < 2,5), l'intermédiaire réactionnel R_3Si^+ (figure 3) chargé positivement est stabilisé par des groupements substituants ce qui favorise les réactions de condensation en bout de chaînes siloxanes en cours de formation. Il se forme donc peu d'interconnexions dans le réseau silicaté, ce qui conduit à une polymérisation linéaire (gels polymériques) [78, 86, 87].

1.2.2.2. Catalyse à 2,5 < pH < 7

Lorsque le pH augmente, il y a d'avantage d'ions OH^- en solution et la formation de groupements $Si–O^-$ est favorisée. Or OH^- et SiO^- sont plus nucléophiles que les molécules d'eau et les fonctions silanols, Si–OH. L'accentuation du caractère nucléophile des hydroxydes non protonés augmente la cinétique des réactions de condensation. Ainsi, au dessus du point isoélectrique de la silice, le taux de condensation devient proportionnel à la concentration en ions hydroxydes $[OH^-]$. Le mécanisme proposé par Pohl et Osterholz est présenté figure 5.

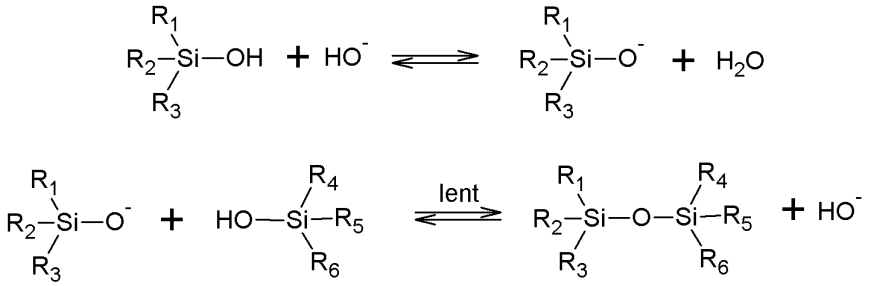


Figure 5 - Mécanisme des réactions d'hydrolyse et de condensation à 2,5 < pH < 7.

Dans ce cas, les réactions d'hydrolyse et de condensation peuvent se faire sur n'importe quel site des chaînes siloxanes : le gel sera plus ramifié [85].

1.2.2.3. Catalyse à pH > 7

Pour pH > 7, la solubilité des particules de silice est élévée. Elles sont donc suffisamment ionisées pour que leur développement se fasse sans agrégation ni gélification. Cependant, étant donné que toutes les espèces condensées se repoussent mutuellement (répulsions coulombiennes), la croissance commence d'abord par la formation de particules de 1 à 2 nm. Comme la solubilité de la silice est grande, la croissance des particules continue par murissement d'Otswald [88, 89]. Ce processus, prépondérant pour les gels basiques, se traduit par une dissolution et reprécipitation des particules. Les particules les plus petites disparaissent et reprécipitent préférentiellement au niveau des cols de jonction entre particules afin de minimiser les énergies de surface. Les particules grossissent rapidement, d'autant plus si la température augmente car, à haute température, la solubilité de la silice augmente. Finalement, on obtient des particules sphériques relativement monodisperses (de 10 à 100 nm de diamètre) [70, 83].

1.2.2.4. Bilan : structure du gel en fonction du pH

Pour des pH très acides (pH < 2,5), la vitesse de condensation est inférieure à la vitesse d'hydrolyse, les réactions s'effectuent majoritairement en bout de chaîne. On obtient donc des gels polymériques linéaires. Pour 2,5 < pH < 7, la vitesse de condensation est supérieure à celle d'hydrolyse, on favorise ainsi les ponts siloxanes entre les chaînes polymériques ce qui induit un réseau plus réticulé. Enfin, en milieu basique (pH > 7), les particules colloïdales s'agrègent, on peut donc obtenir un gel. La figure 6 schématise les différentes structures obtenues en fonction du pH du milieu réactionnel.

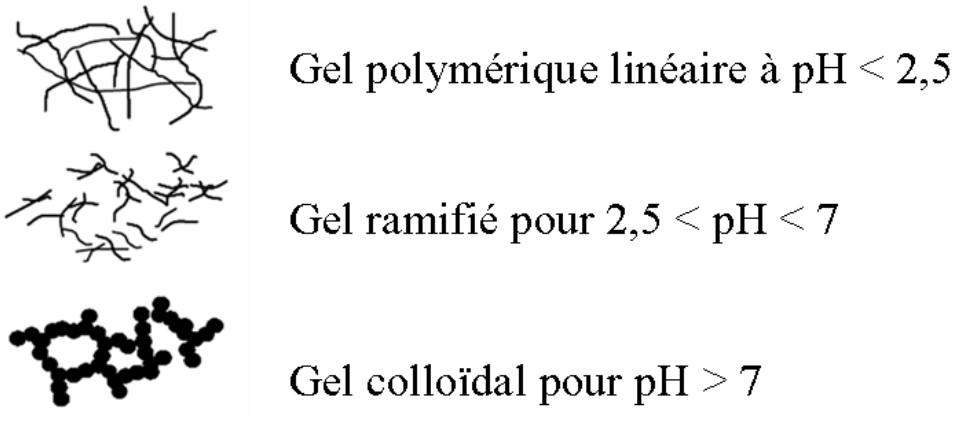


Figure 6 - Schéma des différentes structures sol-gel obtenues en fonction du pH [87].

1.2.3. Influence du taux d'hydrolyse

On appelle **taux d'hydrolyse** le rapport $h = \frac{[H_2O]}{[-OR]}$ où [H_2O] est la concentration molaire d'eau et [-OR] la concentration molaire de fonctions alcoxydes dans la solution de départ. Il conditionne les cinétiques relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation. Ainsi, le degré de polymérisation obtenu dépend de la quantité d'eau ajoutée. Lorsque h = 1, cela signifie qu'il y a autant de molécules d'eau que de fonctions –OR à hydrolyser, on obtient des chaînes polymères linéaires et un gel homogène. Pour des taux d'hydrolyse supérieurs à 1, les réactions d'hydrolyse sont beaucoup plus avancées et leur cinétique est accélérée. Ainsi, les chaînes polymères formées sont plus longues et plus réticulées, on obtient alors un réseau silicaté tridimensionnel très interconnecté [90, 91].

1.2.4. Influence du taux de solvant

On appelle **taux de solvant** le rapport $s = \frac{[solvant]}{[Si]}$ où [solvant] est la concentration molaire de solvant et [Si] la concentration molaire d'alcoxydes de silicium. Une quantité trop faible de solvant entraîne des difficultés pour garantir une bonne homogénéité de la solution initiale et conduit à des sols très visqueux qui ne conviennent pas à la réalisation de nanoparticules par pulvérisation (voir §3.3.). Les solvants favorables à la formation de matériaux sol-gel en catalyse acide sont des solvants polaires et protiques. En effet, ces derniers stabilisent d'autant mieux les intermédiaires réactionnels, qu'ils forment avec eux des liaisons hydrogènes [92, 78, 89]. Dans notre procédé, les solvants

doivent non seulement permettre une miscibilité totale des alcoxydes de silicium avec l'eau mais aussi solubiliser aisément le fluorophore organique afin d'obtenir une solution homogène lors de la nébulisation [75, 93, 94]. Nous verrons par la suite que nous avons utilisé différents types de solvants selon le fluorophore choisi.

1.2.5. Nature des précurseurs

Les vitesses d'hydrolyses et de condensations sont également régies par la nature des alcoxydes de silicium $R'_nSi(OR)_{4-n}$:

- Effet stérique :

La taille des groupes R va influencer la vitesse de diffusion des espèces et donc les cinétiques d'hydrolyse et de condensation. En effet, plus la taille des groupes R est importante, plus la diffusion des molécules est ralentie, diminuant les cinétiques de réactions. D'autre part, plus les groupes R sont « volumineux », moins les atomes de silicium sont accessibles ce qui défavorise les réactions par encombrement stérique.

- Effet inductif :

Les réactions d'hydrolyse font intervenir un mécanisme de substitution nucléophile, les substituants des alcoxydes de silicium vont donc jouer un rôle prépondérant sur la stabilité des états de transition et sur la réactivité. Les effets électroniques, inductifs donneurs ou attracteurs d'électrons, vont respectivement enrichir ou appauvrir la densité électronique de la couche de valence du silicium.

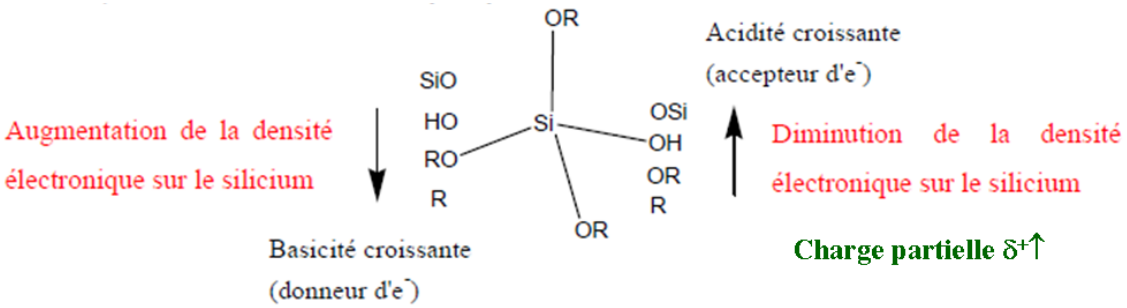


Figure 7 - Effets inductifs des groupements R, OR, OH et OSi liés au silicium.

L'influence de ces effets électroniques varie en fonction du pH auquel ont lieu les réactions d'hydrolyse et de condensation (Figure 7). En catalyse basique (voir § 1.2.2.3), le caractère électrophile du silicium est prépondérant pour que la réaction avec le groupement nucléophile soit effective. L'effet inductif attracteur des substituants du silicium favorise

donc cette réaction. En catalyse acide (voir § 1.2.2.1), l'activation a lieu sur le groupe partant. Si la densité électronique du silicium est augmentée par les effets donneurs des substituants, la densité électronique sur l'oxygène du groupement alcoxy va augmenter ainsi que sa basicité. Ainsi, l'oxygène sera plus réactif vis-à-vis des protons, et la réaction sera favorisée [95, 96].

2. Synthèse de nanocristaux organiques en matrice sol-gel

Dans cette partie, nous allons introduire les différents paramètres expérimentaux qui régissent la nucléation et la croissance confinée de phase organiques dans les pores de la matrice silicatée. Nous introduirons dans un premier temps les conditions de nucléation et croissance dans des solutions classiques, dite « libres ». Puis, nous les transposerons pour décrire les conditions de nanocristallisation en milieu confiné spatialement, c'est-à-dire dans les pores du milieu sol-gel.

2.1. Rappel sur la cristallogenèse

2.1.1. Solubilité et sursaturation

La base de la cristallogenèse en solution nécessite la préparation de solutions sursaturées dans des états métastables. On appelle **solubilité** C_S d'un composé (soluté) dans un solvant la concentration en équilibre avec la phase solide (cristal) de ce soluté pour une température et une pression données ; la solution est alors dite saturée. La courbe représentant l'évolution de la solubilité en fonction de la température est appelée **courbe de solubilité**. On définit la **sursaturation relative** σ du soluté dans la solution par la relation :

$$\sigma = \frac{C - C_S}{C_S} \qquad (1)$$

où C est la concentration en soluté dissous dans la solution et C_S la solubilité du soluté.

Lorsque $\sigma < 0$ la solution est sous-saturée, il se produit alors la dissolution de la phase cristalline. Par contre, lorsque $\sigma > 0$ la solution est sursaturée ce qui conduit à une concentration de soluté dissous supérieure à celle de l'équilibre pour une température et une pression donnée. Dans ce cas, la croissance devient thermodynamiquement possible. Une solution faiblement sursaturée est dans un état métastable et devient plus instable à plus forte sursaturation où la nucléation spontanée peut alors intervenir.

2.1.2. Nucléation et croissance

La première étape de la nucléation en solution correspond à l'apparition d'un germe solide dans la phase liquide. Pour simplifier, on suppose que ce germe est sphérique de rayon r, ce qui est généralement le cas. Du point de vue de la thermodynamique, la nucléation est le résultat d'une compétition entre le gain d'enthalpie libre réalisé par le passage de l'état dissous vers l'état cristallisé (ΔG_v) et le coût d'enthalpie libre dû à la formation d'une interface solide-liquide (ΔG_s). On écrit donc la variation d'enthalpie libre correspondant à l'apparition d'un nucléi sphérique de rayon r :

$$\Delta G = -\Delta G_v + \Delta G_s = -\frac{4\pi \cdot r^3}{3}\frac{k_B T \ln(\sigma)}{\Omega} + 4\pi \cdot r^2 \gamma \qquad (2)$$

γ est l'énergie par unité de surface de l'interface liquide-solide et Ω est le volume moléculaire du soluté.

A l'équilibre de cette compétition $\frac{\Delta G_V}{\Delta G_S}$, il apparait un rayon critique r* tel que $\frac{d\Delta G}{dr} = 0$:

$$r^* = \frac{2\gamma \cdot \Omega}{k_B T \ln(\sigma)} \qquad (3)$$

Si la taille des nucléi est inférieure au rayon critique r < r*, il y a redissolution de ces agrégats thermodynamiquement instables. Pour r > r*, il y a croissance des agrégats du soluté. On définit ainsi une barrière thermodynamique critique ΔG* = ΔG(r*) de formation des nucléi:

$$\Delta G^* = \frac{16\pi \cdot \gamma^3 \Omega^2}{3k_B^2 T^2 (\ln(\sigma))^2} \qquad (4)$$

On peut ainsi calculer le taux de nucléation J (concentration de noyaux atteignant la rayon critique par unité de temps) [97]:

$$J = n \cdot \exp(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}) = n \cdot \exp(-\frac{16\pi \cdot \gamma^3 \Omega^2}{3k_B^3 T^3}\frac{1}{(\ln(\sigma))^2}) \qquad (5)$$

n étant le nombre de molécules de soluté par unité de volume.

Lorsque la sursaturation relative σ augmente, le rayon critique des nucléi r* diminue fortement (équation 3) tandis que le taux de nucléation J augmente très rapidement

(équation 5). D'autre part, la probabilité dP d'avoir une nucléation dans le volume V de solution pendant le temps dt est **dP = J.V.dt**. On en déduit la probabilité d'avoir une nucléation dans le volume après un laps de temps $t-t_0$ pendant lequel on applique la sursaturation :

$$P_{t_0}(t) = 1 - e^{-J.V(t-t_0)} \qquad (6)$$

Dans notre procédé, la nucléation des nanocristaux s'effectue à l'intérieur des pores du gel humide de quelques centaines de nanomètres. Pour que la probabilité de nucléation soit significative, il faut donc que J soit grand, donc que la barrière thermodynamique ΔG^* soit la plus petite possible. Il faut alors pouvoir appliquer des sursaturations très élevées par une évaporation très rapide du solvant. Cette évaporation très rapide est rendue possible grâce à notre méthode de nébulisation par « spray-drying » que nous présenterons au § 3, où le sol de départ est rapidement nébulisé dans un gaz vecteur, conduisant ensuite à une interface gaz-sol très élevée.

2.2. Cas particulier de la nucléation et croissance en milieu confiné

Notre méthode de cristallisation de nanocristaux organiques est basée sur les diagrammes établis en 1950 par V.K. La Mer (figures 8 et 9) pour des solutions classiques dites « libres » par rapport aux solutions confinées dans les pores des gels ou dans des systèmes micellaires par exemple [98, 99]. Ces diagrammes qualitatifs préconisent, dans le cas des solutions libres, que l'étape de nucléation doit être un processus confiné dans le temps afin d'obtenir des cristallites de petites tailles (micro ou nanocristaux) avec des distributions relativement étroites.

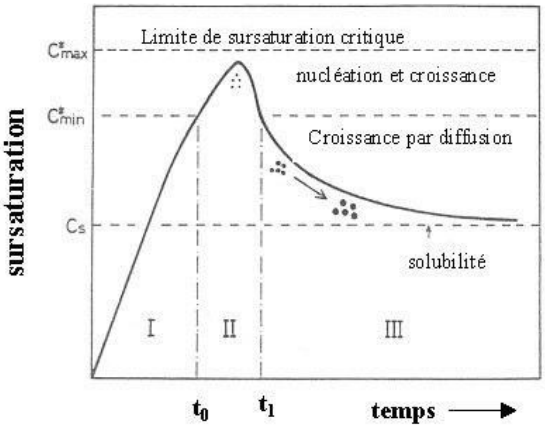


Figure 8 - Représentation schématique de l'évolution de la concentration en soluté en fonction du temps, au cours de la nucléation et de la croissance homogène de particules.

Sur la figure 8, qui représente la sursaturation en fonction du temps, on voit qu'il faut appliquer très rapidement une forte sursaturation, nettement supérieure à C_{min} (seuil de nucléation) avant que l'étape de nucléation ne démarre à l'instant t_0 (zone I). Il se forme ainsi sous très forte sursaturation un très grand nombre de nucléi (J augmente considérablement – équation 5) en solution (zone II). Cette nucléation instantanée du soluté entraine un abaissement significatif de la concentration de la phase dissoute dans le solvant, ce qui conduit à une diminution brutale de la sursaturation et à l'arrêt rapide de la nucléation à l'instant t_1 (début de la zone III). Or entre les instants t_0 et t_1, il ne s'écoule une durée que de l'ordre de la fraction de seconde (zone II) en tous cas dans notre procédé (voir § 3). La nucléation est donc un phénomène confiné dans le temps : les nucléi qui apparaissent à l'instant t_0 n'ont pas le temps de croître significativement par rapport à ceux qui appraissent à la fin de l'étape de nucléation. A l'instant t_1, la croissance démarre de manière quasiment équivalente pour l'ensemble des nucléi. Ainsi, les nucléi pourront croître dans des conditions pratiquement identiques et la distribution de taille des cristallites sera étroite. Il faut de plus pour réduire des distributions de taille que la vitesse de croissance du nucléi soit suffisament lente pour être négligeable durant l'étape de nucléation. Ceci est généralement obtenu en associant au confinement temporel de la nucléation un confinement spatial comme par exemple un milieu gélifié dans notre étude.

Le diagramme suivant (figure 9) compare les vitesses de nucléation et de croissance en solition libre et dans un gel humide, milieu confiné dans lequel nous souhaitons faire croître des nanocristaux organiques, en fonction de la sursaturation appliquée.

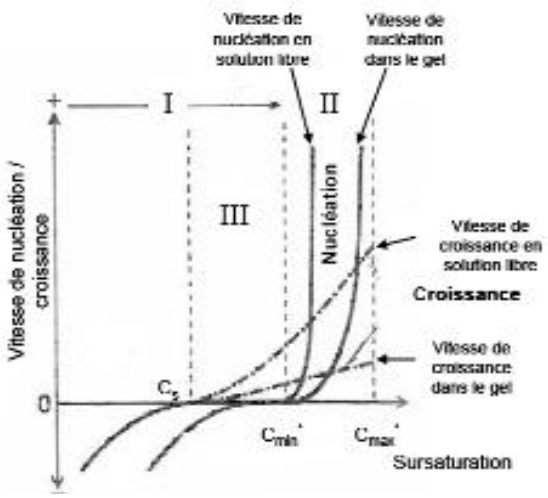


Figure 9 - Evolution des vitesses de nucléation et de croissance en fonction de la concentration en soluté dans le cas d'une solution et d'un milieu confiné.

Sur la figure 9, nous constatons qu'au cours de l'étape de nucléation (zone II), la vitesse de croissance est plus faible que la vitesse de nucléation pour des sursaturations élevées. En effet, pour de fortes sursaturations, les vitesses de nucléation et de croissance en solution libre suivent une loi du type [100]:

$$v = k\,[\sigma]^{n} \quad (7)$$

où k est une constante de proportionnalité et σ est la sursaturation.

Pour la vitesse de croissance, n est de l'ordre de 1 à 2 alors que pour la vitesse de nucléation n est de l'ordre de 4 à 10. Durant l'étape de nucléation ($C_{min}^* < C < C_{max}^*$), le processus de croissance s'avère être négligeable pour de fort confinements temporels de l'étape de nucléation ce qui n'est pas toujours évident à réaliser. De plus, nous avons vu qu'il faut appliquer une très forte sursaturation en solution libre (figure 8). Or, en solution libre, lorsque la sursaturation est grande, la vitesse de croissance devient de moins en moins négligeable devant la vitesse de nucléation (figure 9). Dans notre cas, ces processus s'effectuent dans un gel (milieu confiné) : les pores de la matrice sol-gel en formation jouent le rôle de microréacteur de nucléation en solution. Si nous nous référons à l'équation 6, lorsque le volume V des réacteurs de nucléation diminue, la probabilité de nucléation diminue également. Il est donc possible d'atteindre, au sein de ces microréacteurs de croissance cristalline, une sursaturation très élevée avant toute nucléation spontanée. De plus, le gel est un milieu visqueux, ce qui limite la diffusion des molécules du soluté (entités cristallisantes). Ainsi, la vitesse de croissance se trouve abaissée par rapport à celle se produisant en solution libre. La matrice sol-gel apporte donc un confinement spatial qui s'ajoute au confinement temporel. Ce confinement spatial dans les pores de la matrice sol-gel permet non seulement de diminuer la taille des cristallites mais aussi d'éviter leur coalescence. La notion de confinement spatial se retrouve aussi utilisée dans la croissance de nanocristaux métalliques et de semi-conducteurs (Quantum Dots). Dans ce cas, les microréacteurs de croissance cristalline sont formés par des micelles inverses nécessitant l'ajout d'un surfactant. Il est aussi possible de réaliser la croissance de particules organiques dans des gouttelettes ou dans des fluides supercritiques notamment pour la mise en forme de médicaments.

L'équipe s'est donc appuyée sur ces différents constats pour développer une méthode de nanocristallisation en matrice sol-gel originale permettant d'obtenir directement après séchage un dispositif sous forme d'une couche mince nanocomposite. Dans cette étude,

nous allons donc transposer cette méthode afin d'élaborer des nanoparticules sol-gel nanocomposites.

3. Méthodes d'élaboration des nanoparticules sol-gel

3.1. Contexte des travaux de recherche sur les nanocristaux moléculaires dans l'équipe

Depuis 1997, notre équipe combine la chimie par voie sol-gel à la nucléation et croissance de nanocristaux organiques en milieux confinés. Ceci lui a permis d'acquérir une maîtrise du procédé et ainsi élaborer des matériaux hybrides par « chimie douce » à des températures de synthèse proche de l'ambiante [101, 102]. Les premières études de l'équipe concernant ces élaborations ont débuté par la synthèse de xérogels monolithiques contenant des nanocristaux organiques (figure 10 – thèse de N. Sanz, octobre 2000) [103, 104, 74, 105].

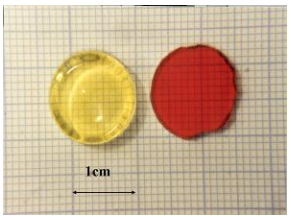


Figure 10 - Xérogels transparents contenant des nanocristaux organiques de CMONS (cyano-méthoxy-nitro-stilbène) à gauche et de DEANST (4-(N,N diéthylamino)-β-nitrostyrène) à droite dont les diamètres, compris entre 10 et 20 nm, ont été déterminés par microscopie électronique en transmission [[103] et diffusion centrale des neutrons [104].

Par la suite, les recherches se sont davantage axées sur l'élaboration des nanocristaux organiques en couches minces sol-gel obtenues par centrifugation (spin-coating). Le contrôle des paramètres expérimentaux a permis l'obtention de couches minces d'épaisseur contrôlée (100 nm à 1µm) ainsi que la maîtrise de la nanocristallisation confinée de la phase organique dans les pores de la matrice sol-gel permettant de limiter la taille des nanocristaux entre 20 et 800 nm [106, 107, 91, 102]. Des réseaux 2D et 3D de nanocristaux parfaitement ordonnés ont été élaborés de manière reproductible. Cette synthèse ayant déjà été décrite dans plusieurs thèses réalisées au sein de l'équipe MatONLP, seuls les points clés seront rappelés ici. Pour plus de précision, le lecteur pourra se référer aux thèses de Nathalie Sanz (octobre 2000, [74]), Estelle Botzung-Appert (juin 2003, [106]), Virginie

Monnier (septembre 2006, [91]) et Emilie Dubuisson (septembre 2009, [108]) et aux différents articles que l'équipe a publiés sur le sujet [109-114, 105].

L'ajustement des paramètres expérimentaux a tout d'abord été possible grâce à une observation directe, par microscopie optique confocale, des nanocristaux organiques enfouis dans la couche mince (voir § 3.2.2.1). Cette technique a permis de mettre en évidence le comportement de la phase organique au sein de la matrice silicatée à l'aide d'une observation en x/y (figure 11-a) et une deuxième selon z : en coupe dans l'épaisseur de la couche mince (figure 11-b).

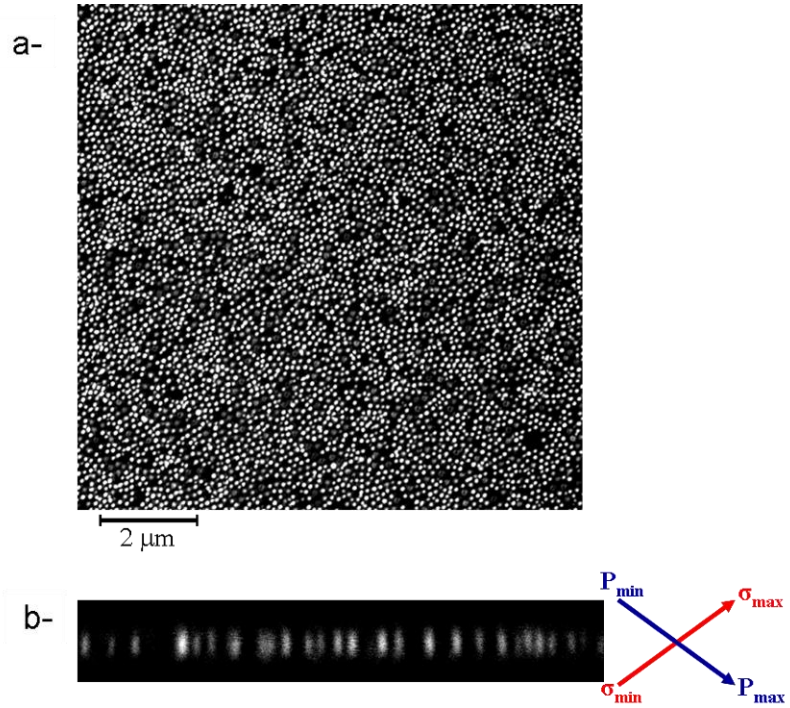


Figure 11 – Image en microscopie optique confocale en fluorescence d'une couche mince sol-gel (1 µm épaisseur) contenant des nanocristaux de rubrène : a) coupe en x/y perpendiculairement à la surface de la couche et b) coupe en z (épaisseur de la couche) [108].

L'observation en x-y de la couche mince en fluorescence (en niveau de gris) permet de visualiser des nanocristaux de rubrène fluorescents (blanc) bien individualisés et dispersés dans la matrice silicatée (noire). Les pores de la matrice sol-gel agissent comme des microréacteurs de nucléation et de croissance ce qui permet à la fois d'avoir une répartition homogène sans coalescence et une distribution en taille étroite des nanocristaux.

Le cliché 11-b a été réalisé en coupe selon l'épaisseur de la couche mince, axe z. Il a permis de mettre en évidence que la nucléation et la croissance des nanocristaux se produit au centre de l'épaisseur de la couche mince. Ce phénomène est régi par deux paramètres :

- la probabilité de nucléation (P – équation 6)
- la sursaturation relative de la phase organique (σ – équation 1).

Lors du dépôt de la couche mince, il y a formation d'une croûte silicatée en surface nettement plus dense [115] ce qui crée un gradient de confinement spatial de la solution au sein de la couche mince. En surface, la solution est fortement confinée ce qui limite la probabilité de nucléation car le volume libre de solution est restreint (volume des pores nettement plus petit qu'en profondeur). En profondeur, le réseau silicaté est moins dense, le volume de solution libre augmente favorisant la probabilité de nucléation. Inversement, sous l'effet de l'évaporation du solvant, la sursaturation est beaucoup plus importante à l'interface air-surface alors qu'en profondeur le milieu est beaucoup moins concentré en soluté [100]. Ces deux paramètres ont des effets antagonistes ce qui conduit à des conditions optimales de nucléation et croissance intermédiaires qui sont situées approximativement au centre de l'épaisseur de la couche mince, figure 11-b.

Suite à ces observations, l'équipe a souhaité contrôler spatialement la nucléation et croissance des nanocristaux (figure 12-a) [106, 111, 114]. Elle a pour cela remplacé le substrat en lame de verre usuel par un substrat de silicium présentant des réseaux bidimensionnels de puits de section carrée et de profondeur contrôlée (figure 12-b). Cet agencement spatial bidimensionnel a permis un double confinement la nucléation et la croissance des nanocristaux dans les puits comme il a été mis en évidence par la microscopie confocale (figure 12-c). L'utilisation d'un substrat structuré a contraint la nucléation dans les puits. La solution est déposée par spin-coating et le phénomène de nucléation et croissance des nanocristaux est limité par le volume total des puits où la probabilité de nucléation est la plus forte (figure 12-a). Aucune nucléation et croissance de nanocristaux ne survient en dehors des puits car le volume libre de solvant y est trop faible. D'autre part, le volume des puits est limité, rendant possible la nucléation et la croissance d'un unique cristal. Cette étude a montré qu'en contraignant le milieu en générant un double confinement spatial, la nucléation et la croissance cristalline ne sont pas perturbées et permettent l'obtention d'un réseau structuré de cristaux au sein de la matrice silicatée.

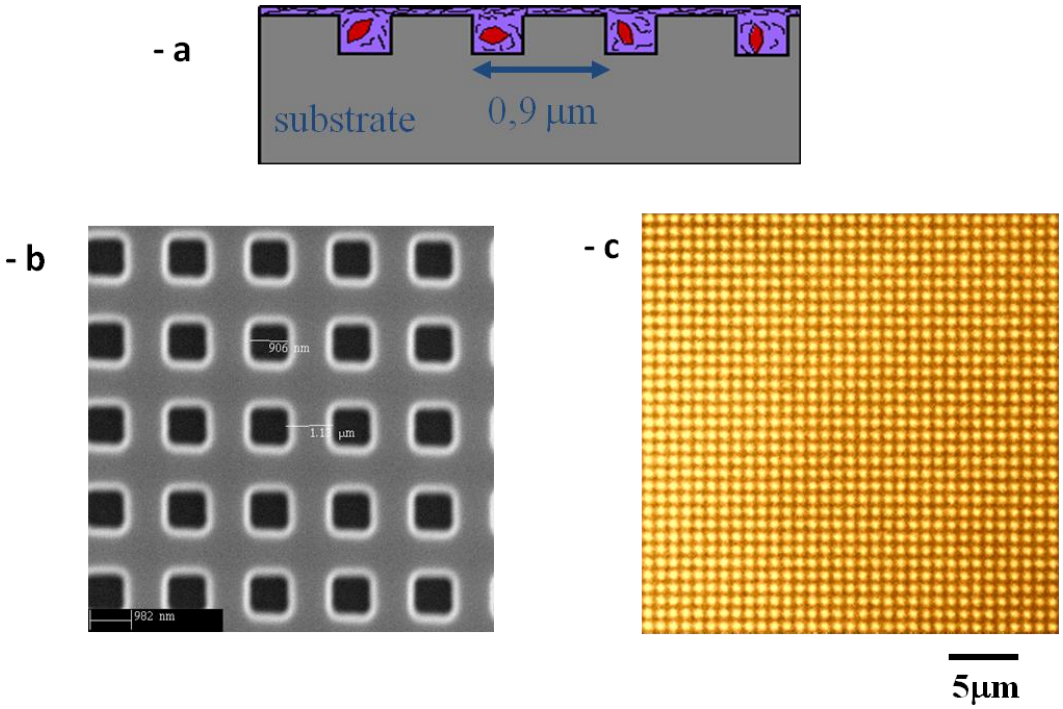


Figure 12 - (a) Schéma du confinement spatial des nanocristaux dans un réseau; (b) cliché MEB d'un substrat texturé de silicium présentant des réseaux bidimensionnels de puits calibrés; (c) cliché en microscopie confocale d'une couche mince déposée sur un substrat texturé de silicium.

De cette constatation est née l'idée de maîtriser ensuite la nucléation et la croissance de nanocristaux organiques dans des sphères silicatées au travers d'un triple confinement : un confinement temporel par évaporation très rapide du solvant (fraction s), un confinement spatial dans les pores du gel silicaté en cours de densification, le tout associé à un confinement spatial à l'intérieur de chaque gouttelette de l'aérosol initial.

3.2. Idée de départ

L'hypothèse initiale de cette étude est schématisée dans la figure 13 [116]. Elle illustre le cheminement et l'évolution d'une gouttelette de sol contenant une phase organique parfaitement dissoute et les précurseurs sol-gel (alcoxyde de silicium) préalablement hydrolysés et polycondensés conduisant à la formation de chaînes silicatées. Le sol est dans un premier temps nébulisé sous la forme de gouttelettes (figure 13-a) puis séché dans un four tubulaire (figure 13-b) pour collecter à la fin des particules hybrides sèches cœur organique / coquille silicatée (figure 13-c).

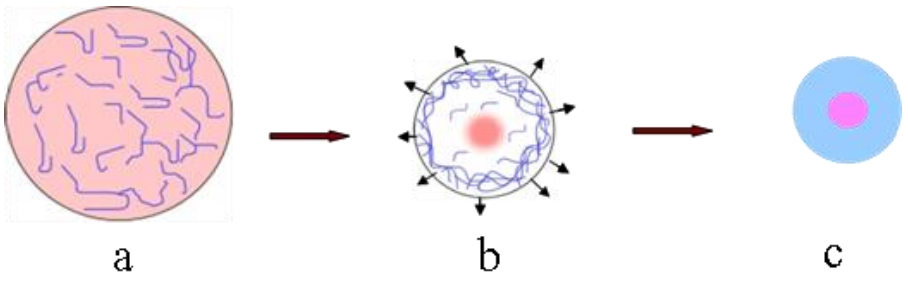


Figure 13 - Evolution d'une goutte issue de la nébulisation d'une solution sol-gel parfaitement homogène au départ (a) puis progressivement séchée (b et c) en passant sous flux laminaire d'un gaz vecteur dans un four tubulaire.

La solution homogène est constituée d'une grande quantité de solvant dans lequel ont été dissous des alcoxydes de silicium ainsi qu'un fluorophore organique. Elle est ensuite nébulisée en fines gouttelettes qui sont transportées vers une zone d'évaporation très rapide du solvant (four tubulaire) afin de provoquer dans chaque gouttelette de l'aérosol la formation du réseau silicaté. L'avancement du réseau silicaté interconnecté est nettement plus rapide près de la surface de la gouttelette sous l'effet de la forte évaporation du solvant. Ceci entraine la formation d'une « croûte » silicatée plus dense en surface (comme dans le cas des couches minces) dès le début de l'évaporation du solvant. Ainsi, pour les mêmes raisons qu'exposées juste au-dessus, la probabilité de nucléation est plus importante en profondeur où les volumes libres de solution sont plus importants. On aura donc nucléation en « profondeur » soit au cœur des gouttelettes. De plus, compte tenu de la taille des gouttelettes, 1 – 2 µm dans l'aérosol de départ, on génère un « double confinement spatial » de la nucléation : dans les pores du gel, lui-même confiné sous forme de gouttelettes de taille micronique. La probabilité de nucléation étant très faible en milieu confiné, la probabilité d'avoir simultanément la formation de deux nucléi dans une même gouttelette en cours de séchage sera pratiquement nulle. On devrait donc tendre théoriquement vers la formation de nanoparticules hybrides : cœur organique monocristallin encapsulé au sein d'une matrice silicatée amorphe.

D'après la littérature, il existe deux grandes familles de méthodes de préparation de gouttelettes de solution. La première famille est du type « jet d'encre », le film de solution est fragmenté de manière très régulière (pincement d'un tuyau d'alimentation du liquide à l'aide d'un dispositif piézoélectrique) ce qui permet l'obtention de particules monodisperses [117, 118]. Cependant cette technique délivre des gouttes dont le diamètre est de l'ordre de la dizaine de µm. Le deuxième type de technique conduit à la nébulisation

de la solution sous la forme de brouillards ce qui engendre des particules de diamètre plus petit, de l'ordre de 1 – 2 µm, mais avec une distribution en taille polydisperse [119]. Dans ce cas, la technique est rapide, simple et très productive. Dans le cadre de ce travail, nous allons donc utiliser ce type de générateur de particules, et nous tenterons de réduire le problème de polydispersité en faisant varier les paramètres de synthèse. Il existe deux types de nébuliseurs. Dans un cas, on utilise une source piézoélectrique placée sous la cuve contenant la solution à nébuliser [119-123]. Les vibrations de la céramique piézoélectrique engendrent la formation d'un brouillard en surface de la solution. Dans le deuxième cas, c'est une source pneumatique faisant appel à l'effet Venturi. Sous l'action d'un gaz, un film de solution est entrainé jusqu'à une buse où il est fragmenté sous la pression de gaz (air, azote par exemple) [124-133]. Les premiers tests de faisabilité ont été effectués en utilisant une source piézoélectrique.

3.3. Tests préliminaires pour valider la méthode d'élaboration

3.3.1. Montage et synthèse

Les tests de faisabilité ont été effectués en amont du projet afin de valider l'hypothèse émise précédemment sur la nucléation et la croissance confinée d'une phase organique au cœur d'une gouttelette en cours de séchage sous flux laminaire. Pour effectuer ces premiers tests, nous avons utilisé un montage de séchage d'aérosol « spray-drying » fonctionnant avec une source piézoélectrique [119-123] se trouvant dans l'équipe d'E. Djurado, LEPMI de Grenoble INP. En nous basant sur les connaissances de l'équipe concernant la croissance confinée de phase organique au sein d'une matrice sol-gel, des sols ont été préparés et placés dans ce réacteur afin qu'ils soient nébulisés puis séchés [116].

Le montage « spray-drying » (figure 14) est composé de deux parties. La première assure la nébulisation ultrasonore de la solution dans un réacteur en verre dont le fond est équipé d'une céramique piézoélectrique protégée par une membrane en polymère inerte pour éviter tout contact direct avec la solution. Ce réacteur est relié à un tube en silice dans lequel circule l'aérosol qui est généré en surface de la solution. L'aérosol est entrainé sous courant d'azote dont le flux doit être le plus laminaire possible. Le tube en silice est chauffé à l'aide d'un cordon chauffant (T = 100 – 120 °C), permettant le séchage rapide des gouttelettes de l'aérosol. Ce procédé peut être décrit en quatre étapes :

- La pulvérisation ultrasonique de la solution qui génère un aérosol est assurée par la céramique piézoélectrique située au fond du réacteur et réglée à une fréquence de 2,1 MHz (RBI Company) afin d'obtenir des gouttelettes de petites tailles, de l'ordre de 1 – 2 µm en diamètres,
- Le transport de l'aérosol à travers d'un « four tubulaire » est assuré par un flux laminaire d'azote de 2 L/min environ,
- Le passage de l'aérosol dans le four induit l'évaporation rapide du solvant et la polycondensation du réseau silicaté, suivi de la nucléation et de la croissance confinée de la phase organique en fin d'évaporation du solvant,
- Enfin, la poudre est collectée en sortie sur des lames de microscopes disposées perpendiculairement en sortie du four. Pour éviter tout problème de condensation de solvant, les lames de verre sont chauffées par une plaque chauffante à une température proche de celle du four (80 – 100°C).

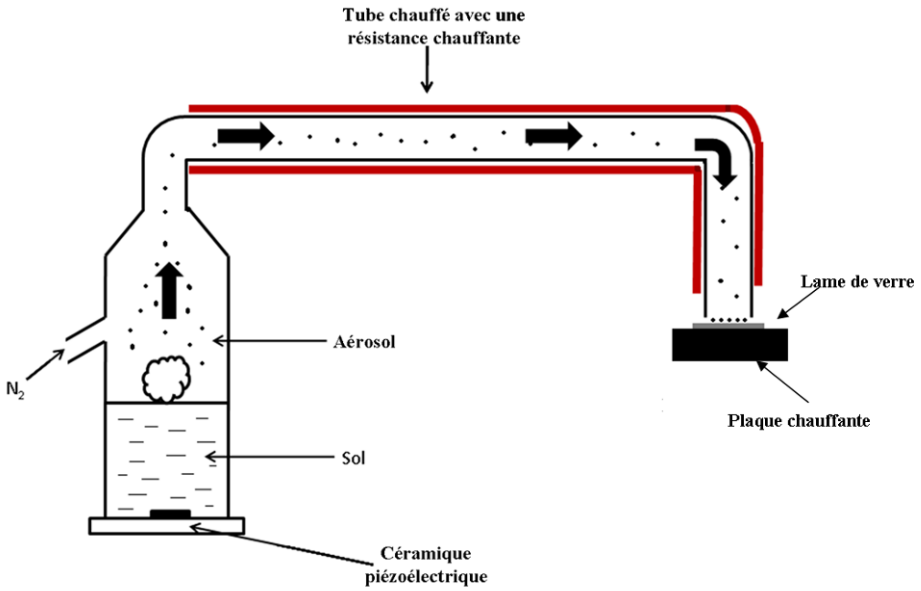


Figure 14 - Montage couplant le réacteur avec une source piézoélectrique et un tube quartz chauffé.

Pour mener à bien cette étude préliminaire, nous nous sommes basés sur notre expérience de nanocristallisation de phase organique en couche mince sol-gel. Nous avons utilisé une solution sol-gel homogène contenant un solvant, une phase organique, des alcoxydes de silicium et une petite quantité d'eau pour lancer l'hydrolyse des alcoxydes. Ces solutions

ont été stockées durant une semaine à 80°C puis le vieillissement des solutions a été prolongé de deux semaines à température ambiante. Cette étape à 80°C puis à l'ambiante permet de lancer l'hydrolyse et la condensation des précurseurs silicatée afin de former une coquille silicatée de qualité en surface des gouttes et de contrôler ensuite la nucléation et la croissance du fluorophore organique. Pour cela, nous avons travaillé en conditions de catalyse acide, pH≈ 1,5 (HCl). Ceci permet d'obtenir un réseau polymérique sol-gel faiblement interconnecté. Cette étape en catalyse acide des sols est liée à l'ajout d'une molécule d'eau pour une fonction –OR (h = $[H_2O]/[-OR]$ = 1) amorçant ainsi l'hydrolyse/condensation des précurseurs silicatés. D'autre part, compte tenu de la petite taille de gouttes générées par le réacteur, les sols utilisés ont été préparés avec des taux de dilution plus importants que dans le cas des couches minces afin d'obtenir des nanoparticules à l'issue du séchage total de l'aérosol, soit avec un rapport molaire s = [solvant]/[alcoxyde] = 30 [101, 102, 105, 109, 111]. Nous avons utilisé comme solvant lors de ces premiers tests le tétrahydrofurane (THF) car nous avons auparavant bien contrôlé la nanocristallisation du rubrène, qui a été utilisé comme fluorophore « modèle » lors des travaux antérieurs portant sur les couches minces, avec ce solvant.

Au niveau des précurseurs du réseau silicaté, nous avons utilisé un mélange équimolaire d'alcoxydes de silicium de tétraméthoxysilane (TMOS) et de méthyltriméthoxysilane (MTMOS). En effet, lorsque le TMOS est utilisé seul, le réseau silicaté résultant comporte une grande quantité de fonctions silanols (Si-OH) qui peuvent former des liaisons hydrogène avec les molécules organiques. Ces interactions fluorophore-matrice entraînent une dispersion de la phase organique dans la matrice et peuvent ainsi perturber la nanocristallisation des molécules organiques. Pour éviter la formation de liaisons hydrogène faibles (C-H …O-Si), on combine le MTMOS avec le TMOS. Les groupements méthyl non-pontants du MTMOS écrantent ainsi les fonctions silanols.

Pour ces premiers tests, le rubrène [134] a été utilisé comme fluorophore car il présente des bonnes propriétés de fluorescence à l'état cristallin entre 530 et 650 nm et une température de fusion élevée (Tf = 330 °C). La concentration de rubrène dissous dans le THF a été choisie en fonction du rapport molaire d = [fluorophore]/[alcoxyde], soit un taux molaire en fluorophore de 3.10^{-3}. Les sols ont été nébulisés et séchés à l'aide du réacteur décrit ci-dessus. Les particules ont été collectées sur des lames de verre pour être observées et caractérisées afin de valider l'hypothèse émise concernant la formation de particules hybrides : cœur organique encapsulé dans une coquille amorphe silicatée.

3.3.2. Caractérisations des produits obtenus

Afin de valider la méthode d'élaboration, nous avons caractérisé les poudres obtenues. Pour cela, nous avons utilisé différentes techniques de visualisation et de caractérisation :

- Le microscope optique classique pour une visualisation macroscopique des particules déposées sur les lames de verre,
- la microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (MET) pour caractériser la forme et les tailles des particules et vérifier la qualité de l'encapsulation de la phase organique au cœur des sphères silicatées,
- la microscopie optique confocale pour observer les particules en mode réflexion et en fluorescence afin de confirmer la présence du fluorophore au cœur des nanoparticules silicatées.

3.3.2.1. Le microscope optique

Dans un premier temps, nous avons observé les nanoparticules contenant le rubrène à faible grandissement avec un microscope optique. Cette observation est faite juste après le dépôt des particules sur les lames de verre pour avoir une première idée du comportement du sol suite à la nébulisation et au séchage (figure 15).

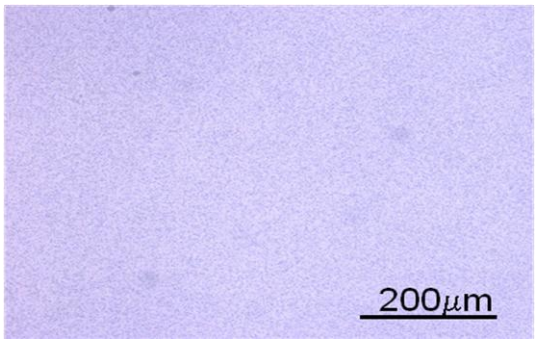


Figure 15 - Image au microscope optique d'une lame de verre sur laquelle des particules silicatées contenant du rubrène ont été collectées suite à la nébulisation et au séchage du sol.

On observe des particules de taille sub-micronique, bien dispersées sur le substrat et qui semblent ne pas présenter de problème significatif de coalescence. De plus, les particules présentent une coloration blanche (silice) en lumière visible tandis qu'une fluorescence orangée classique du rubrène apparait sous éclairage UV. Ces premières observations très

prometteuses semblent ainsi montrer que l'on n'a pas de ségrégation de phase silicate – rubrène.

3.3.2.2. Microscopie électronique à balayage

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une visualisation directe des particules en employant un microscope électronique à balayage (MEB, JEOL 840A). Ceci nous a permis d'observer la morphologie des particules et de vérifier si la phase organique se trouve bien encapsulée au cœur des particules et non à l'extérieur : présence ou non de démixtion entre la phase organique et la phase silicatée.

- Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique traditionnellement utilisée dans l'analyse des surfaces. Elle permet non seulement de caractériser la morphologie de la surface mais aussi la composition chimique des matériaux solides grâce au principe d'interaction électron – matière. Le principe du MEB consiste en un faisceau d'électron émis par un filament W venant frapper et balayer de manière focalisée la surface d'un échantillon à analyser. Dans ce volume d'interaction entre les électrons du faisceau et la matière, des signaux sont réémis en fonction des couches excitées tels que des électrons secondaires, des électrons rétrodiffusés ou encore des rayons X, figure 16.

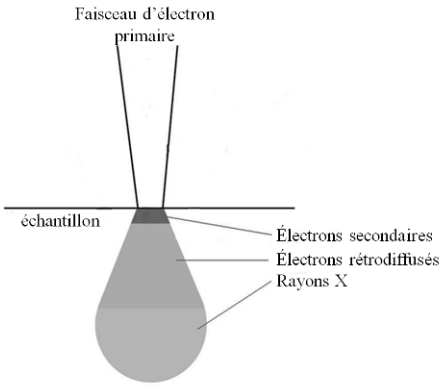


Figure 16 - Schéma de la poire d'excitation induit par l'impact d'un faisceau primaire d'électron sur la surface de l'échantillon.

Ainsi, un faisceau primaire d'électrons d'énergie de quelques keV est focalisé sur l'échantillon (sous vide). Sous l'impact du faisceau, la couche superficielle de l'échantillon

va générer des électrons secondaires et permettre l'obtention d'une image de la surface (topographie). Les électrons rétrodiffusés proviennent des couches plus profondes de l'échantillon et dépendent des éléments composants l'échantillon. Ainsi, la détection des électrons rétrodiffusés permettent de dresser une « cartographie chimique » de l'échantillon en fonction des numéros atomiques (Z) des éléments constitutifs du matériau étudié et obtenir ainsi une image en composition de l'échantillon. Des détecteurs, placés au sein de la chambre d'observation, permettent de collecter les signaux réémis par l'échantillon. Les électrons générés suite à l'interaction du faisceau et de la matière sont détectés à l'aide d'un scintillateur couplé à un photomultiplicateur. Le signal obtenu est amplifié et sert à moduler l'intensité du faisceau d'un oscilloscope dont le balayage est synchrone avec celui du faisceau primaire. A chaque point de la zone balayée sur l'échantillon correspond donc un point sur l'écran de visualisation. L'image est obtenue séquentiellement point par point en déplaçant le faisceau d'électrons.

Afin de caractériser les premières synthèses de nanoparticules hybrides, nous avons utilisé un MEB JEOL 840A avec une résolution de 15 nm à 8 kV. Pour la suite de ce travail de thèse, nous avons utilisé un MEB Carl Zeiss Ultra plus à canon à émission de champ qui offre une meilleure résolution à plus faible voltage : 1nm à 2 kV sous 1.10^{-6} mbar environ. Le principe d'un canon à émission de champ est d'utiliser une cathode métallique en forme de pointe très fine et d'appliquer une tension de l'ordre de 2 000 à 7 000 volts entre la pointe et l'anode. On produit ainsi, par « effet de pointe », un champ électrique très intense, de l'ordre de 10^7 $V \cdot cm^{-1}$, à l'extrémité de la cathode. Les électrons sont alors extraits de la pointe par effet tunnel. Le gros avantage des canons à émission de champ est une brillance théorique qui peut être cent fois plus importante que celle des cathodes LaB_6. Ceci nous a donc permis des observations plus détaillées et aussi de limiter la détérioration des échantillons. En effet, la focalisation du faisceau sur la surface peut entrainer une surchauffe de l'échantillon et donc pour notre étude la vaporisation de la phase organique si elle est mal encapsulée par la matrice silicatée.

- Premières observations des nanoparticules

Pour observer les nanoparticules hybrides synthétisées par séchage d'aérosol, nous avons placé un peu de poudre sur un wafer de silicium. Ce substrat permet d'avoir un bon contraste avec les particules silicatées étudiées. Comme nous pouvons le voir sur le cliché suivant (figure 17), les particules collectées sont parfaitement sphériques et présentent des

diamètres compris entre 80 et 600 nm. De plus, nous n'avons observé aucune coalescence entre les particules ni aucune ségrégation de phase organique/inorganique. Ces premières observations montrent clairement que les particules formées au cours de la nébulisation de la solution puis du séchage de l'aérosol sont relativement bien contrôlées ce qui est un résultat très encourageant. En effet, l'absence de coalescence indique que le temps de séchage des gouttelettes dans le four (100-120°C) sous flux laminaire est suffisant pour obtenir des particules sèches et isolées en sortie du montage expérimental.

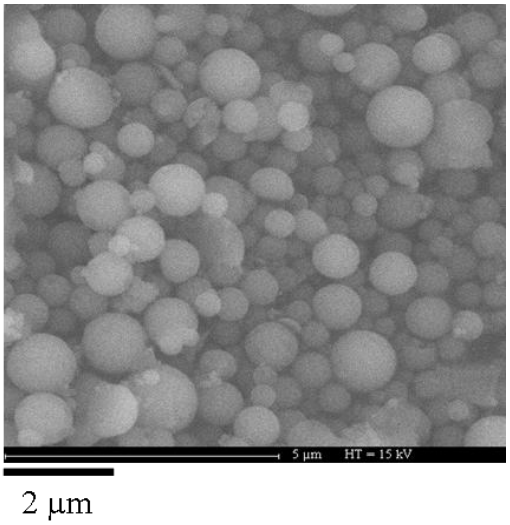


Figure 17 - Observation au MEB de nanoparticules hybrides parfaitement sphériques présentant des diamètres compris entre 80 et 600 nm.

Ces premières observations ont ensuite été complétées par la microscopie électronique en transmission.

3.3.2.3. Le microscope électronique à transmission : mode image

- Principe

Le microscope électronique en transmission (MET – figure 18) a été mis au point dans les années 30 [135]. Il réside dans le chauffage d'un filament de tungstène ou de LaB_6 engendrant un faisceau d'électrons qui va être accéléré par une tension puis condensé sur l'échantillon à observer grâce à un jeu de lentilles électromagnétiques. Les électrons vont être plus ou moins absorbés par l'échantillon en fonction de son épaisseur ou de sa composition chimique. Un diaphragme placé au niveau de la lentille objectif permet de sélectionner une partie des faisceaux transmis ou diffractés. Lorsqu'on centre le diaphragme sur le faisceau transmis, on peut ainsi observer une image agrandie de

l'échantillon. Si on centre le diaphragme sur le faisceau diffracté, on va s'intéresser alors à la diffraction des électrons. Dans ces deux cas, on parle d'utilisation du microscope en champ clair. En mode imagerie, en plaçant un détecteur CCD dans le plan image, on peut, par transparence (transmission), observer une image de la zone irradiée.

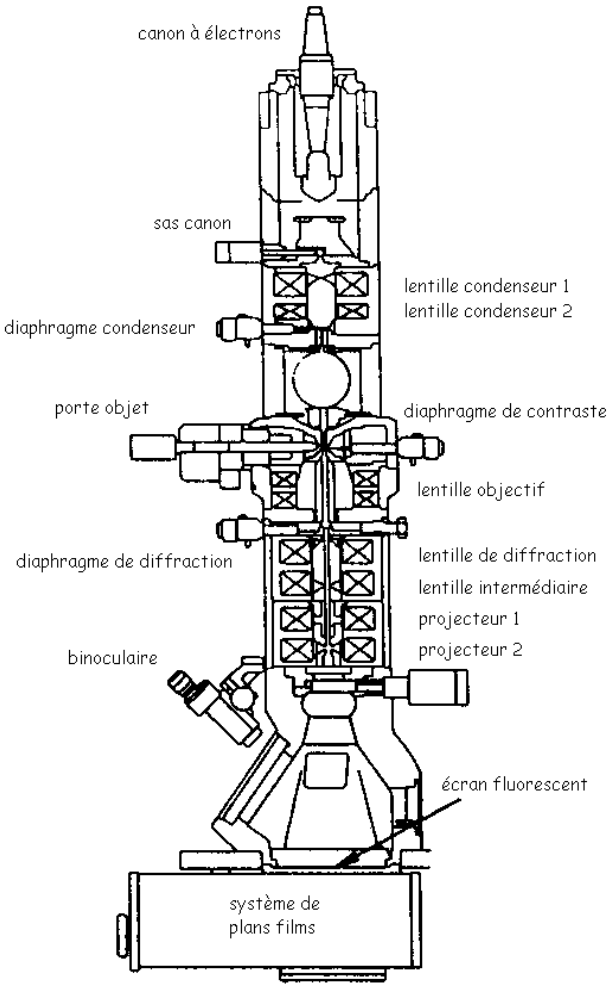


Figure 18 - Schéma d'un microscope électronique en transmission.

Les images des nanocristaux encapsulés dans une matrice sol-gel ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique Philips CM 300. Il fonctionne avec une tension d'accélération de 300 kV. Le filament est en LaB_6 et la résolution point à point est de 0,19 nm. Les images peuvent être soient directement observées sur un écran fluorescent soient enregistrées grâce à une caméra CCD. L'acquisition et l'analyse des images sont gérées par le logiciel DigitalMicrograph.

Un frein à l'observation par MET est l'épaisseur de l'échantillon. En général, il faut que l'échantillon ait une épaisseur comprise entre 10 et 100 nm pour permettre au faisceau

d'électrons de le traverser. C'est généralement une caractéristique limitante, notamment dans le cas des échantillons métalliques. Cependant, dans le cadre de notre étude, les particules synthétisées sont des éléments légers et présentant des diamètres de quelques centaines de nanomètres. Elles sont facilement observables par cette technique. Pour préparer les échantillons à analyser, nous déposons à l'aide d'un pinceau un peu de poudre sur une grille en cuivre présentant une membrane en carbone pré-trouée qui est généralement utilisée en MET pour l'observation des échantillons. De plus, avec cette technique de préparation, les échantillons ne subissent aucune dégradation.

- Observation des nanoparticules

L'utilisation du MET permet une observation plus précise des particules issues du séchage d'aérosol. Cela va nous permettre de concentrer l'observation sur une particule et étudier ainsi les contrastes de surface. La figure 19 montre la première nanoparticule étudiée par MET qui présente une forme sphérique et une surface non rugueuse et très bien définie avec un diamètre d'environ 600 nm. Aucune porosité au niveau de la coquille silicatée n'est observée. Cela indique que notre méthode de synthèse permet la formation de nanoparticules de porosité inférieure à quelques nanomètres (microporosité) non observable par cette technique.

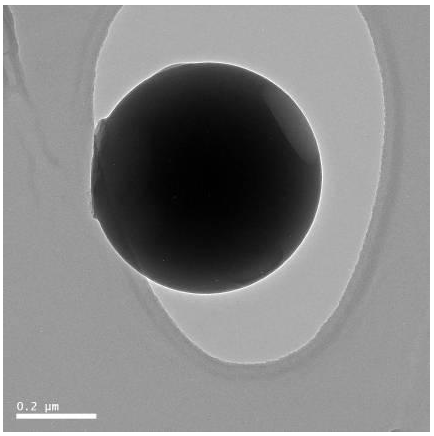


Figure 19 - Image en MET d'une nanoparticule de silice encapsulant un cœur organique.

La seule irrégularité observée sur la gauche de la sphère silicatée, figure 19, est certainement due au contact de cette particule sur la lame de verre en sortie du réacteur. Il semble donc que les particules, notamment les plus grosses, ne soient pas totalement séchées en sortie du dispositif et viennent ainsi se coller sur la lame disposée en sortie de réacteur, figure 14.

3.3.2.4. La microscopie optique confocale

Cette technique va nous permettre d'obtenir à la fois des images en réflexion des particules mais aussi en mode fluorescence. Grâce à cela, nous allons pouvoir mettre en évidence de manière simple et rapide la présence de fluorophore dans chaque particule. Nous avons utilisé pour cela le microscope Zeiss LSM 510 du laboratoire des Techniques de l'Imagerie Médicale et de la Complexité – Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble (TIMC-IMAG) de l'Université Joseph Fourier, dans le cadre d'une collaboration avec Yves Usson.

- Principe

La microscopie optique confocale est une technique non destructive très utilisée en biologie car elle permet d'observer *in-vitro* des structures microscopiques (cellules par exemple) marquées par des fluorophores [136]. Le principe de cette technique date de 1957 [137, 138], mais ne fut utilisé expérimentalement qu'à partir de 1980, suite au développement de sources laser et d'instrumentations électroniques et informatiques adéquates.

Le schéma ci-dessous (figure 20) décrit le principe de la microscopie confocale. Suite à une excitation laser dans le domaine du visible, la fluorescence de l'échantillon est générée sur la totalité du trajet du faisceau. Un miroir dichroïque permet de réfléchir le faisceau excitateur qui est ensuite focalisé sur un point de l'échantillon par le biais d'un objectif. La profondeur de champ d'un microscope de fluorescence conventionnel est de 2 – 3 µm et la résolution maximale est approximativement égale à la moitié de la longueur d'onde utilisée (autour de 250 nm) comme dans toute microscopie optique développée en champ lointain.

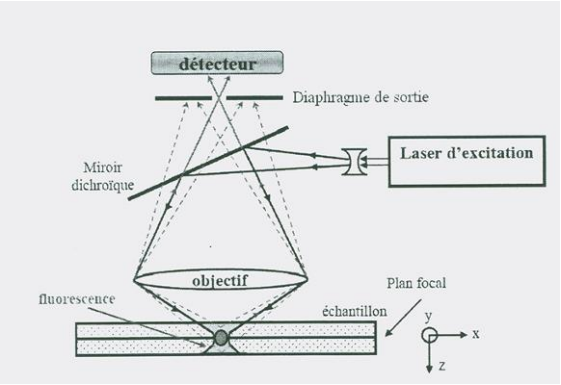


Figure 20 - Principe de la microscopie optique confocale.

Cependant, en mode confocal, un diaphragme (« pinhole ») est placé devant le détecteur (photomultiplicateur) dans le plan focal image de l'objectif du microscope. Le photomultiplicateur va détecter alors point par point uniquement les photons émis ou réfléchis dans le volume illuminé au niveau du plan focal. En parallèle, le faisceau laser incident se déplace sur l'échantillon en balayant une zone de 50 µm x 50 µm par exemple. L'ouverture restreinte du diaphragme permet d'éliminer les photons provenant des régions hors du plan focal. Les résolutions axiales et latérales se trouvent donc nettement améliorées par rapport à la microscopie optique classique car on élimine la quasi-totalité des rayons lumineux ne provenant pas du plan focal objet. Mais les performances des systèmes optiques sont limitées lorsque le faisceau de lumière passe par une ouverture finie. En effet, au passage par l'objectif, les rayons issus d'un point de l'objet sont diffractés et en donnent une image sous la forme d'une tache d'Airy. Lorsque deux objets sont de plus en plus proches, leurs taches d'Airy se superposent partiellement jusqu'à devenir indiscernables. Rayleigh a défini le pouvoir séparateur (ou limite de résolution) comme la distance qui sépare deux objets tels que le premier minimum d'une tache d'Airy de l'un se confond avec le maximum de l'autre. Le diamètre minimal du diaphragme (égal à la limite de résolution) impose les résolutions théoriques suivantes :

$$r_{xy} = 0{,}46\frac{\lambda}{NA} \qquad\qquad r_z = 1{,}4\frac{n\lambda}{NA^2}$$

NA est l'ouverture numérique de l'objectif (**NA = n sin α** où **α** est la demi-ouverture de l'objectif), n est l'indice de réfraction de la goutte d'huile placée entre l'objectif et l'échantillon (liquide d'adaptation d'indice). L'huile permet de faire le contact entre l'objectif et l'échantillon et d'assurer la bonne transmission du faisceau à travers l'échantillon. Nous avons travaillé avec une longueur d'onde d'un laser Argon (λ = 488 nm) à la puissance 15 mW et avec un objectif d'ouverture numérique NA = 1,4. L'huile a un indice n = 1,515. Ces données nous permettent des résolutions en r_{xy} = 160 nm et en r_z = 528 nm. Nous pouvons donc en déduire qu'en pratique pour des particules ayant des diamètres inférieurs à 200 nm environ leur visualisation et résolution ne seront plus possibles.

Le faisceau est séparé par un miroir dichroïque à 510 nm et l'émission de fluorescence est sélectionnée grâce à un filtre laissant passer les longueurs d'onde supérieures à 515 nm. La longueur d'onde minimale d'excitation de ce microscope étant de 488 nm, nous ne pouvons pas observer par émission de fluorescence des fluorophores nécessitant d'être excités à des

longueurs d'onde plus faible. Dans ce cas, les fluorophores sont visualisés par réflexion du laser sur l'échantillon (mode réflexion). Le faisceau est séparé par un miroir semi-réfléchissant (80% réfléchi-20% transmis) et la lumière parasite réfléchie par l'optique du microscope est éliminée en plaçant un filtre polariseur croisé devant le détecteur. Les images de microscopie confocale ont été analysées grâce au logiciel de traitement d'images NIH (Scion Corporation) [139].

- Observation des nanoparticules

Nous avons tenté de vérifier la présence d'un « cœur organique » fluorescent dans les particules précédemment observées au MEB. Pour cette caractérisation, nous avons utilisé le rubrène dont la fluorescence ($\lambda_{\text{fluorescence rubrène}}$ = 530 – 650 nm) est facilement observable par cette méthode. La figure 20 représente la superposition de deux clichés pris au microscope optique confocal (les couleurs ont été arbitrairement choisies) : l'image en rouge a été enregistrée en réflexion, tandis que l'image en vert a été acquise en mode de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}}$ = 488 nm).

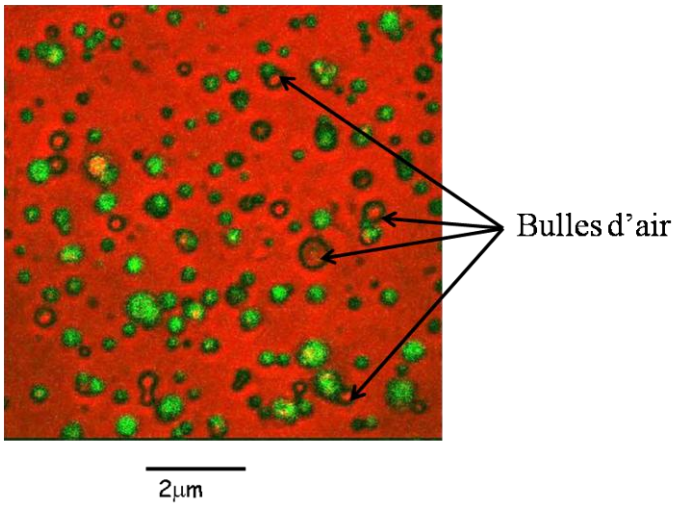


Figure 20 - Superposition de deux clichés enregistrés au microscope confocal (couleurs arbitraires) : en rouge le cliché pris en réflexion et en vert le cliché pris dans le mode fluorescence.

A l'exception de quelques bulles d'air emprisonnées dans l'huile (liquide d'indice placé entre la lame observée et l'objectif du microscope) toutes les particules présentent une très forte intensité de fluorescence. Il y a une parfaite superposition entre les spots obtenus en mode fluorescence (vert) et les nanoparticules précédemment visualisées en réflexion (contraste en rouge). Nous pouvons donc confirmer la présence de rubrène en

concentrations élevées au cœur des nanoparticules grâce à la forte fluorescence observée. De plus, toutes les particules sont fluorescentes.

3.2.3. Conclusion sur les premières synthèses et caractérisations de nanoparticules hybrides

Ces premières synthèses sont très prometteuses car ce procédé de séchage rapide d'aérosols permet d'obtenir en une seule étape des nanoparticules hybrides. Les différentes caractérisations ont permis de visualiser des nanoparticules sphériques, sans aspérités et sans problème significatif de coalescence. De plus, il n'y a pas de ségrégation de phase organique - inorganique, la matrice silicatée semble encapsuler parfaitement le rubrène. Les particules présentent toutes une forte fluorescence mais aussi une large distribution de taille (80 – 600 nm) [116]. Nous verrons au cours du chapitre II comment nous avons ensuite optimisé ce procédé.

Conclusion

Ce premier chapitre a permis d'introduire et de mettre en évidence l'intérêt du procédé sol-gel notamment pour contrôler la nucléation et la croissance confinée de nanocristaux moléculaires. Ce type de procédé a déjà été largement utilisé dans l'équipe à travers l'élaboration des couches minces sol-gel. Il était donc envisageable de transposer ces procédés pour l'élaboration de nanoparticules hybrides. De plus, la chimie sol-gel est très flexible puisqu'en jouant sur différents paramètres d'élaboration (pH, taux de solvant, nature des précurseurs, …) on peut moduler la nature de la matrice silicatée et par ce fait les conditions de nucléation et de croissance confinées des nanocristaux organiques fluorescents.

Ce premier chapitre a également permis de montrer la faisabilité et l'originalité de notre méthode de nanocristallisation en matrice sol-gel par la méthode dite de « spray-drying » [116]. Le confinement spatial et temporel du procédé de nucléation-croissance qui en résulte nous permet ainsi d'élaborer en une seule étape et en grande quantité des nanoparticules hybrides organominérales parfaitement définies. Elles sont constituées d'un cœur cristallin stabilisé dans une coquille silicatée biocompatible. Ceci nous conduit donc au développement de cette technique de synthèse afin de déterminer les paramètres physiques et chimiques permettant d'obtenir des nanoparticules hybrides contenant un cœur organique cristallin très fluorescent dans une coquille silicatée amorphe et biocompatible.

Bibliographie

1. Sanchez, C., Julian, B., Belleville, P., and Popall, M., *Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites.* Journal of Materials Chemistry, 2005. **15**(35-36): p. 3559-3592.
2. Sanchez, C. and Ribot, F., *Design of hybrid organic-inorganic materials synthesized vio sol-gel chemistry*. New Journal of Chemistry, 1994. **18**(10): p. 1007-1047.
3. Van Olphen.H, *Maya Blue - A clay-organic pigment.* Science, 1966. **154**(3749): p. 645-&.
4. Yacaman, M. J., Rendon, L., Arenas, J., and Puche M.C.S., *Maya blue paint: An ancient nanostructured materials.* Science, 1996. **273**(5272): p. 223.
5. Gomez-Romero, P., Sanchez, C., *Hybrid Materials, functional applications. An Introduction, Functional Hybrid materials*. 2004: WILEY-VCH Verlag GmbH&CO. 1-14.
6. Kickelbick, G., *Hybrid Materials. Synthesis, Characterisation, and Applications*. 2007: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
7. Dumont, B., Thiery, R., Welter, J. M., and Duterne, M., *Hybrid sol-gel clear coatings for decoration brass profiles.* Revue De Metallurgie-Cahiers D Informations Techniques, 2001. **98**(9): p. 783-788.
8. Kron, J., Schottner, G., and Deichmann, K. J., *Glass design via hybrid sol-gel materials.* Thin Solid Films, 2001. **392**(2): p. 236-242.
9. Akamatsu, Y., Makita, K., Inaba, H., Nakazumi, H., and Minami, T., *Large size recyclable colored glass plates prepared from organic colorant dispersed silica sols by the dipping method.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2000. **19**(1-3): p. 387-391.
10. Luo, Z. K., Yang, J. J., Cai, H. H., Li, H. Y., Ren, X. Z., Liu, J. H., and Liang, X., *Preparation of silane-WO3 film through sol-gel method and characterization of photochromism.* Thin Solid Films, 2008. **516**(16): p. 5541-5544.
11. Schaudel, B., Guermeur, C., Sanchez, C., Nakatani, K., and Delaire, J. A., *Spirooxazine- and spiropyran-doped hybrid organic-inorganic matrices with very fast photochromic responses.* Journal of Materials Chemistry, 1997. **7**(1): p. 61-65.
12. Alvarez-Herrero, A., Garranzo, D., Pardo, R., Zayat, M., and Levy, D., *Temperature dependence of the optical and kinetic properties of photochromic spirooxazine derivatives in sol-gel thin films.* Physica Status Solidi C - Current Topics in Solid State Physics, Vol 5, No 5, 2008. **5**(5): p. 1160-1163.
13. Nishikiori, H., Tanaka, N., Takagi, K., and Fujii, T., *Chelation of spironaphthoxazine with zinc ions and its photochromic behavior during the sol-gel-xerogel transitions of alkyl silicon alkoxide.* Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2007. **189**(1): p. 46-54.
14. Pardo, R., Zayat, M., and Levy, D., *Photostability of a photochromic naphthopyran dye in different sol-gel prepared ormosil coatings.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **40**(2-3): p. 365-370.
15. Serwadczak, M. and Kucharski, S., *Photochromic gratings in sol-gel hybrid materials containing cyanoazobenzene chromophores.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **37**(1): p. 57-62.
16. Serwadczak, M., Wubbenhorst, M., and Kucharski, S., *Optical and dielectric characteristics of photochromic hybrid sol-gel materials.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **40**(1): p. 39-44.
17. Kucharski, S. and Janik, R., *Photochromic gratings in sol-gel films containing diazo sulfonamide chromophore.* Optical Materials, 2005. **27**(10): p. 1637-1641.

18. Jin, A. P., Chen, W., Zhu, Q. Y., Yang, Y., Volkov, V. L., and Zakharova, G. S., *Structural and electrochromic properties of molybdenum doped vanadium pentoxide thin films by sol-gel and hydrothermal synthesis.* Thin Solid Films, 2009. **517**(6): p. 2023-2028.
19. Lou, X. C., Zhao, X. J., Feng, J. M., and Zhou, X. D., *Electrochromic properties of Al doped B-subsituted NiO films prepared by sol-gel.* Progress in Organic Coatings, 2009. **64**(2-3): p. 300-303.
20. Zayim, E. O., Turhan, I., Tepehan, F. Z., and Ozer, N., *Sol-gel deposited nickel oxide films for electrochromic applications.* Solar Energy Materials and Solar Cells, 2008. **92**(2): p. 164-169.
21. Xia, X. H., Tu, J. P., Zhang, J., and Wang, X. L., *Electrochromic and electrochemical properties of nickel oxide thin films prepared by a modified sol-gel method.* Multi-Functional Materials and Structures, Pts 1 and 2, 2008. **47-50**: p. 625-629.
22. Ghodsi, F. E., Tepehan, F. Z., and Tepehan, G. G., *Optical and structural properties of sol-gel made Ce/Ti/Zr mixed oxide thin films as transparent counter electrode for electrochromic devices.* Optical Materials, 2008. **31**(1): p. 63-67.
23. Mackenzie, J. D. and Bescher, E. P., *Physical properties of sol-gel coatings.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2000. **19**(1-3): p. 23-29.
24. Roux, S., Audebert, P., Pagetti, J., and Roche, M., *Design of a new bilayer polypyrrole-xerogel hybrid coating for corrosion protection.* Journal of Materials Chemistry, 2001. **11**(12): p. 3360-3366.
25. Voevodin, N., Jeffcoate, C., Simon, L., Khobaib, M., and Donley, M., *Characterization of pitting corrosion in bare and sol-gel coated aluminum 2024-T3 alloy.* Surface & Coatings Technology, 2001. **140**(1): p. 29-34.
26. Haas, K. H., Amberg-Schwab, S., Rose, K., and Schottner, G., *Functionalized coatings based on inorganic-organic polymers (ORMOCER (R) s) and their combination with vapor deposited inorganic thin films.* Surface & Coatings Technology, 1999. **111**(1): p. 72-79.
27. Li, L., Zhu, Z.-M., and Liao, Y.-M., *Effects of Sol-Gel coating on the corrosion resistance of nickel-chronium alloys.* Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2009. **27**(1): p. 34-6.
28. Lopez, A. J., Urena, A., Lopez, M. D., and Rams, J., *Protection against corrosion of aluminium-SiC composites by sol-gel silica coatings.* Surface & Coatings Technology, 2008. **202**(16): p. 3755-3763.
29. Raicheff, R. G., Chernev, G. E., Zaprianova, V. G., Ivanova, D. I., Djambaski, P. R., Samuneva, B. I., and Salvado, I. M. M., *Electrochemical corrosion behaviour of silica hybrid sol-gel coatings.* Bulgarian Chemical Communications, 2008. **40**(3): p. 295-299.
30. Ballarre, J., Lopez, D. A., Rosero, N. C., Duran, A., Aparicio, M., and Cere, S. M., *Electrochemical evaluation of multilayer silica-metacrylate hybrid sol-gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel.* Surface & Coatings Technology, 2008. **203**(1-2): p. 80-86.
31. Lamaka, S. V., Shchukin, D. G., Andreeva, D. V., Zheludkevich, M. L., Mohwald, H., and Ferreira, M. G. S., *Sol-Gel/Polyelectrolyte Active Corrosion Protection System.* Advanced Functional Materials, 2008. **18**(20): p. 3137-3147.
32. Shanaghi, A., Rouhaghdam, A. S., Shahrabi, T., and Aliofkhazraei, M., *Study of TiO2 nanoparticle coatings by the sol-gel method for corrosion protection.* Materials Science, 2008. **44**(2): p. 233-247.

33. Lampke, T., Darwich, S., Nickel, D., and Wielage, B., *Development and characterization of sol-gel composite coatings on aluminum alloys for corrosion protection.* Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik, 2008. **39**(12): p. 914-919.
34. Oton, J. M., Pena, J. M. S., Serrano, A., and Levy, D., *Light-scattering spectral behavior of liquid-crystal dispersions in silica glasses.* Applied Physics Letters, 1995. **66**(8): p. 929-931.
35. Etienne, P., Coudray, P., Porque, J., and Moreau, Y., *Active erbium-doped organic-inorganic waveguide.* Optics Communications, 2000. **174**(5-6): p. 413-418.
36. Lebeau, B., Brasselet, S., Zyss, J., and Sanchez, C., *Design, characterization, and processing of hybrid organic-inorganic coatings with very high second-order optical nonlinearities.* Chemistry of Materials, 1997. **9**(4): p. 1012-1020.
37. Ravaine, D., Seminel, A., Charbouillot, Y., and Vincens, M., *A new family of organically modified silicates prepared from.* Journal of Non-Crystalline Solids, 1986. **82**(1-3): p. 210-219.
38. Gautierluneau, I., Denoyelle, A., Sanchez, J. Y., and Poinsignon, C., *Organic inorganic protonic polymer electrolytes as membrane for low-temperature fuel cell* Electrochimica Acta, 1992. **37**(9): p. 1615-1618.
39. Popall, M., Andrei, M., Kappel, J., Kron, J., Olma, K., and Olsowski, B., *ORMOCERs as inorganic-organic electrolytes for new solid state lithium batteries and supercapacitors.* Electrochimica Acta, 1998. **43**(10-11): p. 1155-1161.
40. Cornelius, C., Hibshman, C., and Marand, E., *Hybrid organic-inorganic membranes.* Separation and Purification Technology, 2001. **25**(1-3): p. 181-193.
41. Tezuka, T., Tadanaga, K., Hayashi, A., and Tatsumisago, M., *Proton-Conductive Inorganic-Organic Hybrid Membrane Prepared from 3-(2-Aminoethylaminopropyl)triethoxysilane and Sulfuric Acid by the Sol-Gel Method.* Journal of the Electrochemical Society, 2009. **156**(1): p. B174-B177.
42. Wu, Y. H., Wu, C. M., Xu, T. W., and Fu, Y. X., *Novel anion-exchange organic-inorganic hybrid membranes prepared through sol-gel reaction of multi-alkoxy precursors.* Journal of Membrane Science, 2009. **329**(1-2): p. 236-245.
43. Xu, Q. Y. and Anderson, M. A., *Sol-gel route to synthesis of microporous ceramic membranes - thermal stabilibty of TiO2-ZrO2 mixed oxides.* Journal of the American Ceramic Society, 1993. **76**(8): p. 2093-2097.
44. Guizard, C., Julbe, A., Larbot, A., and Cot, L., *Nanostructures in sol-gel derived materials - Application to the elaboration of nanofiltration membranes.* Journal of Alloys and Compounds, 1992. **188**(1-2): p. 8-13.
45. Thomas, M. P., Landham, R. R., Butler, E. P., Cowieson, D. R., Barlow, E., and Kilmartin, P., *Inorganic ultrafiltration membranes prepared by a combination of anodic film and sol-gel technologies.* Journal of Membrane Science, 1991. **61**: p. 215-225.
46. Suzuki, F., Onozato, K., and Kurokawa, Y., *Gas-permeability of a porous alumina membrane prepared by the sol-gel process (aluminum iso-propoxide).* Journal of Non-Crystalline Solids, 1987. **94**(1): p. 160-162.
47. Ramanathan, K., Jonsson, B. R., and Danielsson, B., *Sol-gel based thermal biosensor for glucose.* Analytica Chimica Acta, 2001. **427**(1): p. 1-10.
48. Martinez-Tome, M. J., Esquembre, R., Mallavia, R., and Mateo, C. R., *Immobilization and Characterization of 2,3-diaminonaphthalene/cyclodextrin Complexes in a Sol-Gel Matrix: A New Fluorimetric Sensor for Nitrite.* Journal of Fluorescence, 2009. **19**(1): p. 119-125.
49. Cabello-Carramolino, G. and Petit-Dominguez, M. D., *Development of new sol-gel carbon composite electrodes and their application as electrochemical sensors.* Microchimica Acta, 2009. **164**(3-4): p. 405-410.

50. Chaudhari, G. N., Jagtap, S. V., Gedam, N. N., Pawar, M. J., and Sangawar, V. S., *Sol-gel synthesized semiconducting LaCo0.8Fe0.2O3-based powder for thick film NH3 gas sensor*. Talanta, 2009. **78**(3): p. 1136-1140.
51. Liao, Y. H. and Chou, J. C., *Preparation and characterization of the titanium dioxide thin films used for pH electrode and procaine drug sensor by sol-gel method.* Materials Chemistry and Physics, 2009. **114**(2-3): p. 542-548.
52. Li, W. J., Yuan, R., Chai, Y. Q., Zhou, L., Chen, S. H., and Li, N., *Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for the preparation of hydrogen peroxide biosensor*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2008. **70**(6): p. 830-837.
53. Llobera, A., Cadarso, V. J., Darder, M., Dominguez, C., and Fernandez-Sanchez, C., *Full-field photonic biosensors based on tunable bio-doped sol-gel glasses.* Lab on a Chip, 2008. **8**(7): p. 1185-1190.
54. Liu, X. Q., Niu, W. X., Li, H. J., Han, S., Hu, L. Z., and Xu, G. B., *Glucose biosensor based on gold nanoparticle-catalyzed luminol electrochemiluminescence on a three-dimensional sol-gel network.* Electrochemistry Communications, 2008. **10**(9): p. 1250-1253.
55. Pandey, P. C., Upadhyay, S., and Pathak, H. C., *A new glucose biosensor based on sandwich configuration of organically modified sol-gel glass.* Electroanalysis, 1999. **11**(1): p. 59-64.
56. Lin, J. and Brown, C. W., *Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1997. **16**(4): p. 200-211.
57. Narang, U., Prasad, P. N., Bright, F. V., Ramanathan, K., Kumar, N. D., Malhotra, B. D., Kamalasanan, M. N., and Chandra, S., *Glucose biosensor based on a sol-gel derived platform* Analytical Chemistry, 1994. **66**(19): p. 3139-3144.
58. Avnir, D., Kaufman, V. R., and Reisfeld, R., *Interface and confined environments : organic fluorescent dyes trapped in silica and silica titania thin-flims by the sol-gel method - photophysical, film and cage properties* Journal of Non-Crystalline Solids, 1985. **74**(2-3): p. 395-406.
59. Bosc, F., Ayral, A., Albouy, P. A., Datas, L., and Guizard, C., *Mesostructure of anatase thin films prepared by mesophase templating.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(11): p. 2208-2214.
60. Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., and Livage, J., *Recent bio-applications of sol-gel materials.* Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**(11): p. 1013-1030.
61. Iskandar, F., Abdullah, M., Yoden, H.,, *Silica films containing ordered pores prepared by dip coating of silica nanoparticles and polystryrene neads colloidal mixture*. J. Sol-Gel Sci. Technol., 2003. **29**: p. 41-47.
62. Crepaldi, E. L., Soller-Illa, G.J.d.A.A., Grosso, D., Cagnol, F., Ribot, F., Sanchez, C., *Controlled formation of highly organized mesoporous titania thin films: Form mesostructured hybrids to mesoporous nanoanatase TiO2*. J. Am. Chem. Soc., 2003. **125**: p. 9770-9786.
63. Ebelmen, M., Compt. Rend. Acad. Sci, 1847. **25**: p. 854.
64. Geffcken, W., and Berger, E., *Patent German*, 736411.
65. Roy, R., *Aids in hydrothermal experimentation: methods of making mixtures for both dry and wet phase equilibrium studies* Journal of the American Ceramic Society, 1956. **39**(4): p. 145-146.
66. Beasley, R.M, Johns, H.L, *USA Patent 3,311,689*. 1963.
67. Marisic M.M, *USA Patent 2,385,217*. 1945.
68. McLachlan, J., D., *USA Patent 2,269,059*. 1942.
69. Dislich, H., *New routes to multicomponent oxide glasses.* Angewandte Chemie-International Edition, 1971. **10**(6): p. 363-&.

70. Audebert, P. A, Miomandre, F., *Procédé sol-gel de polymérisation.* Techniques de l'Ingénieur, 2008.
71. Pierre, A.C, *Introduction aux procédés sol-gel*. 1992.
72. Phalippou, J. A., Kocon, L., *Aérogels. Aspects fondamentaux.* Techniques de l'Ingénieur, 2004. **AF 3609**.
73. Spagnol, S., *Transfert conductifs dans des aérogels de silice, du milieu nanoporeux autosimilaire aux empilements granulaires*, in *Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*. 2007, Doctorat de l'Université de Toulouse: Toulouse.
74. Sanz, N., *Elaboration, Caractérisation Structurale et Etude des Propriétés Optiques Linéaires et Non Linéaires de Nanocristaux Organiques en Matrice Sol-Gel*. 2000, Doctorat de l'Université Joseph Fourier Grenoble I: Grenoble.
75. Boury, B., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Le Strat, V., *Structure of silica-based organic-inorganic hybrid xerogel.* Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. **265**(1-2): p. 41-50.
76. Livage, J., Henry, M., and Sanchez, C., *Sol-gel chemistry of transition- metal oxides.* Progress in Solid State Chemistry, 1988. **18**(4): p. 259-341.
77. Sallard and S, *Etudes électrochimiques des cinétiques de polycondensation sol-gel et de la fractalité des xérogels*. 2004, Ecole Normale Supérieure de Cachan.
78. Brinker, C. J. A., Scherer,G.W, *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. 1990: Academic Press, Inc.
79. Cihlar, J., *Hydrolysis and polycondensation of ethyl silicates : effect of pH and catalyst on the hydrolysis and polycondensation of tetraethoxysilane (TEOS)* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 1993. **70**(3): p. 239-251.
80. Ro, J. C. and Chung, I. J., *Sol-gel kinectics od tetraethylorthosilicate (TEOS) in acid catalyst* Journal of Non-Crystalline Solids, 1989. **110**(1): p. 26-32.
81. Marugan, J., Christensen, P., Egerton, T., and Purnama, H., *Influence of the synthesis pH on the properties and activity of sol-gel TiO2 photocatalysts.* International Journal of Photoenergy, 2008.
82. Gadalla, A. M. and Yun, S. J., *Characterization of gels prepared from silicon ethoxide in presence of HCl and HF* Journal of Non-Crystalline Solids, 1992. **143**(2-3): p. 121-132.
83. Iler, R.K, *The chemistry of Silica*. 1979: Wiley, New York.
84. Coltrain, B. K., and Kelts, L.W., *The chemistry of hydrolysis and condensation of silica sol-gel precursors.* Colloids Chemistry of Silica, 1994. **234**: p. 403-418.
85. Pohl, E.R., Osterholtz, F.D., *Molecular characterization of composite interfaces.* H. Ishida and G. Kumar. Plenum, New York, 1985.
86. Gallagher, D. and Klein, L. C., *Silica membranes by the sol-gel process.* Journal of Colloid and Interface Science, 1986. **109**(1): p. 40-45.
87. Gallagher, D. and Ring, T. A., *Sol-gel processing of ceramic films* Chimia, 1989. **43**(10): p. 298-304.
88. Gerber, T., Himmel, B., and Hubert, C., *Waxs and Saxs investigation of structure formation of gels from sodium-water glass* Journal of Non-Crystalline Solids, 1994. **175**(2-3): p. 160-168.
89. Collignon, F., *Cahier technologique Sol-Gel*. 2008.
90. Scherer, G. W., *Stress and fracture during drying of gels.* Journal of Non-Crystalline Solids, 1990. **121**(1-3): p. 104-109.
91. Monnier, V., *Elaboration et caractérisation structurale de nanocristaux moléculaires fluorescents inclus dans des couches minces sol-gel: Application à la réalisation de capteurs chimiques et biologiques*. 2006, Doctorat de l'Université Joseph Fourier Grenoble I: Grenoble.

92. Artaki, I., Zerda, T. W., and Jonas, J., *Solvent effects on the condensation stage of the sol-gel process.* Journal of Non-Crystalline Solids, 1986. **81**(3): p. 381-395.
93. Boury, B., Ben, F., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Nobili, M., *Control of the anisotropic organization of nanostructured silica-based hybrid materials.* Chemistry of Materials, 2002. **14**(2): p. 730-738.
94. Rao, A. P. and Rao, A. V., *Optical and dielectric properties of organic laser dye Rhodamine 6G doped silica xerogels with the variation of the sol-gel parameters.* Indian Journal of Engineering and Materials Sciences, 2004. **11**(5): p. 413-420.
95. Jiang, H. M., Zheng, Z., and Wang, X. L., *Kinetic study of methyltriethoxysilane (MTES) hydrolysis by FTIR spectroscopy under different temperatures and solvents.* Vibrational Spectroscopy, 2008. **46**(1): p. 1-7.
96. Ponton, A., Barboux-Doeuff, S., and Sanchez, C., *Rheology of titanium oxide based gels: determination of gelation time versus temperature.* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2000. **162**(1-3): p. 177-192.
97. Turnbull, D. and Fisher, J. C., *Rate of nucleation in condensed systems.* Journal of Chemical Physics, 1949. **17**(1): p. 71-73.
98. Lamer, V. K., *Nucleation in phase transitions* Industrial and Engineering Chemistry, 1952. **44**(6): p. 1270-1277.
99. Lamer, V. K. and Dinegar, R. H., *Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols.* Journal of the American Chemical Society, 1950. **72**(11): p. 4847-4854.
100. Bohenek, M., Myerson, A. S., and Sun, W. M., *Thermodynamics, cluster formation and crystal growth in highly supersaturated solutions of KDP, ADP and TGS.* Journal of Crystal Growth, 1997. **179**(1-2): p. 213-225.
101. Ibanez, A., Maximov, S., Guin, A., Chaillout, C., and Baldeck, P. L., *Controlled nanocrystallization of organic molecules in sol-gel glasses.* Advanced Materials, 1998. **10**(18): p. 1540-+.
102. Sanz, N., Gaillot, A. C., Usson, Y., Baldeck, P. L., and Ibanez, A., *Organic nanocrystals grown in sol-gel coatings.* Journal of Materials Chemistry, 2000. **10**(12): p. 2723-2726.
103. Sanz, N., Ibanez, A., Morel, Y., and Baldeck, P. L., *Organic nanocrystals grown in gel glasses for optical-power-limiting applications.* Applied Physics Letters, 2001. **78**(17): p. 2569-2571.
104. Sanz, N., Wang, I., Zaccaro, J., Beaugnon, E., Baldeck, P. L., and Ibanez, A., *Orientation of organic nanocrystals grown in sol-gel matrices under a high magnetic field.* Advanced Functional Materials, 2002. **12**(5): p. 352-358.
105. Sanz, N., Zaccaro, J., Delmotte, L., Le Luyer, C., and Ibanez, A., *Preparation and characterization of N-4-Nitrophenyl-L-prolinol nanocrystals in sol-gel matrice.* J. Sol. State Chem., 2002. **165**: p. 25-34.
106. Botzung-Appert, E., *Nanocristaux organiques inclus dans des couches minces sol-gel: contrôle de leur distribution spatiale pour la réalisation de mémoires optiques et Spectroscopique de luminescence pour la mise au point de capteurs chimiques ou biologiques*. 2003, Doctorat de l'Université Joesph Fourier Grenoble I: Grenoble.
107. Botzung-Appert, E., Monnier, V., Duong, T. H., Pansu, R., and Ibanez, A., *Polyaromatic luminescent nanocrystals for chemical and biological sensors.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(9): p. 1609-1611.
108. Dubuisson, E., *Nanocristaux organiques fluorescents insérés en couche mince sol-gel: Vers le développement d'un nouveau type de biopuces*. 2009, Institut Polytechnique de Grenoble: Grenoble.

109. Dubuisson, E., Monnier, V., Sanz-Menez, N., Boury, B., Usson, Y., Pansu, R. B., and Ibanez, A., *Brilliant molecular nanocrystals emerging from sol-gel thin films: towards a new generation of fluorescent biochips.* Nanotechnology, 2009. **20**(31): p. 315301.
110. Monnier, V., Dubuisson, E., Sanz, N., and Ibanez, A., *Organic nanocrystals grown in sol-gel matrices: new hybrid organic-inorganic materials for optics.* Research on Chemical Intermediates, 2008. **34**(2-3): p. 155-167.
111. Monnier, V., Sanz, N., Botzung-Appert, E., Bacia, M., and Ibanez, A., *Confined nucleation and growth of organic nanocrystals in sol-gel matrices.* Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**: p. 1401-1409.
112. Monnier, V., Sanz, N., Bacia, M., Pansu, R., and Ibanez, A., *Molecular nanocrystals grown in sol-gel thin films for ultrabright chemical sensor applications - art. no. 61921I.* Organic Optoelectronics and Photonics II, 2006. **6192**: p. I1921-I1921.
113. Monnier, V., Bacia, M., Putaux, J. L., and Ibanez, A., *TEM characterization of organic nanocrystals grown in sol-gel thin films.* Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**: p. 129-139.
114. Zaccaro, J., Sanz, N., Appert, E. B., Baldeck, P. L., and Ibanez, A., *Organic nanocrystals grown in sol-gel matrices: a new type of hybrid material for optics.* Comptes Rendus Physique, 2002. **3**(4): p. 463-478.
115. Bornside, D. E., Macosko, C. W., and Scriven, L. E., *On the modelling of spin coating* Journal of Imaging Technology, 1987. **13**(4): p. 122-130.
116. Philippot, C., Marcellin, N., Djurado, E., and Ibanez, A., *Nanocristaux fluorescents enrobés d'une coquille inorganique* 2009, CNRS Patent, FR N°08/51830; Réf : PCT/FR2009/000294 (2009)
117. Wu, W. D., Patel, K. C., Rogers, S., and Chen, X. D., *Monodisperse droplet generators as potential atomizers for spray drying technology.* Drying Technology, 2007. **25**(12): p. 1907-1916.
118. Mougenot, M., Lejeune, M., Baumard, J. F., Boissiere, C., Ribot, F., Grosso, D., Sanchez, C., and Noguera, R., *Ink jet printing of microdot arrays of mesostructured silica.* Journal of the American Ceramic Society, 2006. **89**(6): p. 1876-1882.
119. Okuyama, K. and Lenggoro, I. W., *Preparation of nanoparticles via spray route.* Chemical Engineering Science, 2003. **58**(3-6): p. 537-547.
120. Prenni, A. J., Siefert, R. L., Onasch, T. B., Tolbert, M. A., and DeMott, P. J., *Design and characterization of a fluidized bed aerosol generator: A source for dry, submicrometer aerosol.* Aerosol Science and Technology, 2000. **32**(5): p. 465-481.
121. Wang, W. N., Widiyastuti, W., Lenggoro, I. W., Kim, T. O., and Okuyama, K., *Photoluminescence optimization of luminescent nanocomposites fabricated by spray pyrolysis of a colloid-solution precursor.* Journal of the Electrochemical Society, 2007. **154**(4): p. J121-J128.
122. Mikrajuddin, Iskandar, F., Okuyama, K., and Shi, F. G., *Stable photoluminescence of zinc oxide quantum dots in silica nanoparticles matrix prepared by the combined sol-gel and spray drying method.* Journal of Applied Physics, 2001. **89**(11): p. 6431-6434.
123. Lu, Y. F., Fan, H. Y., Stump, A., Ward, T. L., Rieker, T., and Brinker, C. J., *Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles.* Nature, 1999. **398**(6724): p. 223-226.
124. Areva, S., Boissiere, C., Grosso, D., Asakawa, T., Sanchez, C., and Linden, M., *One-pot aerosol synthesis of ordered hierarchical mesoporous core-shell silica nanoparticles.* Chemical Communications, 2004(14): p. 1630-1631.

125. Baccile, N., Grosso, D., and Sanchez, C., *Aerosol generated mesoporous silica particles.* Journal of Materials Chemistry, 2003. **13**(12): p. 3011-3016.
126. Boissiere, C., Grosso, D., Amenitsch, H., Gibaud, A., Coupe, A., Baccile, N., and Sanchez, C., *First in-situ SAXS studies of the mesostructuration of spherical silica and titania particles during spray-drying process.* Chemical Communications, 2003(22): p. 2798-2799.
127. Boissiere, C., Nicole, L., Gervais, C., Babonneau, F., Antonietti, M., Amenitsch, H., Sanchez, C., and Grosso, D., *Nanocrystalline mesoporous gamma-alumina powders "UPMC1 material" gathers thermal and chemical stability with high surface area.* Chemistry of Materials, 2006. **18**(22): p. 5238-5243.
128. Eerikäinen, H., *Preparation of nanoparticles consisting of methacrylic polymers and drugs by an aerosol flow reactor method.* VTT Publication, 2005.
129. Eerikainen, H. and Kauppinen, E. I., *Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method.* International Journal of Pharmaceutics, 2003. **263**(1-2): p. 69-83.
130. Eerikainen, H., Kauppinen, E. I., and Kansikas, J., *Polymeric drug nanoparticles prepared by an aerosol flow reactor method.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(1): p. 136-143.
131. Eerikainen, H., Peltonen, L., Raula, J., Hirvonen, J., and Kauppinen, E. I., *Nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by an aerosol flow reactor method.* AAPS PharmSciTech, 2004. **5**(4): p. e68.
132. Eerikainen, H., Watanabe, W., Kauppinen, E. I., and Ahonen, P. P., *Aerosol flow reactor method for synthesis of drug nanoparticles.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **55**(3): p. 357-360.
133. Raula, J., Eerikainen, H., and Kauppinen, E. I., *Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles.* International Journal of Pharmaceutics, 2004. **284**(1-2): p. 13-21.
134. Lohmannsroben, H. G., *Photophysical properties and laser performance of rubrene.* Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry, 1988. **47**(2): p. 195-199.
135. Karlik, M. and Jouffrey, B., *Etude des métaux par microscopie élecrtonique en transmission (MET).* Technique de l'ingénieur. **M 4 134**.
136. Pawley, J. B., *Handbook of biological confocal microscopy*, ed. London, e. 1995.
137. Minsky, M., *Microscopy apparatus*. 1957, Patent, US.
138. Minsky, M., *Memoi on inventing the confocal scanning microscope*. Scanning, 1988. **10**(4): p. 128-138.
139. Scion Corporation. *http://www.scioncorp.com*. [cited].

Chapitre II :

Optimisation des conditions expérimentales et des paramètres de synthèse

Introduction …….. **63**

1. Séchage d'aérosol par nébulisation pneumatique ……..... **63**
1.1. Montage …….. 63
1.2. Test du réacteur pneumatique et contrôle des premiers résultats ……... 66
1.3. Conclusions sur les premiers tests d'élaborations ……... 69
2. Optimisation des paramètres physiques du procédé de nébulisation ……..…..... **70**
2.1. Impact de la pression d'azote sur la nébulisation ……..... 71
2.2. Températures du four et du filtre électrostatique ……... 74
2.2.1. Optimisation et profil thermique du four ……... 74
2.2.2. Utilisation du filtre électrostatique ……... 76
2.3. Débit du gaz vecteur : air ……... 78
2.4. Conclusion ……..... 80
3. Optimisation des paramètres chimiques du procédé sol-gel …….. **81**
3.1. Rôle du solvant …….. 81
3.2. Nature de la matrice silicatée – Choix des précurseur sol-gel ……..…..... 84
3.3. Fluorophore de référence ……... 87
3.3.1. Choix du fluorophore …….. 87
3.3.2. Optimisation du taux de fluorophore……..…..... 90
3.3.3. Affinité fluorophore / matrice ……... 93
3.3.3.1. Matrice TMOS ……... 93
3.3.3.2. Matrice TMOS – MTMOS ……... 94
3.3.3.3. Matrice TMOS – TMSE ……... 96
3.3.3.4. Matrice TMOS – BTP ……... 99
3.3.4. Première mise en évidence d'un cœur cristallin CMONS……..... 100
3.3.4.1. Observation du cœur organique de CMONS au MEB …….....100
3.3.4.2. MET en mode diffraction électronique ……... 102
3.4. Conclusion ……... 106
4. Elaboration de nanoparticules hybrides avec d'autres types de fluorophores ... 107
4.1. Les molécules organiques ……... 107
4.2. 4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4*H*-pyran...108
4.3. Le 1,4-Bis[1-cyano-2-(4-diphenylamino)phenyl)vinyl]benzene ……... 109
4.3.1. Nanocristallisation du COPVB dans la matrice silicatée ……..... 111
4.3.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE ……... 111
4.3.1.2. Matrice 8 TMOS + 1 BTP ……... 113
4.3.2. Conclusion ……... 113
4.4. Les composés dicyanoisophorones et tricyanoisophorones ……..……. 114
4.5. Conclusion ……..... 116

Conclusion du chapitre …….. **117**

Bibliographie …….. **118**

Introduction

Dans ce deuxième chapitre, nous allons dans un premier temps présenter un autre type de générateur d'aérosol par nébulisation pneumatique et comparer les résultats de nanocristallisation à ceux obtenus par nébulisation piézoélectrique. Ensuite, nous analyserons les effets de chaque paramètre physique et chimique permettant l'optimisation de l'élaboration des nanoparticules hybrides par nébulisation. La maîtrise de ces paramètres expérimentaux va permettre de définir les meilleures conditions expérimentales favorisant l'élaboration et la collecte de particules avec des diamètres inférieurs à 100 nm, luminescentes, hydrophiles et biocompatibles. Nous avons pour cela agi à la fois sur la technique de « spray-drying » en faisant varier les paramètres de synthèse, mais aussi en adaptant au mieux la chimie sol-gel à ce procédé. Enfin, nous avons étendu le procédé de synthèse à différents types de fluorophores afin d'optimiser d'une part les propriétés de fluorescence (excitation à deux-photons) des nanoparticules et de démontrer d'autre part le côté générique de cette méthode d'élaboration.

1. Séchage d'aérosol par nébulisation pneumatique

Pour la suite de l'étude, nous avons décidé d'utiliser un autre type de nébuliseur. Dans ce cas, la source permettant la nébulisation de la solution n'est plus piézoélectrique mais pneumatique. Cette technique, plus facile à mettre en œuvre que la méthode piézoélectrique, est très présente dans la bibliographie et a fait ses preuves pour l'élaboration de poudres très diverses, dans le cadre de la préparation de particules mésoporeuses [1-4] ou de polymères destinés au relargage de médicaments [5-9] par exemple.

1.1. Montage

Le principe de ce réacteur pneumatique est basé sur la fragmentation d'un film de liquide par un flux de gaz sous pression arrivant perpendiculairement. La solution à nébuliser est placée dans un récipient en dessous d'une buse de pulvérisation connectée à une arrivée de gaz (air, azote,…). Cette arrivée de gaz crée une dépression au sein de la buse par effet Venturi permettant ainsi l'aspiration de la solution via un capillaire, figure 1.

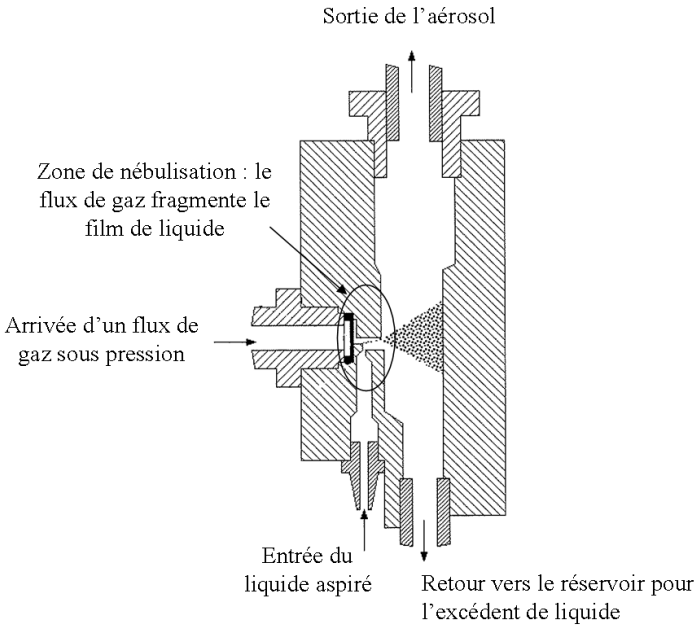


Figure 1 - Représentation schématique d'une buse de nébulisation par fragmentation d'un film liquide sous un flux de gaz sous pression.

L'effet Venturi, du nom du physicien italien Giovanni Battista Venturi, est le nom donné à un phénomène de la dynamique des fluides où les particules gazeuses ou liquides se retrouvent accélérées à cause d'un rétrécissement de leur zone de circulation. Il peut être utilisé pour créer une dépression et ainsi réaliser une aspiration. Ce principe est appliqué dans de nombreux cas dont les carburateurs des moteurs à combustion interne mais aussi pour améliorer la portance d'une aile d'avion.

Dans notre cas, c'est au niveau de la buse d'injection qu'il se produit un rétrécissement diminuant la pression. Cette dépressurisation conduit à l'aspiration du liquide se situant dans le réservoir. Le film de solution ainsi entraîné est fragmenté par le gaz conduisant à la formation d'un brouillard composé de gouttes polydisperses. Cependant, le nébuliseur TSI sélectionné, modèle 3076 – Constant Output Atomizer TSI-Incorporated [10, 11] permet de générer des tailles de gouttes bien centrées autour de 1 – 2 µm ce qui permettra d'obtenir après séchage des tailles de particules nanométriques. Pour permettre le séchage du brouillard et la collecte des particules, le nébuliseur a été couplé à un four puis à un filtre électrostatique, tous deux régulés en température, figure 2.

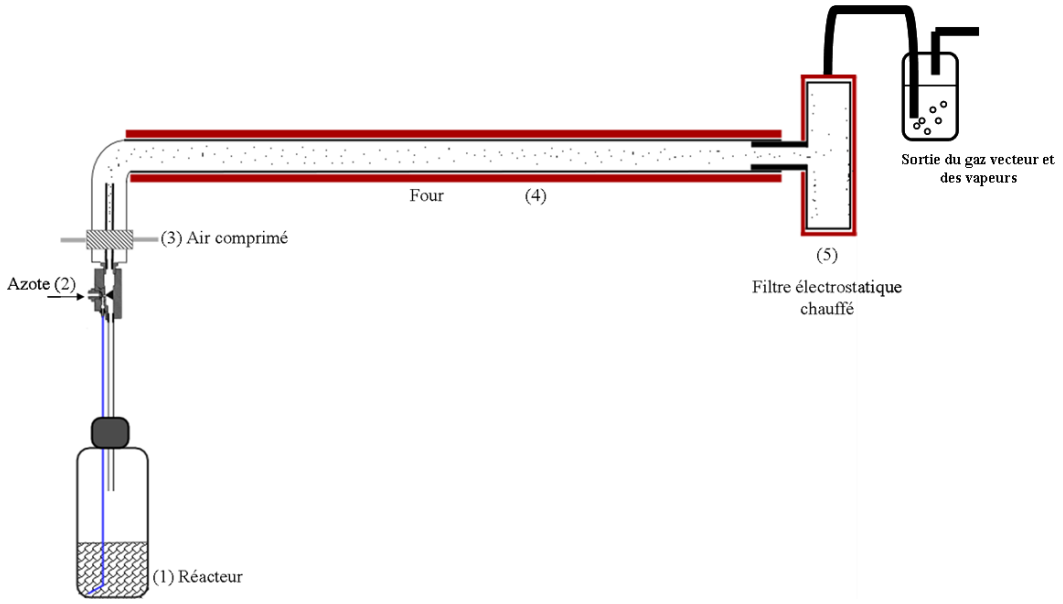


Figure 2 - Schéma du réacteur de nébulisation couplé avec un four et un filtre électrostatique.

Le réacteur se compose de cinq parties distinctes qui conditionnent l'élaboration des nanoparticules. Une optimisation des paramètres d'utilisation de chacune de ces parties est nécessaire pour contrôler la nébulisation de la solution, le séchage des gouttelettes et la collecte des particules sèches.

- (1) La solution à nébuliser est placée dans un flacon fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon. Le bouchon est traversé par deux capillaires. Le premier plonge dans la solution et permet à celle-ci d'être acheminée vers la buse de nébulisation. Le second est un système de vidange qui permet le retour du surplus de solution non-nébulisée, figure 1.

- (2) La buse de pulvérisation [10] est alimentée par une arrivée de gaz. Pour la fragmentation du sol, le gaz utilisé est de l'azote U de chez Air Liquide. Le débit d'azote est contrôlé à l'aide d'un débitmètre. Le débit de pulvérisation de la solution varie en fonction de la pression d'azote (0,8 à 2,4 bars). Plus la pression est élevée, plus vite la solution est amenée à la buse pour être pulvérisée par amplification de l'effet Venturi. C'est pourquoi nous avons limité la pression d'azote comme nous le verrons § 2.1.

- (3) En sortie de la buse de pulvérisation, nous avons ajouté une arrivée d'air comprimé passant préalablement à travers une membrane desséchante et un filtre charbon pour éliminer les impuretés avant d'être envoyé dans le four avec un débit

variant de 1 à 4 L/min. Ce flux vecteur de l'aérosol doit être le plus laminaire possible afin d'éviter ou de limiter les collisions entre particules ainsi que les contacts des particules avec les parois. De plus, cette arrivée d'air permet d'augmenter rapidement le volume gazeux diluant l'aérosol et favorisant ainsi son séchage.

- (4) L'aérosol circule ensuite sous flux laminaire (nombre de Reynolds : Re < 2300) [5] dans un four thermostaté. Durant ce transport, le solvant s'évapore rapidement conduisant cependant à un séchage progressif des gouttelettes qui doivent être totalement sèches en sortie de four.
- (5) En sortie du four tubulaire, le filtre électrostatique permet la collecte des particules sèches. Les particules sont chargées en appliquant une haute tension (12 kV) ce qui favorise ainsi leur collecte sur une électrode. Ce filtre est lui aussi thermostaté afin d'achever éventuellement le séchage des particules et d'empêcher surtout toute condensation des différentes vapeurs générées durant le passage dans le four (solvant organique, alcools et eau issus du procédé sol-gel).

Il apparait clairement que tous ces points sont critiques et qu'il est primordial d'étudier en détail leurs impacts sur la formation des nanoparticules (voir § 2).

1.2. Test du réacteur pneumatique et contrôle des premiers résultats

Dans un premier temps, nous avons testé ce nouveau réacteur avec le même type de solution sol-gel que celles utilisées au cours des tests préliminaires (chapitre I, § 3.3.1.). Nous nous sommes aussi basé sur les paramètres physiques utilisés lors des premières élaborations (nébulisation piézoélectrique) que nous avons adaptés à la technique d'atomisation par source pneumatique.

Nous avons donc défini les paramètres suivants afin de procéder aux premiers tests :

- Pression d'Azote : 2 bars
- Débit d'air comprimé : 2 L/min
- Température du four : 150 °C
- Longueur du four : 100 cm
- Fluorophore : Rubrène

- Solvant : THF
- Matrice sol-gel : TMOS + MTMOS

Nous avons tout d'abord travaillé sans le filtre électrostatique. Nous avons donc collecté les particules sur des lames de verre chauffées placées perpendiculairement à l'embouchure du four comme pour les premiers tests réalisés avec le nébulisateur piézoélectrique. Ces lames ont été observées au MEB (figure 3).

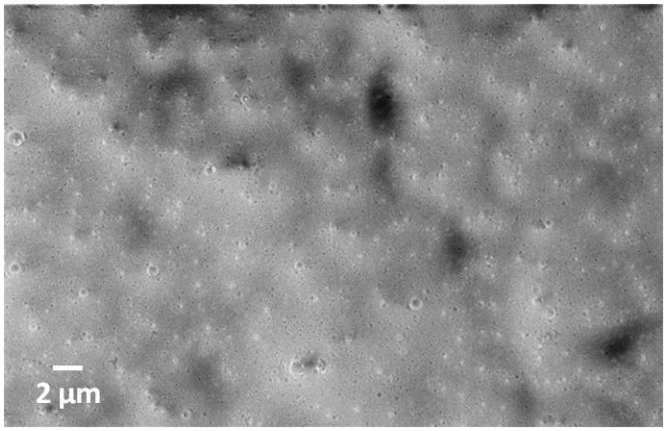


Figure 3 - Image MEB de nanoparticules non totalement séchées conduisant par coalescence à la formation d'une couche mince.

Les particules ont fortement coalescé pour aboutir à la formation d'une couche mince pratiquement continue. Le temps de résidence dans le four s'avère être insuffisant, les particules sont partiellement sèches à la sortie du four et forment donc une couche mince sur la lame de verre comme c'est le cas pour la méthode « d'aéro sol-gel » [12-19]. Il faut donc augmenter le temps de séjour des particules dans le four pour permettre l'évaporation totale du solvant et garantir ainsi un séchage complet des particules en sortie de réacteur.

Nous n'avons pas pu augmenter significativement la température du four à cause du risque de fusion ou de décomposition de la phase organique. D'autre part, on ne peut pas réduire significativement la vitesse d'écoulement du flux gazeux sous peine de ne plus être en conditions de flux laminaires et d'avoir des dépôts incontrôlés dans le four ou de la coalescence de gouttes ou de particules en cours de séchage. C'est pourquoi, nous avons choisi d'augmenter le temps de séjour des gouttelettes en augmentant la longueur du four tubulaire (zone 4, figure 2) de 100 à 160 cm. La deuxième série de tests a été réalisée dans les mêmes conditions et les échantillons ont été ensuite observés au MEB pour avoir une

visualisation directe de l'impact ou non de l'allongement du four sur le séchage des particules (figure 4).

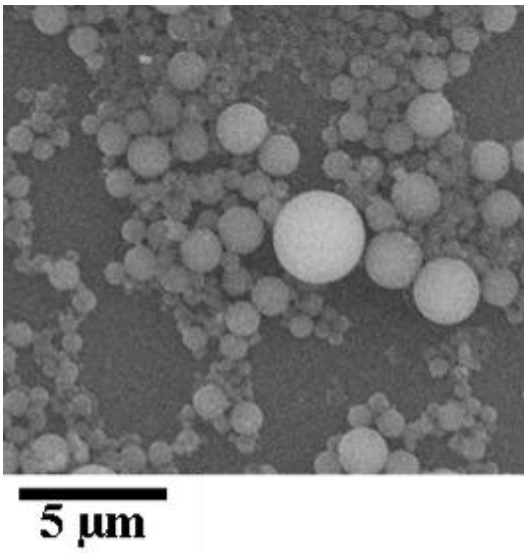


Figure 4 - Image MEB de nanoparticules obtenues à l'aide du réacteur pneumatique après augmentation de la longueur du four.

L'augmentation de la longueur du four a permis d'allonger suffisamment le temps de séchage des gouttelettes permettant ainsi l'obtention de particules parfaitement sèches lors de leur collecte en sortie du four. D'autre part, nous pouvons constater que la distribution de taille des particules est similaire à celle obtenue lors des premiers tests : diamètres des nanoparticules compris entre 80 et 700 nm. Comme avec la source piézoélectrique, les particules sont bien individualisées et possèdent une forme bien sphérique et une surface lisse. La morphologie et la taille des particules ne sont logiquement pas impactées par le type de source générant la nébulisation de la solution sol-gel. Par contre, il est apparu clairement lors de ces premiers essais d'élaboration avec ce nouveau type de réacteur que la température et le temps de séjour des gouttelettes dans le four sont deux paramètres primordiaux pour garantir de bonnes conditions d'élaboration. Enfin, cette observation a démontré qu'il n'y a pas de trace de la phase organique à l'extérieur des particules démontrant ainsi son bon confinement au cœur des sphères silicatées.

Pour compléter ces premiers tests, les échantillons ont été observés en microscopie optique confocale afin de vérifier la présence de molécules fluorescentes au cœur des particules. La figure 5 représente la superposition de deux clichés pris en réflexion puis en fluorescence à l'aide du microscope confocal avec le même code couleur que précédemment (chapitre I, §

3.3.2.4, figure 20). Comme lors des premiers tests avec le réacteur piézoélectrique, toutes les particules présentent une forte intensité de fluorescence. Les deux clichés de réflexion et de fluorescence sont parfaitement superposables. Nous pouvons affirmer ainsi que la fluorescence des poudres est due à la forte fluorescence du rubrène présent au cœur des particules.

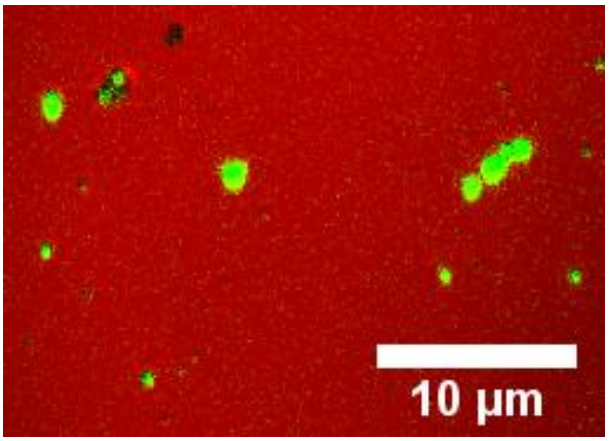


Figure 5 - Superposition de deux clichés pris au microscope confocal (couleurs arbitraires) : en rouge le cliché pris en réflexion et en vert le cliché pris en mode fluorescence.

1.3. Conclusions sur les premiers tests d'élaborations

Grâce à cette première série de tests, nous avons pu démontrer la faisabilité de la synthèse de ce nouveau type de nanoparticules hybrides organo-minéraux [20, 21]. De plus, cette élaboration est logiquement indépendante de la nature de la source générant la nébulisation de la solution sol-gel. Nous avons obtenu des particules fluorescentes individuelles, sphériques dont la rugosité de surface est très faible ce qui est très favorable au développement de traceurs pour l'imagerie médicale. Ce procédé semble également conduire à une très bonne incorporation de la phase organique. Pour la suite de l'étude, nous avons utilisé exclusivement le réacteur avec la source pneumatique pour des raisons de simplicité, de robustesse et de sécurité de cet équipement. En effet, les volumes de solvants volatils utilisés sont très importants (plusieurs centaines de mL), et contrairement au réacteur piézoélectrique, il n'y a pas de risque d'échauffement et de vaporisation incontrôlée de la solution avec la nébulisation pneumatique. De plus, l'ensemble du réacteur de nébulisation, chambre de dissolution et four tubulaire sont en acier inoxydable facilement démontable au lieu du verre dans le cas du réacteur piézoélectrique.

2. Optimisation des paramètres physiques du procédé de nébulisation

Pour développer le procédé de synthèse par nébulisation, le rendre reproductible, générique et transposable, il est indispensable de définir et d'optimiser les paramètres clés de cette élaboration. Lors des premiers tests, il a été souligné l'importance d'augmenter la longueur du four afin d'accroître le temps de séchage et obtenir ainsi des particules sèches en sortie de réacteur (§ 1.2.). Mais, comme on peut le voir sur le schèma du réacteur, figure 2, l'optimisation des paramètres physiques de la nébulisation passe par le contrôle de :

- La pression d'azote à l'entrée de l'injecteur
- La température du four
- Le débit de gaz vecteur (air) injecté en sortie de buse

Les différents paramètres ont été testés indépendamment afin de préciser leurs effets. Pour cela, nous avons utilisé des solutions identiques à nébuliser pour ne pas impliquer les paramètres chimiques qui seront optimisés dans un deuxième temps (voir § 3.) Pour cette première étape d'optimisation des conditions d'élaboration des nanoparticules, nous avons travaillé avec des sols de composition suivante : TMOS/MTMOS + THF (s = 50) + HCl (1M) (h = 1) + fluorophore (d = 0,01), avec un vieillissement des sols de 15 jours à 60°C puis stockés une semaine à température ambiante. Dans le cadre de cette étude, les essais ont été réalisés avec un autre fluorophore organique. Le CMONS (figure 6, cf. § 3.2.1.) a été choisi comme fluorophore organique de référence au lieu du rubrène car il a déjà été utilisé pour l'élaboration de nanocristaux insérés en sol-gel massif [22, 23] et en couches minces dans notre équipe [24-26]. De plus, ce fluorophore est très stable (photostable) et ne fluoresce que dans l'état cristallin. D'autre part, nous le synthétisons et le purifions aisément au laboratoire (§3.3.1).

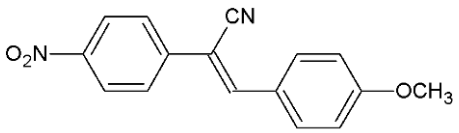


Figure 6 - Schéma de la molécule de CMONS : (α-[(4'-methoxyphenyl)methylene]-4-nitro-benzeneacetonitrile) utilisé comme fluorophore de référence dans la suite de cette étude.

2.1. Impact de la pression d'azote sur la nébulisation

Pour nébuliser les sols, nous utilisons le modèle 3076 – Constant Output Atomizer de TSI-Incorporated [10, 11]. Il peut être utilisé avec un ou deux flacons. En adaptant deux flacons, nous évitons de mélanger la fraction de solution non nébulisée à la solution initiale. Cela engendre une perte de solution et de fluorophore dont la synthèse peut être délicate et chère. Pour limiter les pertes et pour plus de facilité, nous avons utilisé un seul flacon mais en réduisant au maximum le retour de liquide non nébulisé (figure 1). La pression maximale à l'entrée de la buse de nébulisation est ainsi limitée à 2,4 bars. Les gouttelettes formées ont des diamètres variant entre 0,3 à 2 µm. Une dernière instruction du fournisseur nous informe que lorsqu'on travaille avec des solutions très faiblement concentrées (de l'ordre de 0,0001 g/cm^3 de soluté), la taille des particules une fois sèches varie entre 20 et 300 nm. D'après ces informations, la pression d'azote injectée en entrée de buse va conditionner non seulement la vitesse de la nébulisation (impact sur l'effet Venturi), mais aussi le volume de solution non nébulisée retournant dans le flacon ainsi que la taille et la distribution de taille des gouttelettes générées et donc la distribution en taille des particules obtenues.

Dans un premier temps, il faut choisir le gaz à utiliser pour nébuliser la solution. Il est important de travailler avec un gaz de pureté élevée. Le choix du gaz s'est porté sur de l'azote U d'Air Liquide. Cependant, nous aurions également pu utiliser une bouteille d'air de même pureté. Dans un deuxième temps, il a fallu définir la gamme de pression d'azote rendant possible cet effet d'aspiration qui permet l'acheminement de la solution jusqu'à la buse de nébulisation. Nous avons fait varier la pression d'azote entre 0 et 2,4 bars et nous avons observé visuellement le comportement du fluide. Trois zones de pressions ont été définies :

- 0 à 0,6 bar : la pression de gaz est insuffisante pour pouvoir permettre l'aspiration de la solution jusqu'à la buse de nébulisation.
- 0,6 à 1,6 bars : la pression permet d'aspirer la solution à une vitesse modérée. Toute la solution aspirée n'est pas nébulisée dès la première fois, cependant la fraction de solution qui retourne dans le flacon est faible.
- 1,6 à 2,4 bars : la pression assure une vive aspiration de la solution. Le retour de solution non nébulisée vers le flacon augmente fortement.

La première zone n'est pas étudiée car elle ne permet pas d'effectuer la nébulisation. Nous allons donc nous pencher sur les zones 2 et 3. Pour mettre en évidence une différence de comportement, nous nous sommes placés à des pressions intermédiaires : 1 et 2 bars et avons noté le temps nécessaire pour nébuliser totalement un volume fixe de solution. Il faut deux fois plus de temps pour nébuliser la solution avec une pression de 1 bar qu'avec 2 bars de pression. Le débit de nébulisation est de l'ordre de 0,04 L/h pour une pression de nébulisation de 1 bar contre un débit de 0,08 L/h pour une pression de 2 bars. De plus, dans les deux cas, au cours de la nébulisation la solution contenue dans le flacon se concentre au cours du temps à cause du retour de solution non nébulisée (une partie du solvant s'est évaporée). Il est donc à craindre une différence de concentration en soluté entre le début et la fin de la nébulisation. Cependant, ce phénomène de concentration est moins important avec une faible pression car le volume non nébulisé qui revient vers le flacon initial devient négligeable.

Après ces premiers tests, deux options sont envisageables :

- Pression comprise entre 0,6 et 1,6 bars : nébulisation plus lente avec une évolution de la teneur en solvant dans la solution au cours de la synthèse faible.
- Pression comprise entre 1,6 et 2,4 bars : nébulisation de la solution rapide mais avec un fort risque d'évolution de concentration de la solution entre le début et la fin de la synthèse.

Pour compléter ces tests, nous avons effectué des prélèvements en sortie du four à différentes pressions permettant de visualiser l'impact de la pression d'azote sur la distribution de taille des particules. La même solution est nébulisée à l'aide d'une pression d'azote de 1 et 2 bars. Des prélèvements sont effectués en plaçant un substrat de silicium à la sortie du four. Ces prélèvements ont été ensuite observés au MEB et la distribution en taille des nanoparticules a été mesurée.

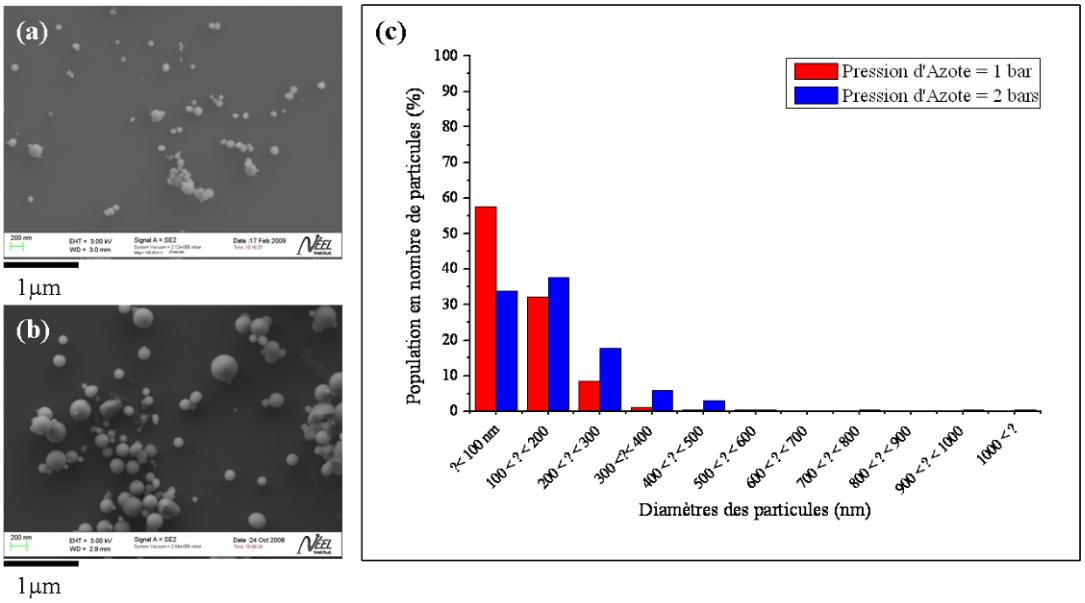


Figure 7 - Impact de la pression d'Azote sur la distribution en taille des diamètres des particules : (a) cliché MEB de particules issues d'une nébulisation sous 1 bar d'Azote, (b) cliché MEB de particules issues d'une nébulisation sous 2 bars d'Azote, (c) représentation statistique de la distribution en taille des particules en fonction de la pression d'Azote appliquée pour la nébulisation.

La figure 7 met en évidence qu'en travaillant avec une pression de nébulisation autour de 1 bar, nous favorisons des petits diamètres de nanoparticules, près de 60% des nanoparticules ont alors un diamètre inférieur à 100 nm. Par contre, si l'on utilise une pression de nébulisation de 2 bars, on obtient des tailles de nanoparticules élevées avec une distribution plus large contenant seulement 30% de nanoparticules dont le diamètre est inférieur à 100 nm. En effet, en utilisant une pression de nébulisation élevée on doit avoir un aérosol présentant en sortie de buse nettement plus de turbulences. Ces turbulences doivent favoriser dans cette zone une coalescence d'une partie des gouttelettes formées ce qui entraine ensuite la formation de particules de plus grand diamètre.

Pour la suite du projet, nous avons donc utilisé des nébulisations lentes, 0,04 L/h, effectuées sous 1 bar de pression d'Azote. Ceci nous permettra de favoriser les plus petits diamètres de nanoparticules et de limiter de plus l'évolution de la composition des solutions au cours du procédé ce qui pourrait entrainer la diminution de la concentration en solvant dans les sols au cours de la nébulisation.

2.2. Températures du four et du filtre électrostatique

Le deuxième facteur à prendre en compte est celui de la température du four qui assure le séchage de l'aérosol et celle du filtre électrostatique où les particules sont collectées. Dans un premier temps, la température du four a été optimisée afin d'obtenir des particules totalement exemptes de solvant. Dans un deuxième temps, le filtre électrostatique thermostaté a été ajouté au montage pour récolter les nanoparticules sèches sans traces de condensation de solvant ou de l'eau.

2.2.1. Optimisation et profil thermique du four

- Choix de la température du four :

La température du four est fixée arbitrairement en prenant en compte deux paramètres :

- Etre en-dessous de la température de fusion de la phase organique pour éviter toute vaporisation et/ou dégradation du produit,
- Etre au-dessus de la température d'ébullition du solvant afin de favoriser son évaporation rapide qui est généralement ralentie par la matrice sol-gel en cours de densification durant la phase de séchage.

Dans le cadre de cette thèse, les deux solvants qui ont été utilisés ont des températures d'ébullition quasi-similaire : 66°C pour le tétrahydrofurane (THF) et 65°C pour le méthanol. Pour garantir le séchage total de l'aérosol et la vaporation complète du solvant, il est donc important de se placer dans des gammes de température nettement plus élevées que la température d'ébullition, soit T > 100°C. D'autre part, l'autre paramètre limitant est la température de fusion des fluorophores. Les tests ont été effectués avec le CMONS qui possède un point de fusion de 165°C. Pour éviter tout risque de dégradation thermique du composé, il est judicieux de travailler à une température légèrement plus basse. Nous avons choisi d'emblée de fixer la température du four à 150°C. A cette température, l'aérosol sèche parfaitement sans risque de contamination par des traces résiduelles de solvant tout en préservant la stabilité du fluorophore et ses propriétés physico-chimiques.

- Profil thermique du four

Avant d'effectuer des tests réels de séchage de particules, le profil thermique du four a été déterminé afin de vérifier son homogénéité tout au long du tube. La source de chaleur provient d'une résistance chauffante régulée par un rhéostat et enroulée autour d'un tube en

acier inoxydable, figure 12-a. Les profils thermiques ont été effectués sur la longueur du four mais aussi en fonction de la position radiale. Ces mesures ont été effectuées dans les conditions normales d'élaboration avec des flux gazeux définis dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire avec une solution contenant uniquement du THF nébulisée sous 1 bar d'azote et avec un débit de gaz vecteur de 2 L/min. La sonde est placée dans le tube et des relevés en température sont effectués sur la longueur du four ainsi qu'au niveau la répartition radiale de la température dans le tube.

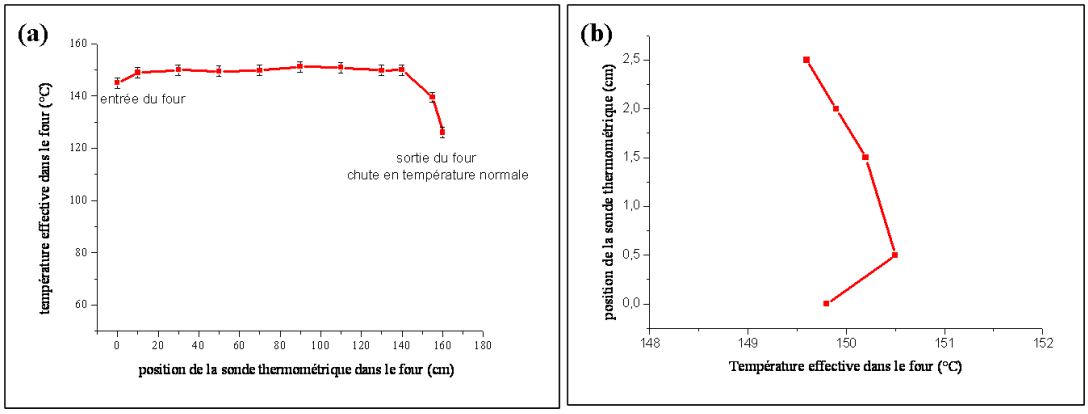


Figure 8 - (a) profil longitudinal à ± 2°C et (b) transversal à ± 2°C en température du four pour une température de consigne de 150°C.

La figure 8–a met en évidence que la température est bien homogène dans la longueur du four excepté les 10 cm en sortie du tube ce qui est un comportement normal. En effet, la diminution de température à la sortie du four est due au fait que pour ces mesures, nous avons dû laisser la sortie du four accessible, ce qui n'est pas le cas lorsque le four est connecté au filtre électrostatique lui-même thermalisé. Nous pouvons donc estimer que le four est parfaitement homogène en température et qu'il est donc correctement régulé. La figure 8–b correspond au profil transversal en température mesuré au centre du four. Le front de propagation de la chaleur au sein du tube est quasi-linéaire compte tenu de l'incertitude de ± 2°C sur la température relevée. La température est donc également répartie ce qui est favorisé par la présence du gaz vecteur qui homogénéise la chaleur sur toute la longueur du four.

Les conditions en pression d'azote et de débit de gaz vecteur favorisent une trajectoire linaire du brouillard. Les perturbations étant minimisées grâce à un flux de gaz vecteur laminaire, la coalescence de gouttes ou de particules en cours de séchage est réduite ce qui

est indispensable à l'obtention de nanoparticules individualisées présentant des distributions de taille relativement étroites.

2.2.2. Utilisation du filtre électrostatique

Le filtre électrostatique a ensuite été positionné en sortie du four afin de collecter les particules sèches. Ce filtre est lui aussi régulé en température pour éliminer tout solvant résiduel dans les nanoparticules et surtout éviter toute condensation de solvant en sortie du four. Cependant, il faut définir au mieux la température à laquelle les particules vont être stockées durant tout le temps de l'élaboration. Ce temps peut varier entre 1 et 8 h selon le volume de solution à nébuliser.

Pour les raisons déjà avancées dans le paragraphe précédent, la température du four ne peut pas excéder la température de fusion de la phase organique pour éviter tout risque de dégradation thermique. D'après la littérature et nos premiers tests, la température du filtre doit être plus basse que celle du four car les particules vont y être déposées durant plusieurs heures. Compte tenu des différents produits issus du procédé sol-gel (alcool, eau, solvant organique) la température du filtre doit être supérieure à 100°C, la température d'ébullition, de l'eau afin d'éviter toute condensation de vapeur dans le filtre électrostatique car il représenterait ainsi un point froid par rapport au four. Il faut donc comme pour la température du four se limiter à une température maximale de 160°C afin d'éviter la vaporisation ou dégradation du fluorophore, CMONS, initialement utilisé comme référence et dont la température de fusion T_{fusion} = 165°C (annexe I).

Dans un premier temps, nous nous sommes placés aux conditions thermiques limites afin d'avoir un écart de température important : ΔT = 50°C. La température relative du four a été fixée à 160°C et celle du filtre électrostatique à 110°C. La figure 9 a été faite au MEB, elle a mis en évidence que les particules sont certes sphériques mais ne sont pas individualisées. Une gangue de phase organique s'est déposée autour des nanoparticules.

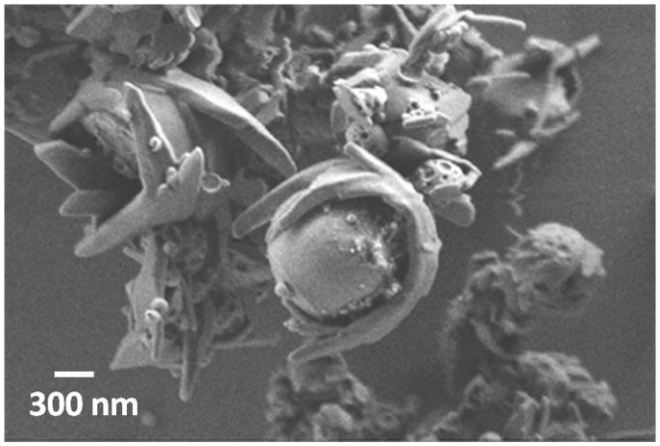


Figure 9 - Clichés MEB de nanoparticules issues de la nébulisation d'un sol puis d'un séchage à 160°C et déposées dans le filtre électrostatique thermostaté à 110°C.

Ce dépôt est dû à la sublimation du CMONS dans le four. La température du four, 160°C, est trop proche de la température de fusion du CMONS, 165°C, entrainant la perte de CMONS sous forme de vapeur. Lors du passage de la vapeur de CMONS dans le filtre électrostatique, la température étant fixée à 110°C, il y a condensation du fluorophore autour des nanoparticules déjà présentes car nous sommes en-deçà de la température de cristallisation du CMONS, $T_{cristallisation}$ = 157°C. Ce premier test a permis de mettre en évidence l'importance de s'éloigner de la température de fusion du fluorophore pour éviter son passage à l'état gazeux et de limiter l'écart de température entre le filtre et le four pour éviter les risques de condensation des vapeurs autour des particules.

Un deuxième essai a été réalisé en fixant la température du four à 120°C et celle du filtre à 110°C. Dans ces conditions, nous étions fortement éloignés de la température de fusion du CMONS tout en gardant une marge pour éviter la condensation de l'eau dans le filtre électrostatique. Ce test n'a pas été concluant car le produit final s'est avéré être une couche mince que nous n'avons pas pu observer au MEB. Les nanoparticules sont arrivées partiellement sèches dans le filtre électrostatique et ont formé une couche mince sur l'électrode de collecte. La température de four n'était pas assez importante pour permettre l'évaporation totale du solvant durant le temps de résidence du brouillard dans le four tubulaire. De plus, l'évaporation du solvant est ralentie par la coquille silicatée en cours de densification.

C'est pourquoi, nous avons ensuite fixé la température du four à 150°C afin d'être significativement plus bas que la température de fusion du CMONS. La température du

filtre a été quant à elle fixée à 140°C pour limiter l'écart en température avec le four et éviter de faire du filtre un « point froid » propice à la condensation des vapeurs. Cet ajustement des paramètres thermiques a permis d'obtenir des nanoparticules bien sphériques et individualisées avec une coquille silicatée bien lisse et qui semble, à priori, exempte de toute trace de phase organique condensée autour, figure 10.

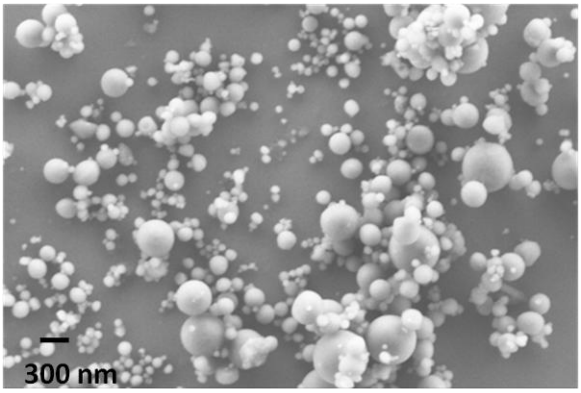


Figure 10 - Cliché MEB de nanoparticules issues de la nébulisation d'un sol séché à 150°C dans le four tubulaire qui ont ensuite été déposées dans le filtre électrostatique thermostaté à 140°C.

Ainsi, pour les élaborations qui ont suivi les paramètres thermiques ont été fixés à 150°C pour le four et 140°C pour le filtre électrostatique car cela a permis d'obtenir des nanoparticules bien sèches sans risquer de sublimer ou vaporiser le fluorophore et de faire condenser des vapeurs organiques résultantes à l'extérieur des nanoparticules.

2.3. Débit du gaz vecteur : air

L'étude bibliographique a souligné l'importance d'ajouter une source secondaire de gaz au flux d'azote utilisé pour nébuliser la solution afin d'assurer le transport total du brouillard nébulisé par la buse de pulvérisation jusqu'au filtre électrostatique sous un flux laminaire. Les gouttelettes du brouillard se densifient au cours de leur passage dans le four. Sans la présence du gaz vecteur secondaire, le flux d'azote seul ne peut pas assurer les transports des particules les plus denses. L'importance d'ajouter le gaz vecteur est accrue dans notre cas car la longueur du four est deux fois plus importante (160 cm) que dans les différents cas présentés dans la littérature (80 cm), nos températures de travail étant plus basses [1-4]. La littérature montre que pour travailler dans des conditions garantissant le transport des nanoparticules dans un flux laminaire, il faut que le débit du gaz vecteur soit compris entre 1,5 et 4 L/min pour un diamètre de tube de 30 mm, ce qui permet d'avoir un nombre de Reynolds Re < 2300.

Différents débits d'air ont été testés avec des sols nébulisés identiques :

- 1,5 L/min : les particules obtenues sont sèches et sphériques (figure 11-a).
- 4 L/min : le produit obtenu est composé à la fois de particules bien sèches et sphériques et de copeaux de couches minces (figure 11-b). Le temps de séjour des particules dans le four n'est donc pas suffisant pour assurer l'évaporation complète du solvant.

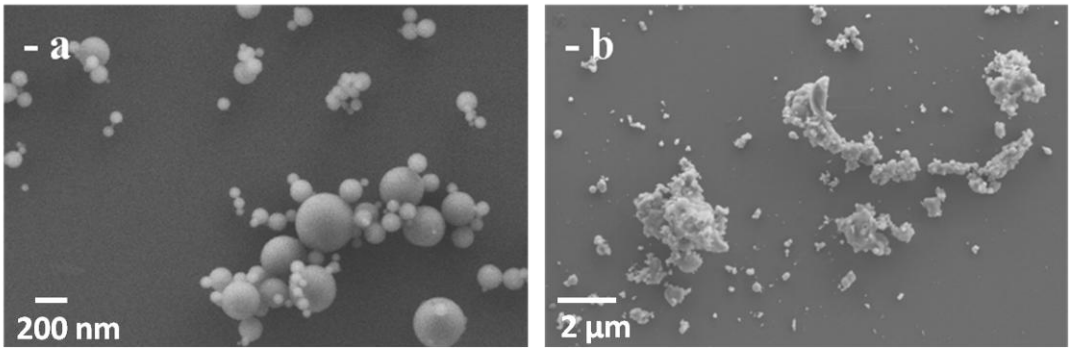


Figure 11 - Cliché MEB de deux solutions identiques soumises à deux débits d'air comprimé différents : (a) 1,5 L/min et (b) 4 L/min

Deux autres débits ont été testés : 2 L/min et 3 L/min, qui ont permis d'obtenir comme dans le cas d'un débit d'air de 1,5 L/min des nanoparticules bien sphériques et sèches. Cependant, ils ont été écartés pour la suite car il a été observé une baisse du rendement de synthèse passant de 80%, pour un débit de 1,5 L/min, à 50% et 30% de rendement massique pour des débits de 2 L/min et de 3 L/min. Pour confirmer cette observation, ces trois débits ont été testés à nouveau en ajoutant à la sortie du filtre électrostatique un piège à eau. Nous avons pu ainsi voir que lorsque le débit est de 3 L/min, l'eau du piège se colorait très rapidement, preuve que les nanoparticules étaient entrainées par le flux gazeux en dehors du filtre. Ce phénomène de coloration était faible pour un débit de 2 L/min et négligeable pour un débit de 1,5 L/min.

Pour collecter la quasi-totalité des nanoparticules, il faut travailler avec un débit d'air comprimé de 1,5 L/min. Ce débit permet à la fois d'assurer un flux laminaire du brouillard dans le four et un temps de séjour suffisant pour permettre l'évaporation totale du solvant et la densification complète des particules avant le stockage dans le filtre électrostatique, mais aussi de minimiser les pertes en sortie de réacteur.

2.4. Conclusion

Cette série de test a permis de définir et d'optimiser les différents paramètres physiques nécessaires pour obtenir des nanoparticules hybrides cœur/coquille sèches, individualisées de petites tailles. Pour garantir une synthèse en une étape reproductible, les paramètres physiques de la nébulisation, séchage et stockage sont :

Pression d'azote pour la nébulisation	1 bar
Température du four	150°C
Température du filtre électrostatique	140°C
Débit d'air comprimé	1,5 L/min

(a)

(b)

Figure 12 - Photos de l'évolution du réacteur : (a) réacteur initial et (b) réacteur final étanche et isolé thermiquement.

L'optimisation des paramètres physiques a également permis de mettre en place la version finale du réacteur. La figure 14 montre l'évolution du réacteur avec la mise en place de caissons isolants autour du four tubulaire et du filtre électrostatique régulés en température. Ainsi, les tests pour optimiser les paramètres chimiques ont ensuite été effectués dans des conditions optimales de stabilité thermique.

3. Optimisation des paramètres chimiques du procédé sol-gel

La partie précédente a souligné l'importance des paramètres physiques de synthèse sur l'aspect final des nanoparticules. Afin de compléter ces résultats, nous avons ensuite optimisé les paramètres chimiques clés mis en jeu au niveau des solutions de départ. L'objectif est d'obtenir des nanoparticules composées d'un cœur organique cristallin très fluorescent et d'une coquille amorphe silicatée hydrophile. De plus, il est important d'obtenir une majorité de nanoparticules ayant un diamètre inférieur à 100 nm. Pour cela, il va falloir non seulement faire varier la quantité de fluorophore à insérer, mais aussi la quantité et la nature des alcoxydes de silicium ainsi que le taux de solvant (dilution) des solutions initiales. Chaque paramètre est étudié indépendamment afin d'éviter de coupler leurs effets : le taux de solvant, le taux de fluorophore et le type d'alcoxydes de silicium utilisés. A la suite de ces tests, nous vérifierons l'hypothèse émise dans le chapitre I concernant la présence d'un cœur cristallin dans les nanoparticules. Pour l'ensemble de ces tests, la molécule organique de référence utilisée est le CMONS. Dans un premier temps, le choix des alcoxydes pour former la coquille silicatée s'est porté sur un mélange équimolaire de TMOS et MTMOS dispersé dans du THF, solvant déjà utilisé précédemment (Chapitre I, § 3.3).

3.1. Rôle du solvant

Le taux de dilution (s = [Solvant] / [Si]) dépend à la fois de la concentration molaire en solvant et de celle en alcoxydes de silicium (chapitre I, § 1.2.4). Il est lié à un facteur important à prendre en compte lors de la nébulisation : la viscosité du fluide. Plus la solution est visqueuse plus il sera difficile de l'entrainer par effet Venturi jusqu'à la buse de nébulisation. Le brouillard généré par la buse de nébulisation est composé de gouttelettes de l'ordre de 1 à 2 µm. Ce volume reste inchangé car il est fixé par la buse. Cependant, la quantité de matière finale (après séchage) présente dans chaque gouttelette va proportionnellement diminuer lorsque le taux de dilution augmente. Ainsi, l'augmentation

du taux de dilution devrait entrainer une diminution des diamètres des particules après séchage. Pour vérifier cela, nous avons fait varier le taux de dilution entre 50 et 1000.

Ces premiers tests ont été réalisés avec des solutions dites « blanches », en absence de fluorophore, et composées uniquement d'un mélange équimolaire de TMOS/MTMOS dispersé dans du THF. Les réactions d'hydrolyse et condensation s'effectuent en catalyse acide, pH = 2, avec un taux d'hydrolyse h = 1. Les solutions sont vieillies deux semaines à 65°C puis stockées à température ambiante. Les nébulisations s'effectuent selon les paramètres physiques définis dans le paragraphe précédent : une pression d'azote de 1 bar, une température de four de 150°C, celle du filtre électrostatique à 140°C et le débit d'air à 1,5 L/min. Les particules sont collectées dans le filtre électrostatique puis conservées à l'abri de l'humidité. Chaque échantillon est observé au MEB et les clichés sont analysés afin de déterminer la distribution en taille statistique. La figure 13 compare les différentes distributions en taille obtenues en fonction du taux de dilution.

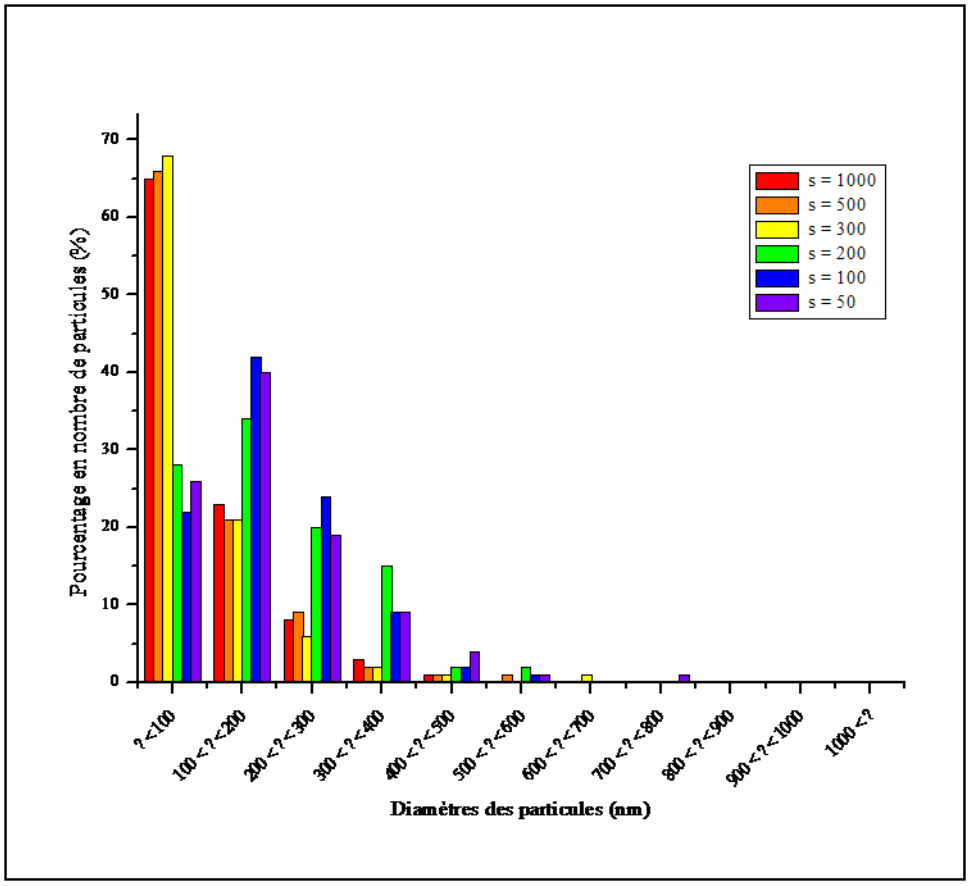


Figure 13 - Impact du taux de dilution sur la distribution en tailles des particules.

Les particules ont, en grande majorité, des diamètres compris entre 0 et 600 nm. Le pourcentage de particules avec des tailles supérieures à 600 nm est inférieur à 2 %. Les gouttelettes formées suite à la nébulisation du sol ont des diamètres de l'ordre de 1 à 2 µm. La contraction lors du séchage, et donc de l'évaporation du solvant, est de l'ordre de 40 % à 90 % permettant l'obtention de particules de diamètre inférieur à 600 nm. Cependant, on ne doit pas oublier le phénomène de coalescence de goutte essentiellement en sortie de buse de nébulisation qui explique la présence de taille de particule au-delà de 300 – 400 nm de diamètre.

La comparaison des distributions de taille de nanoparticules en fonction du taux de solvant, s, fait apparaitre deux domaines :

- $50 < s \leq 200$: aucun impact significatif de l'augmentation du taux de dilution sur les tailles des particules. On observe que près de 25 % de la population des particules ont des diamètres inférieurs à 100 nm.
- $300 \leq s \leq 1000$: apparition d'une scission nette dans l'allure de la distribution en taille. La population de nanoparticules avec un diamètre inférieur à 100 nm est multipliée par 2,5 ce qui représente 65 % des nanoparticules. Lorsque s augmente (s = 500 – 1000) la proportion de particules inférieures à 100 nm reste relativement stable autour de 65 %. Cette stabilité pourrait être expliquée par la coalescence de gouttelettes en sortie de buse.

Ainsi, l'augmentation du taux de solvant impacte les diamètres moyens des particules qui diminuent en faveur des nanoparticules avec des diamètres inférieurs à 100 nm. Pour les applications biologiques visées, il est nécessaire d'obtenir un maximum de particules avec des diamètres inférieurs à 100 nm. Pour cela il faut travailler avec un taux de solvant, s, d'au moins 300.

Un deuxième paramètre entre en compte dans le choix du taux de solvant : la quantité de matière produite. Elle diminue progressivement avec l'augmentation du volume de solvant pour un même volume de solution nébulisée. C'est pour cette raison que s = 1000 a été rapidement écarté car la production en nanoparticules est faible. Enfin, pour ajuster la valeur de s entre s = 300 et s = 500, une nouvelle série de tests a été effectuée en intégrant du CMONS dans la solution à un taux en fluorophore d = 0,1. Pour ces tests, la présence du CMONS va modifier légèrement le séchage du brouillard ce qui nous a permis d'observer la morphologie des particules, figure 14.

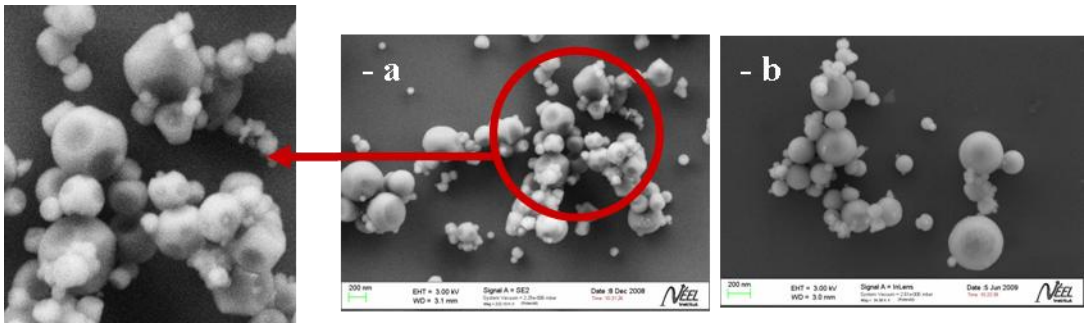


Figure 14 - Clichés MEB de nanoparticules avec du CMONS à d = 0,1 et un taux de solvant variable : (a) s = 300 et (b) s = 500.

Le zoom de la figure 14-a, s = 300, a mis en évidence la présence de nanoparticules avec des surfaces non lisses. Cette non-sphéricité de la surface est due à la collision de particules entre elles lors de leur séjour dans le four ou lors de la collecte dans le filtre électrostatique. Sur la figure 14-b (s = 500), les particules apparaissent avec des surfaces lisses et bien définies, le phénomène de collision entre particules n'est pas ou peu présent. Cette différence semble être directement due au taux de solvant. En effet, l'augmentation du taux de dilution (s) a entrainé une diminution de la quantité de solide résultant dans chaque nanoparticule ce qui peut réduire leurs collisions. Nous avons donc choisi de travailler à un taux de solvant intermédiaire, s = 500, car il combine à la fois une production en grande quantité de poudre nanométrique et une population importante de nanoparticules bien sphériques avec des diamètres inférieurs à 100 nm.

3.2. Nature de la matrice silicatée – Choix des précurseur sol-gel

La nature des alcoxydes de silicium utilisés dans notre processus de synthèse influence les paramètres de confinement des nanocristaux organiques, le type d'interactions colorant-coquille et le caractère hydrophobe - hydrophile de la coquille et donc son aptitude à la dispersion en solution aqueuse. Dans cette partie, nous allons dans un premier temps définir les précurseurs sol-gel utilisés pour la synthèse des nanoparticules, tableau 1, et étudier leur influence sur ces différents paramètres.

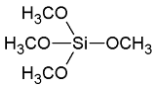
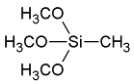
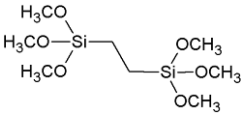
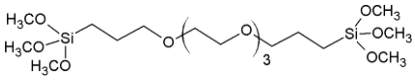
Alcoxyde de silicium	Formule développée	Abréviation	M (g/mol)	Densité (g/cm^3)
Tétraméthoxysilane		TMOS	152,22	1,032
Méthyltriméthoxysilane		MTMOS	136,22	0,959
1,2-bis(triméthoxysilyl)éthane		TMSE	270,10	1 ,060
1,16-bis(triméthoxysilyl)-4,7,10,13-tétraoxahexadécane		BTP	474,69	1,060

Tableau 1 - Les différents alcoxydes de silicium utilisés dans cette étude.

Quatre types de matrices, faisant intervenir des précurseurs en proportion molaires différentes, ont été étudiés afin de déterminer quelle matrice répond le mieux aux critères d'enrobage de la phase cristalline organique et de dispersion des particules en milieux aqueux (annexe I):

- TMOS uniquement
- TMOS / MTMOS, dont on a fait varier les proportions: 0,5 TMOS + 0,5 MTMOS et 0,75 TMOS + 0,25 MTMOS.
- TMOS / TMSE, dont on a fait varier les proportions: 0,5 TMOS + 0,5 TMSE et 2 TMOS + 1 TMSE.
- TMOS / BTP, dont les proportions en alcoxydes sont 8 TMOS + 1 BTP. Trois autres compositions ont été testées : 4 TMOS + 1 BTP, 12 TMOS + 1 BTP et 16 TMOS + 1 BTP (chapitre V, § 2.1.3).

L'alcoxyde se silicium TMOS est à la base des quatre types de matrices car il s'agit d'un précurseur sol-gel très réactif avec ses quatre groupements alcoxydes – OCH_3 (alcoxyde tétrafonctionnel). Il permet, d'autre part, la formation d'un réseau silicaté interconnecté très

hydrophile grâce aux fonctions silanols – SiOH qui se forment lors de l'hydrolyse et dont certaines perdurent en fin de procédé.

Dans un premier temps, des solutions sans fluorophores contenant les différents mélanges d'alcoxydes ont été préparées en utilisant le THF comme solvant avec un taux de dilution s = 500, en catalyse acide et h = 1. Elles sont ensuite vieillies 15 jours à 65°C puis stockées à température ambiante et enfin nébulisées. Les particules obtenues ont été visualisées au MEB afin d'observer leur comportement. La figure 15 montre que la nature des alcoxydes de silicium composant la coquille silicatée n'affecte pratiquement pas la distribution en taille.

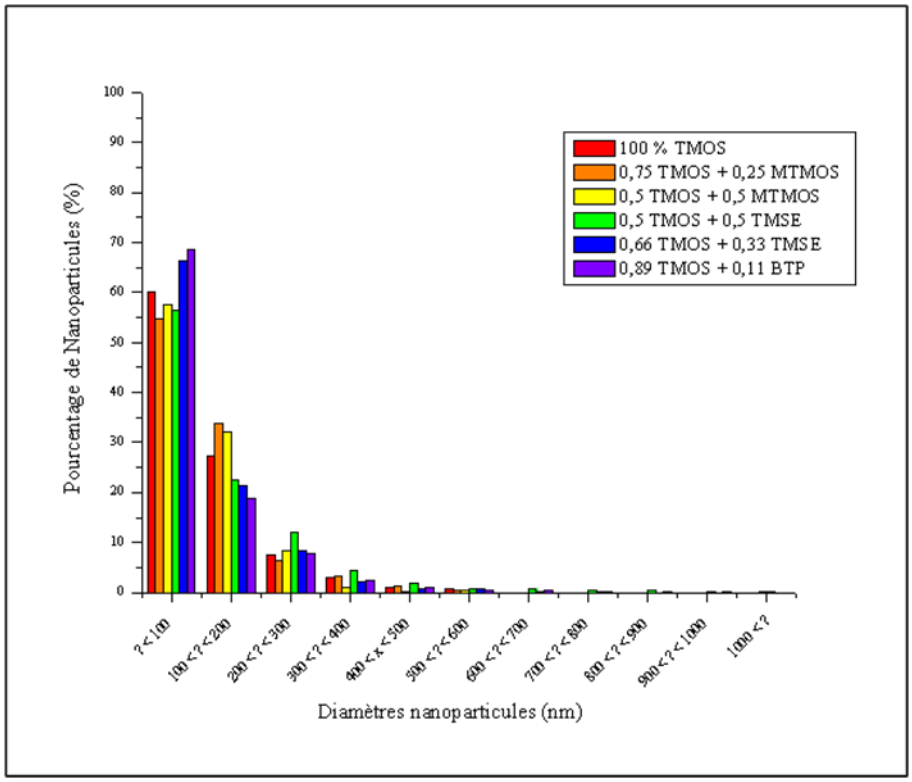


Figure 15 - Impact des différentes compositions de coquille silicatée sur la distribution en taille des particules.

Quels que soient les précurseurs utilisés, la distribution en taille des particules est principalement centrée sur les plus petits diamètres, inférieur à 100 nm. De plus, la visualisation au MEB, nous a permis de vérifier la bonne formation des nanoparticules à la fois sphériques et non-agglomérées. Nous avons ensuite observé si l'ajout de la phase organique modifiait le comportement des précurseurs et la formation de la coquille silicatée.

3.3. Fluorophore de référence

On appelle **taux de fluorophore** le rapport d = [orga]/[Si] où [orga] est la concentration molaire de fluorophore organique et [Si] la concentration molaire en alcoxyde de silicium.

L'un des objectifs de ce sujet est de synthétiser des particules à fortes concentrations en fluorophore afin d'obtenir des sections efficaces d'absorption et d'émission de fluorescence élevées. Cependant, le taux de fluorophore doit être correctement défini afin de ne pas s'éloigner de deux points clés : élaborer des particules de tailles comprises entre 20 et 100 nm pour l'imagerie de la microvascularisation *in-vivo*, et faire en sorte qu'elles contiennent un maximum de fluorophore bien encapsulé par la coquille silicatée.

3.3.1. Choix du fluorophore

La plupart des composés fluorescents contiennent un ou plusieurs cycles aromatiques. Ces systèmes sont dits conjugués car le recouvrement des orbitales π permet la délocalisation des électrons sur une part importante de la molécule. D'une façon générale, une extension du système d'électrons π, c'est-à-dire du degré de conjugaison, s'accompagne d'un déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde. En effet, l'énergie de la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est d'autant plus faible que le nuage électronique π est étendu (très forte délocalisation du système conjugué). De plus, une extension du système d'électrons π se traduit par une augmentation des coefficients d'absorption molaire et des rendements quantiques de fluorescence excitée à un photon [27].

Pour choisir les molécules organiques fluorescentes, nous avons pris en compte plusieurs critères :

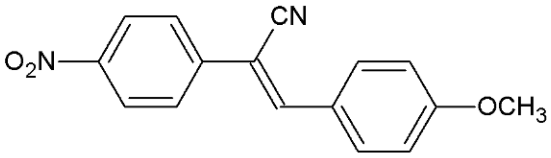
- être fluorescent dans l'état cristallin, en effet des molécules peuvent être fluorescentes en solution mais pas dans le cristal,
- bonne stabilité chimique et thermique avec des températures de fusion supérieures à 150°C, afin d'appliquer une température dans le four de 150°C ce qui permet, compte-tenu de la géométrie du réacteur, de sécher totalement les gouttelettes de l'aérosol,
- être exempte de toutes impuretés qui pourraient affecter la fluorescence,

- photostablilité élevée pour disposer de propriété de fluorescence stable pour l'imagerie,
- forte intensité de fluorescence sous excitation laser à deux-photons, **mais nous ne disposons pas de critères prédictifs bien précis pour cette propriété**,
- être fluorescent dans le visible et le proche infrarouge ($\lambda_{émission}$ = 600 – 1000 nm) correspondant à la fenêtre biologique (Introduction générale),
- être non soluble dans les milieux aqueux (tampons biologiques, milieux de cultures, etc.) pour la réalisation de traceurs pour l'imagerie biomédicale.

Afin de déterminer au mieux les conditions expérimentales et les paramètres de synthèse de ces nanoparticules hybrides cœur/coquille, nous avons tout d'abord utilisé comme molécule de référence le CMONS bien connu de l'équipe [22, 24, 26, 28-33]. Il a été largement utilisé dans l'élaboration de nanocristaux en couches minces et rempli d'emblée plusieurs critères énoncés juste au-dessus : T_{fusion} = 165°C, molécule stable chimiquement et photochimiquement, un polymorphe qui fluoresce très fortement dans l'état cristallin tandis que les molécules dispersées en solution ne fluorescent pas. Ce dernier point est un avantage important pour détecter la cristallisation de ce fluorophore dans les sphères silicatées. Cependant, le CMONS présente un polymorphisme qu'il faut maîtriser, tableau 2. Le CMONS est de plus insoluble dans l'eau mais très soluble dans le THF. Nous allons donc utiliser ce solvant pour préparer les solutions sol-gel. Toutes ces conditions réunies font du CMONS une molécule intéressante pour développer et optimiser notre procédé d'élaboration de nanoparticules hybrides.

Le CMONS

Le « Cyano-Methoxy-Nitro-Stilbène » ou CMONS (α-[(4'-méthoxyphényl)méthylène]-4-nitro-benzèneacétonitrile), représenté sur la figure 16, est une molécule aromatique appartenant à la famille des stilbènes.



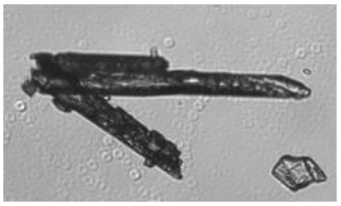


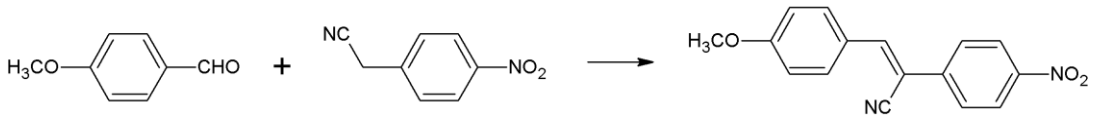
Figure 16 - Molécule de CMONS (à gauche), cliché pris au microscope optique en transmission d'aiguilles cristallines de CMONS (à droite).

Le CMONS est une molécule organique π-conjuguée à transfert de charge contenant des groupements accepteurs et un groupement donneur. Cette molécule a été initialement synthétisée pour des propriétés en optique non-linéaire du second ordre. L'inefficacité de fluorescence des molécules de CMONS en solution n'est pas liée à un problème de dimérisation car même pour des solutions très diluées aucune fluorescence n'a été détectée. Ceci est probablement dû à la rapidité du processus de photoisomérisation des molécules dispersées dans un solvant. Par contre, le CMONS présente une forte efficacité de fluorescence à un photon dans l'état cristallin avec un maximum d'absorption à $\lambda_{absorption\ max.}$= 392 nm et une émission de fluorescence entre 500 et 650 nm avec un maximum d'émission à $\lambda_{émission}$ = 596 nm [22-23, 25, 28-29, 31-32]. Des études ont montré que le CMONS possède trois polymorphes cristallins qui sont tous fluorescents à un photon et dont deux ont des structures non-centrosymétrique, ce qui leurs confèrent des propriétés de génération de seconde harmonique (GSH), Tableau 2.

Nom	**Solvant de cristallisation**	**Symétrie**	**Groupe d'espace**	**couleur**	**fluorescence**	**Génération de Seconde Harmonique (GSH)**
CMONS – a	Toluène	Monoclinique Non-centrosymétrique	Cc	Jaune	Vert $\lambda_{émi}$ = 539 nm	Oui [22]
CMONS – b	*	Monoclinique Non-centrosymétrique	Cc	Orange	Orange $\lambda_{émi}$ = 596 nm	Oui – faible [22]
CMONS – c	Toluène DMF	Monoclinique centrosymétrique	$P2_1/n$	Jaune	Jaune $\lambda_{émi}$ = 557 nm	Non [22]

Tableau 2 - Polymorphes cristallin du CMONS [22, 32], (*) CMONS-b obtenu uniquement par fusion [22].

Nous avons synthétisé et purifié le CMONS au laboratoire. Il est issu de la condensation de Knoevenagel entre deux produits commerciaux : le méthoxybenzaldéhyde (SIGMA) et le nitrobenzylcyanide (SIGMA) :



Réaction 1 - Synthèse du CMONS par réaction dite de Knoevenagel.

La réaction s'effectue sous agitation dans la pyridine en présence de pipéridine à chaud (110°C) durant une nuit. Elle est ensuite stoppée par un ajout d'eau et la phase aqueuse est extraite deux fois avec du dichlorométhane. Le produit résultant de l'extraction est séché avec du Na_2SO_4 puis le solvant est évaporé. Pour éliminer toutes traces d'impuretés, le CMONS est recristallisé dans le toluène avec un rendement final de 85%. La pureté du CMONS est vérifiée par chromatographie sur couche mince et par RMN liquide du proton (cf annexe II).

3.3.2. Optimisation du taux de fluorophore

Pour définir le taux de fluorophore maximal (où les petits diamètres des particules sont préservés et la coquille silicatée enrobe toute la phase organique), des solutions ont été préparées avec des concentrations en CMONS différentes : $0 < d < 0,25$. Le CMONS est dissous dans du THF (s = 500) et un mélange équimolaire TMOS/MTMOS est ensuite ajouté à cette solution. La catalyse s'effectue en milieu acide (HCl 1M) et l'hydrolyse/condensation est amorcée par un ajout d'eau (h = 1). Les solutions sont vieillies durant 2 semaines à 65°C puis stockées à température ambiante avant d'être nébulisées selon les paramètres physiques définis précédemment. Les particules sont collectées grâce au filtre électrostatique. Elles sont ensuite récupérées sous aspiration à l'aide d'un pinceau et stockées dans des boîtes hermétiques et à l'abri de la lumière. Une petite quantité de produit déposée sur des substrats de silicium est observée au MEB afin de mesurer l'impact du taux de fluorophore sur les nanoparticules obtenues. Deux paramètres ont été particulièrement étudiés afin de définir quel est le taux de dopage optimal: la distribution moyenne en taille des diamètres et la qualité de la coquille sol-gel silicatée.

- <u>Impact du taux de dopage sur le confinement de la nucléation et de la croissance du fluorophore par la coquille silicatée</u>

Si la nucléation et la croissance du fluorophore sont bien confinées au cœur des particules silicatées en cours de séchage, on doit obtenir des particules sphériques, lisses en surface sans aucune trace de produit organique observable en dehors des particules. Comme nous

pouvons le voir sur la figure 17-a, lorsque le taux en fluorophore est élevé et atteint d = 0,25 il apparait un grand nombre d'aiguilles de CMONS en surfaces de particules. Le taux en fluorophore est donc trop élevé pour que toute la phase organique puisse être confinée dans la coquille silicatée. Nous avons ensuite diminué d (d = 0,15, Figure 17-b). Dans ce cas, la proportion de cristaux de CMONS en surface a nettement diminué. Enfin, pour des concentrations autour de d = 0,1, Figure 17-c, nous avons obtenu un confinement total du CMONS dans les particules sphériques silicatées.

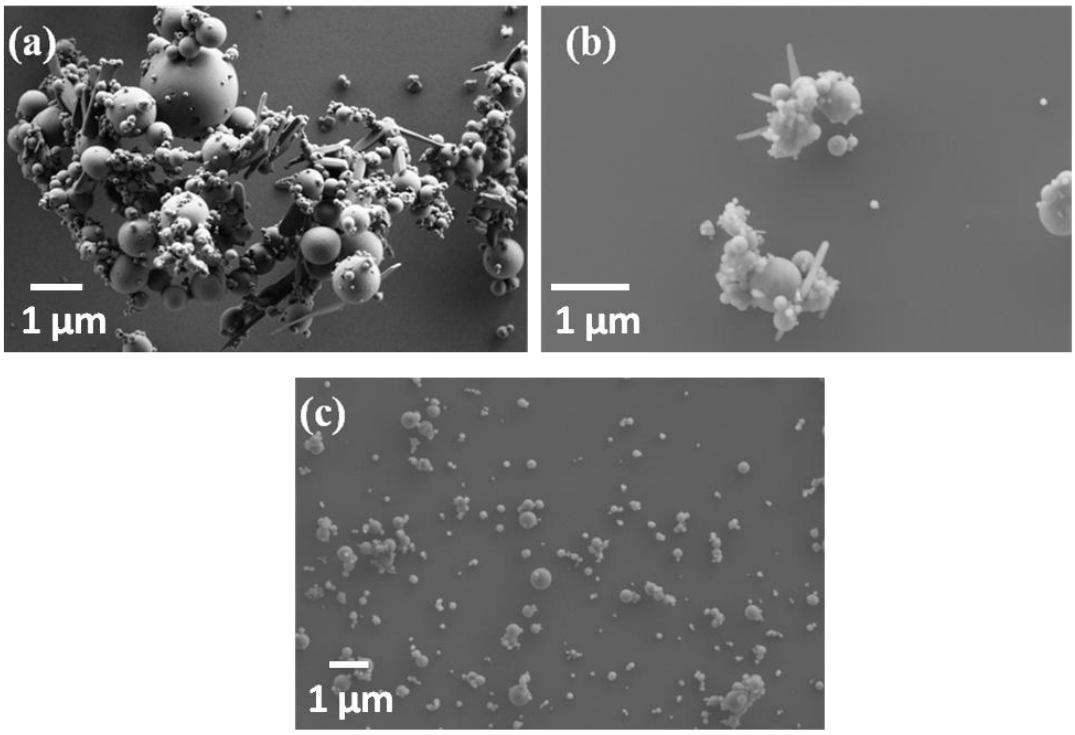


Figure 17 - Clichés MEB de nanoparticules silicatées encapsulant du CMONS à différents taux de fluorophore : (a) d = 0,25, (b) d = 0,15 et (c) d = 0,1.

Pour obtenir des nanoparticules contenant un maximum de fluorophore tout en préservant un confinement optimal du CMONS et des petits diamètres (inférieur à 100 nm), le taux de chargement en CMONS ne doit donc pas excéder d = 0,1 ce qui équivaut à un pourcentage massique de 14%. De plus, pour éviter toute dégradation de la phase organique au cours de l'étape de vieillissement du sol, le fluorophore est dissous dans la solution juste avant la nébulisation. Ceci permet d'avoir une technique totalement reproductible quelle que soit la

nature du fluorophore en évitant toute modification des conditions d'hydrolyse et de condensation des alcoxydes de silicium. En effet, il a été observé lors de travaux antérieurs que, par exemple, des fluorophores de type rhodamine présentant une fonction –COOH pouvaient modifier le pH du milieu (effet acido/basique dans le sens de Bronsted) et ainsi influencer le processus d'hydrolyse/condensation des alcoxydes [34].

- Impact de la concentration en fluorophore sur la distribution en taille des particules

La figure 18 met en évidence l'influence du taux de chargement sur la taille des particules. Nous avons pu observer qu'il y avait très peu d'effets pour des taux en fluorophore entre d = 0 et d = 0,1. Les distributions en taille sont similaires car nous sommes dans de bonnes conditions de confinement de la phase organique, CMONS. En revanche pour des taux en fluorophore supérieur, d = 0,15 et d = 0,25, le mauvais confinement du CMONS perturbe fortement la distribution de taille des particules avec l'apparition d'aiguilles de CMONS.

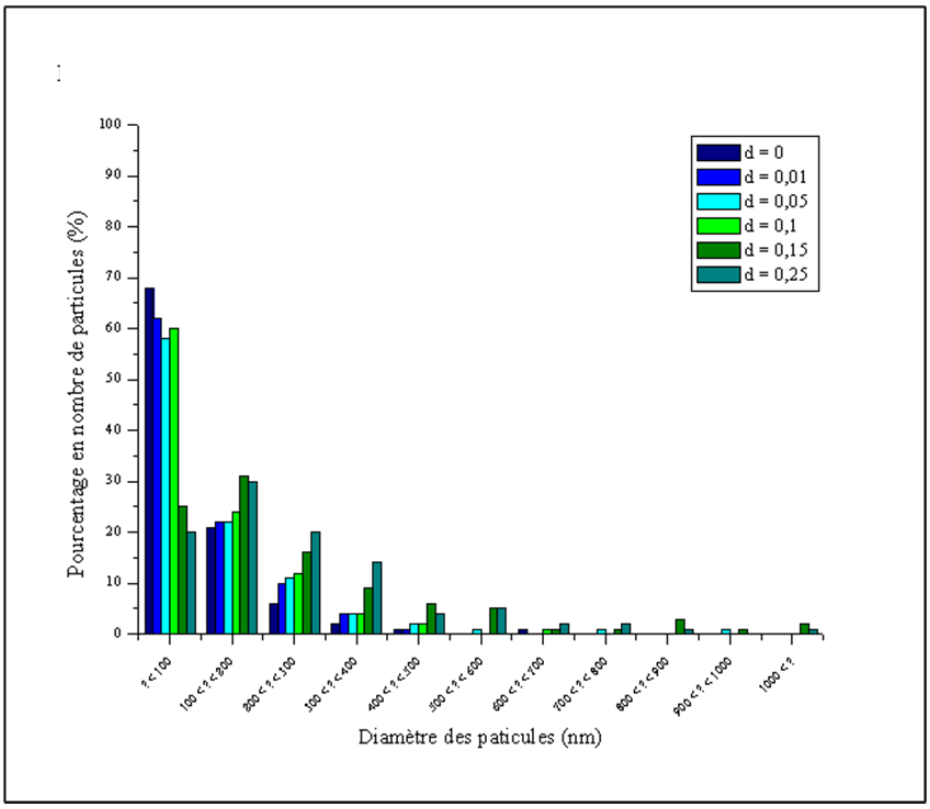


Figure 18 - Impact du taux de chargement sur la distribution moyenne en taille des particules.

3.3.3. Affinité fluorophore / matrice

Les solutions sont préparées à l'identique avec en plus l'ajout de CMONS à un taux de fluorophore élevé de d = 0,1 correspondant à celui que nous avons optimisé avec une matrice sol-gel contenant un mélange équimolaire de TMOS – MTMOS (§ 3.3.2.).

3.3.3.1. Matrice TMOS

Les matrices sol-gel résultantes de l'hydrolyse/condensation du TMOS présentent un caractère hydrophile marqué de par les groupements silanols – SiOH qui n'ont pas réagi durant la polycondensation de la matrice. Cependant, il a été montré que les groupements Si-OH pendants n'ayant pas participé à la formation du réseau silicaté peuvent interagir fortement par des liaisons hydrogène avec les molécules de fluorophores organiques dissoutes dans les solutions initiales [28]. Ceci inhibera, ou tout au moins perturbera, la nanocristallisation des molécules organiques lors de l'évaporation du solvant. La figure 19 illustre bien ce problème d'interaction entre la matrice et le fluorophore par le biais d'une liaison hydrogène entre les fonctions -SiOH du TMOS et $-NO_2$ du CMONS par exemple.

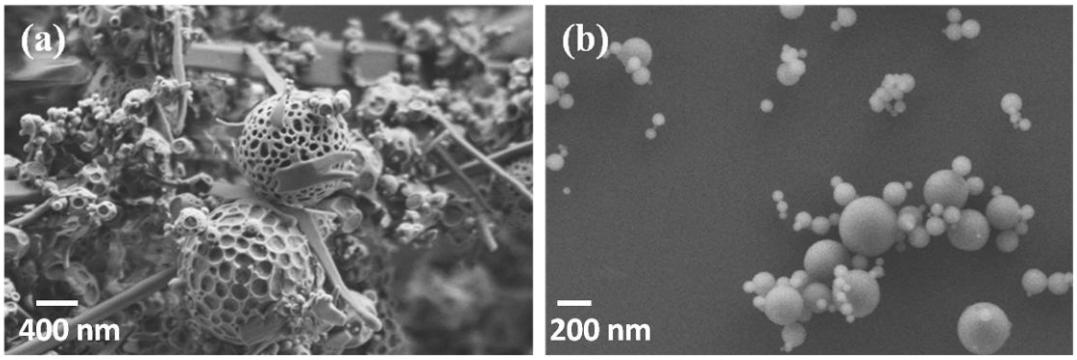


Figure 19 - Cliché MEB de nanoparticules obtenues avec une matrice sol-gel TMOS : (a) avec un taux de chargement en CMONS d = 0,1 et (b) sans fluorophore.

L'insertion du CMONS dans un sol contenant uniquement du TMOS perturbe fortement la nucléation et la croissance confinée du fluorophore au cœur des sphères silicatées, figure 19-a. Les particules ne présentent pas une surface lisse contrairement aux particules sans CMONS, figure 19-b, la nucléation et la croissance du CMONS a eu également lieu à l'extérieur de la matrice sol-gel. La surface des particules chargées en fluorophore est discontinue et ceci a pour première conséquence une mauvaise encapsulation du CMONS. Des aiguilles de CMONS sont nettement visibles à la surface des particules. Il est donc

nécessaire d'associer un second précurseur au TMOS afin de réduire les interactions fluorophore-matrice.

3.3.3.2. Matrice TMOS – MTMOS

Pour diminuer les interactions, nous ajoutons au TMOS le précurseur trifonctionnel MTMOS qui possède un groupement méthyl ($-CH_3$) non hydrolysable. Après hydrolyse et polycondensation, ces groupements méthyles non pontants vont pointer, entre autre, à l'intérieur des pores et écranter les fonctions silanols, favorisant ainsi la nanocristallisation (figure 20) [23]. D'autre part, l'ajout d'un alcoxyde possédant un groupement méthyl non pontant dans les procédés sol-gel, permet d'obtenir des matrices silicatées hybrides moins rigides ayant certainement un pouvoir d'enrobage plus important [35]. Ceci sera particulièrement favorable dans le cas de cette étude où la matrice sol-gel joue le rôle de coquille silicatée.

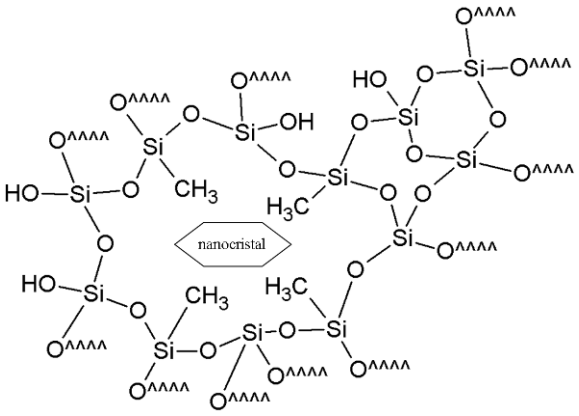


Figure 20 - Schématisation de l'écrantage des liaisons pendantes -Si–OH par des groupes $-CH_3$ non pontants dans une matrice TMOS + MTMOS.

Nous avons fait varier les proportions de TMOS et MTMOS dans le sol afin de déterminer quelle est la matrice la plus favorable au bon confinement de la nucléation et croissance du cœur cristallin.

- <u>0,75 TMOS + 0,25 MTMOS</u>

Pour ne pas perdre le caractère hydrophile de la matrice uniquement constituée par du TMOS, seulement 25 % de MTMOS a tout d'abord été mis en jeu comme précurseur. Les particules sol-gel sans fluorophore sont sphériques et non agrégées. Leur distribution en taille est similaire à celle obtenue pour les particules composées seulement de TMOS (voir figure 19). Cependant, dès lors que le CMONS est inséré au taux précédemment établi pour

le cas de la synthèse avec uniquement du TMOS : d = 0,1, le comportement de la coquille silicatée est fortement modifié. La figure 21 montre que le CMONS est très mal confiné dans les coquilles silicatées.

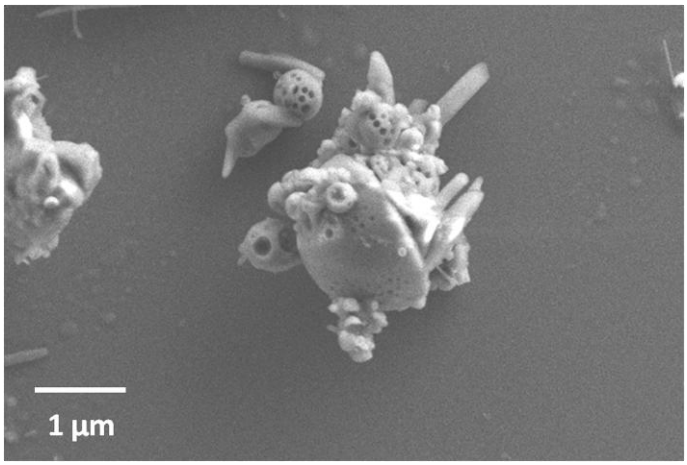


Figure 21 - Cliché MEB de nanoparticules composées d'une coquille silicatée 0,75 TMOS – 0,25 MTMOS et avec un taux de chargement de CMONS d = 0,1.

La proportion de MTMOS, donc de groupement non pontant $–CH_3$ n'est certainement pas suffisante pour écranter totalement les interactions de type liaisons hydrogène existant entre la fonction $–NO_2$ du CMONS et la fonction –SiOH des alcoxydes de silicium hydrolysés, ce qui perturbe fortement le confinement de la nanocristallisation du CMONS.

- <u>0,5 TMOS + 0,5 MTMOS</u>

Dans un deuxième temps, le taux de MTMOS a été augmenté. Les nanoparticules obtenues présentaient des coquilles lisses. Pour un taux en fluorophore d = 0,1, il n'y a aucune démixtion entre la phase organique et la phase silicatée. Cette matrice confine correctement la nucléation et la croissance du CMONS comme dans le cas de la figure 17-c.

Cependant, cette matrice semble être peu hydrophile à cause des nombreux groupements $–CH_3$ non pontants en surface des nanoparticules. Ceci rendra ensuite difficile la dispersion des nanoparticules dans l'eau. Pour vérifier ce paramètre, des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur des couches minces réalisées par spin-coating d'un sol ayant la même composition en alcoxyde de silicium : 0,5 TMOS + 0,5 MTMOS. Pour cela nous avons émis l'hypothèse que la coquille silicatée des nanoparticules et la surface des couches minces se comportaient de manière identique. Pour cette mesure, une goutte d'eau est déposée sur la surface et son comportement est observé au microscope. En fonction de

l'hydrophilicité de la surface sol-gel, la goutte d'eau va plus ou moins s'étaler. Si la surface est très hydrophile, l'eau va s'étaler et l'angle de contact sera quasiment nul alors que dans le cas d'une surface très hydrophobe, la goutte tendra vers une forme sphérique, avec un angle de contact élevé tendant vers 180°. La figure 22 montre que la goutte d'eau déposée forme un angle de 60° avec la couche mince montrant le caractère hydrophobe élevé de la surface silicatée.

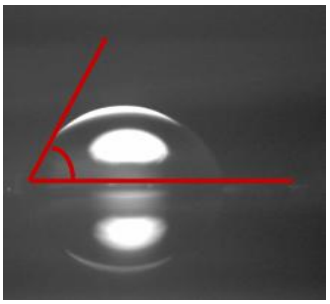


Figure 22 - Test de mouillabilité sur une couche mince 0,5 TMOS + 0,5 MTMOS, l'angle de contact = 60°.

Ce caractère hydrophobe marqué provient des groupements non pontants $–CH_3$ se trouvant en surface. Ces groupements méthyles réduisent l'affinité de la matrice avec l'eau ce qui diminue fortement le caractère hydrophile souhaité pour les nanoparticules en vu de leurs applications biologiques. Nous avons donc remplacé le MTMOS par un nouvel alcoxyde de silicium qui permet à la fois un bon confinement de la phase organique et l'obtention d'une coquille silicatée plus hydrophile : le TMSE qui a déjà été utilisé dans l'équipe pour le développement de biopuces basées sur l'élaboration de couches minces nanocomposites [36, 37].

3.3.3.3. Matrice TMOS + TMSE

Le TMSE a été synthétisé par B. Boury du laboratoire de Chimie et Organisation de Solide de Montpellier. C'est un précurseur de type organo-polysilsesquioxane, $R(Si(OCH_3)_3)_n$ où R est un groupement organique et $n \geq 2$, dans le cas du TMSE n = 2 et $R=CH_2–CH_2$. De nombreux organo-polysilsesquioxane peuvent être utilisés, ils permettent d'obtenir des matériaux hybrides avec une nanostructure relativement « lamellaire » [36, 38-40]. De plus, la nature du groupement espaceur $CH_2–CH_2$ rigide pontant entre deux Si porteurs de trois fonctions alcoxydes conduit à des xérogels où le groupement éthyl sera pontant ce qui réduira le caractère hydrophobe des particules tout en préservant le

confinement et l'écrantage des interactions de types liaison hydrogène entre la phase organique et la matrice silicatée.

Il a été démontré que l'utilisation de TMSE seul comme précurseur d'une solution sol-gel conduisait à des gélifications très rapides. En effet, l'hydrolyse-condensation de ce précurseur est d'autant plus rapide qu'il possède 6 fonctions alcoxydes $–OCH_3$ hydrolysables au lieu de 4 dans le cas du TMOS. L'hydrolyse de TMSE est, de plus, favorisée par l'effet inductif donneur provenant du groupement éthyl espaceur. Afin de mieux contrôler les vitesses d'hydrolyse et de condensation, on associe au TMSE le TMOS comme agent réticulant. Le TMOS va permettre de limiter l'auto-polycondensation du TMSE et créer des interconnexions entre les chaînes polymères issues du TMSE. La viscosité du sol et sa vitesse de polymérisation sont ainsi diminuées. D'autre part, lorsque la proportion relative de TMOS par rapport à TMSE augmente, il a été démontré que la porosité du matériau est plus ouverte [41] et que la nanocristalisation est favorisée grâce à un confinement spatial moins poussé : la taille des pores des gels humides dans lesquels se produit la nucléation est plus élevée, ainsi la probabilité de nucléation augmente lorsque le volume libre de solution augmente. Nous avons donc testé deux compositions de ces mélanges d'alcoxydes de silicium afin de déterminer la meilleure composition permettant la synthèse de nanoparticules.

- <u>0,5 TMOS + 0,5 TMSE</u>

Dans un premier temps, nous avons utilisé un mélange équimolaire de TMSE - TMOS. Sur la figure 23, nous observons que les particules sont bien individualisées mais certaines sont déformées (agrandissement figure 23) suite à l'agglomération de plusieurs particules partiellement séchées dans le filtre électrostatique. De plus, nous observons qu'une aiguille de CMONS émerge d'une sphère silicatée. Le réseau silicaté n'est certainement pas assez interconnecté pour apporter suffisamment de rigidité à la coquille sol-gel et assurer un bon confinement de la phase organique. Ceci est dû soit à une polycondensation insuffisante, soit à un manque d'interconnections des chaines silicatées du réseau sol-gel. Il a été vu dans le paragraphe précédent que pour favoriser la nanocristallisation il faut que le TMOS soit majoritaire vis-à-vis du TMSE. La proportion en précurseur TMOS a donc été augmentée par rapport au TMSE afin d'accroître la connectivité du réseau.

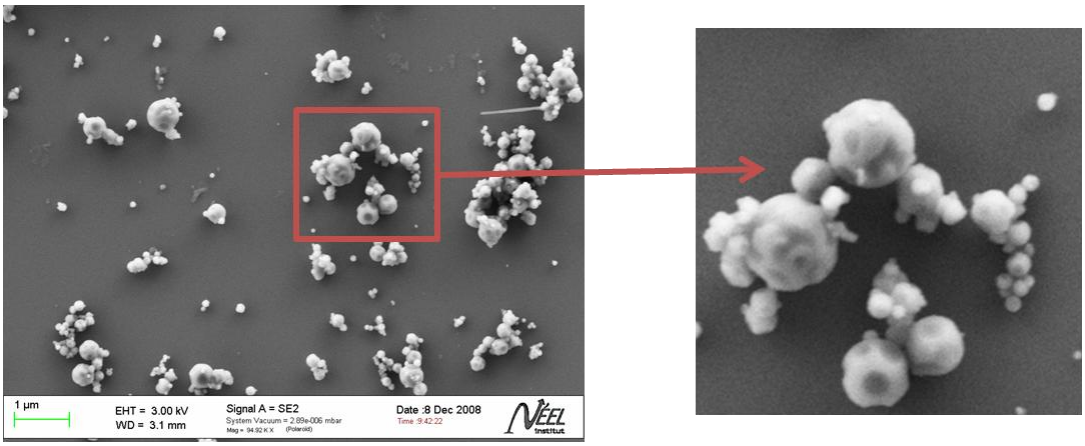


Figure 23 - Cliché MEB de nanoparticules silicatées 0,5 TMOS + 0,5 TMSE avec un taux d'insertion de CMONS d = 0,1.

- <u>2 TMOS + 1 TMSE</u>

En nous appuyant sur les travaux précédents réalisés sur les couches minces [41], nous avons choisi de travailler avec des proportions molaires d'alcoxydes suivantes : 2 TMOS + 1 TMSE. Les particules obtenues sont à la fois bien individualisées et sphériques, sans qu'il y ait une démixtion de phase entre le CMONS et la matrice silicatée, figure 24 (annexe I).

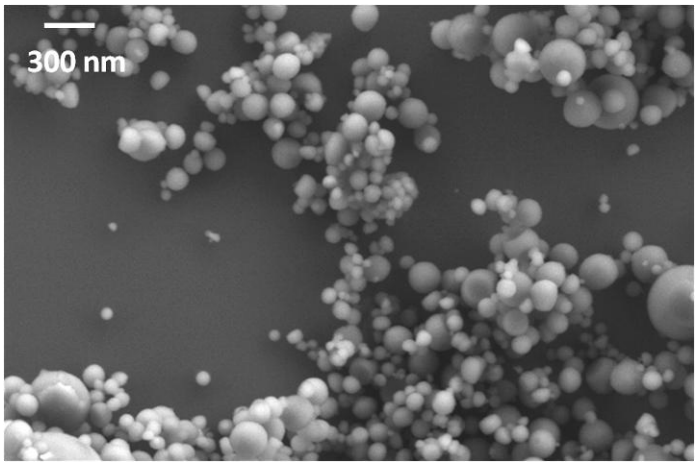


Figure 24 - Cliché MEB de nanoparticules 2 TMOS + 1 TMSE avec du CMONS à d = 0,1.

Un taux de fluorophore supérieur, d = 0,15, a été testé afin de voir si cette matrice permettait d'insérer plus de CMONS. L'observation MEB de ces nanoparticules a mis en évidence la présence d'aiguilles de CMONS à l'extérieur des particules. Le taux de fluorophore pouvant être inséré dans la matrice 2 TMOS + TMSE est donc identique à celui pour la matrice TMOS + MTMOS : d = 0,1. Un test de mouillabilité est venu conforter

l'utilisation de cette matrice, figure 25. Le caractère hydrophile y est nettement plus marqué pour la matrice 2 TMOS + 1 TMSE ce qui va permettre ensuite de mieux disperser les nanoparticules correspondantes en solution aqueuse comme nous le verrons par la suite (chapitre III, § 1).

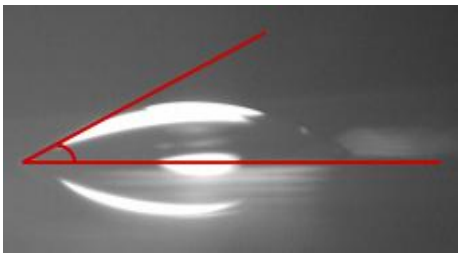


Figure 25 - Test de mouillabilité sur couche mince 2 TMOS + 1 TMSE; avec un angle de contact de 30°.

L'impact bénéfique du TMSE sur le caractère hydrophile des couches minces résultant de l'hydrolyse / polycondensation d'un mélange 2 TMOS + 1 TMSE est montré par la valeur de l'angle de contact obtenue sur couche mince. L'angle de contact passe de 60° pour la matrice TMOS + MTMOS à 30° pour celle obtenue avec 2 TMOS + TMSE. Cette différence d'hydrophilicité est due comme prévu à la position pontante du groupement éthyl dans le TMSE.

3.3.3.4. Matrice TMOS + BTP

Nous avons ensuite utilisé un autre type de précurseur appartenant à la même famille d'organo-polysilsesquioxane que le TMSE : le 1,16-bis(triméthoxysilyl)-4,7,10,13-tétraoxahexadécane ou BTP, tableau 1 [38, 39]. Il présente contrairement au TMSE une longue chaîne souple de Poly Ethylène Glycol (PEG) comme groupement espaceur. Ainsi, nous espérons augmenter le caractère hydrophile des nanoparticules et améliorer leur dispersion en solution aqueuse. Nous avons testé différentes matrices en faisant varier les proportions molaires en alcoxydes de silicium : 4 TMOS + 1 BTP, 8 TMOS + 1 BTP, 12 TMOS + 1 BTP et 16 TMOS + 1 BTP. Nous avons pu voir que la composition la plus prometteuse était celle composée à 8 TMOS + 1 BTP, le détail de cette étude sera développé ultérieurement dans le chapitre V. La figure 26 a montré que la nucléation et croissance du CMONS n'était pas perturbées. La phase organique semble parfaitement encapsulée au sein des nanoparticules.

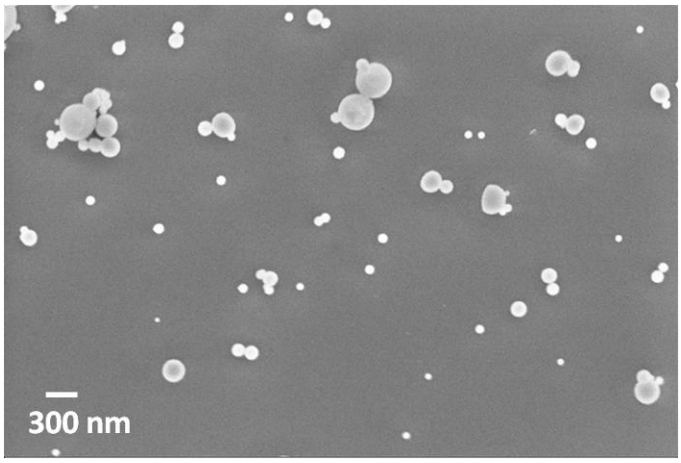


Figure 26 - Cliché MEB de nanoparticules 8 TMOS + 1 BTP contenant du CMONS à d = 0,1.

3.3.4. Première mise en évidence d'un cœur cristallin CMONS dans les particules

Le CMONS est une molécule qui ne fluorescence qu'à l'état cristallin. C'est l'une des raisons pour laquelle nous l'avons choisie comme molécule de référence dans cette étude. Les poudres obtenues avec un taux en CMONS de d = 0,1 présentent une forte fluorescence jaune sous UV (365 nm, Figure 27). Cette fluorescence semble confirmer la présence de CMONS cristallisé au sein des nanoparticules silicatées. De plus, cette fluorescence jaune semble correspondre à la forme cristalline CMONS – c (groupe d'espace $P2_1/n$, voir tableau 2 [22]).

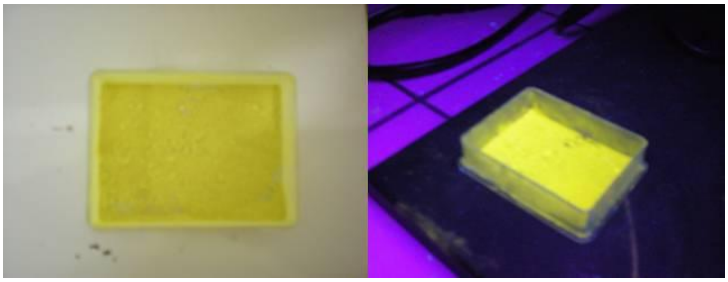


Figure 27 - Photos d'une poudre de nanoparticules dopées en CMONS sous lumière blanche (gauche) et sous UV à 365 nm (droite).

3.3.4.1. Observation du cœur organique de CMONS au MEB

L'équipe MatONLP a mis au point une méthode de dissolution contrôlée de couches minces. Il s'agit de dissoudre la matrice sol-gel couche moléculaire silicatée par couche moléculaire jusqu'à la profondeur souhaitée. Le décapage avec une solution de

soude a été préféré à celui plus traditionnel d'attaque chimique à l'acide fluorhydrique très inhomogène. Dans le cas de la dissolution avec la soude à 10^{-2} M, il a été observé un décapage homogène de la couche silicatée avec une vitesse de dissolution de l'ordre de 7 nm/h sans aucune altération de la rugosité de couches partiellement dissoutes. De plus, lors du traitement à la soude des couche minces hybrides, seulement la couche silicatée est attaquée, les nanocristaux organiques ne sont pas altérés et émergent progressivement [38, 40, 42, 43] au dessus des couches nanocomposites.

Nous avons appliqué ce procédé pour dissoudre entièrement la coquille silicatée des nanoparticules et mettre ainsi en évidence les cristaux de CMONS constituant le cœur de celles-ci. Pour cela, des nanoparticules sont mises en suspension dans de la soude à 10^{-2} M durant un mois afin de dissoudre totalement les coquilles silicatées. La solution étant toujours fluorescente, nous avons déposé une goutte de cette solution sur un substrat de silicium pour visualiser au MEB après séchage la présence de cristaux de CMONS.

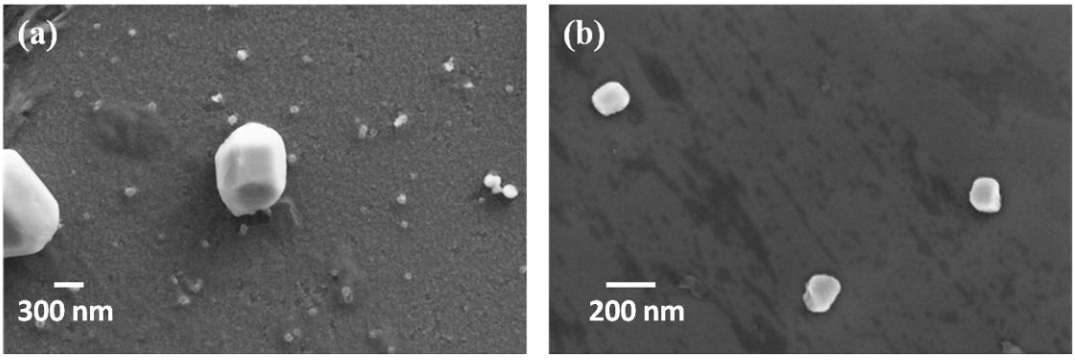


Figure 28 – Clichés MEB de cristaux de CMONS obtenus suite à la dissolution totale de la coquille silicatée par attaque à la soude durant quatre semaines : (a) cristal de 600 nm issu du décapage d'une particule avec un diamètre initial de 700 – 800 nm et (b) trois cristaux de 150 nm issus de la dissolution totale de la coquille silicatée de particules avec des diamètres initiaux compris entre 200 et 300 nm.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 28-a, le cœur de CMONS est bien cristallin. En effet, pour de grosses particules, initialement de l'ordre de 700 – 800 nm, nous pouvons visualiser après dissolution de la coquille silicatée des cristaux facettés dont l'aspect semble bien indiquer la présence d'un seul cristal de très bonne qualité cristalline. Pour des particules de plus petites tailles, les cœurs organiques tendent vers des formes sphériques, figure 28-b, comme observé lors des études antérieures réalisées sur des couches minces

[25, 26, 36]. Ces observations nous ont ainsi permis d'effectuer une première estimation de la valeur du rapport entre le diamètre des nanocristaux et celui des nanoparticules $\frac{\phi_{nanocristaux}}{\phi_{total}}$. Il semble qu'il soit compris entre 0,5 et 0,75 qui est à priori très satisfaisant et permet d'atteindre des concentrations en fluorophore élevées.

Cependant, ces nanocristaux sont très sensibles au bombardement du faisceau électronique ce qui rend difficile leur visualisation pour des tailles inférieures à 80 nm. Dans ce cas, il faut donc utiliser une autre technique d'analyse pour visualiser la cristallisation des cristaux encapsulés dans les particules de diamètre inférieur à 100 nm : la microscopie électronique à transmission (MET) en mode diffraction électronique. De plus, cette technique permet de caractériser la structure des nanocristaux et le type de polymorphe du CMONS présent au sein des particules.

3.3.4.2. MET en mode diffraction électronique

Les cristaux organiques s'amorphisent très vite sous le faisceau d'électrons focalisé. En mode imagerie, ce n'est pas très gênant car dans ce cas on s'intéresse à la taille et à l'aspect global des nanoparticules. Mais pour la diffraction électronique, si les nanocristaux sont amorphisés, ils ne diffracteront plus, et nous perdrons toute information cristallographique. Pour remédier à ce problème, nous avons utilisé un porte-objet que l'on peut refroidir à -173°C avec de l'azote liquide. Les nanocristaux organiques sont ainsi stabilisés sous le faisceau d'électrons, et s'amorphisent nettement moins vite. Le temps d'acquisition des diffractogrammes, relativement courts (une fraction de secondes), permet d'éviter toute détérioration de l'échantillon (annexe III). De plus, pour enregistrer les diffractogrammes, nous pouvons procéder de deux manières :

- La première consiste à observer l'échantillon dans le plan image afin de sélectionner la zone qui nous intéresse et d'enregistrer ensuite le diagramme de diffraction. L'inconvénient est que l'on reste trop de temps (plusieurs secondes) sur la même zone : tout d'abord pour imager (mise au point, enregistrement), puis ensuite pour mesurer la diffraction. Pour des échantillons organiques très fragiles, comme le CMONS qui s'amorphisent très rapidement même à basse température, de l'ordre de quelques secondes, il faut que le temps d'irradiation des nanocristaux soit minimal.

- L'autre voie consiste à balayer l'échantillon en mode diffraction, dès que des taches de diffraction sont observées, le diffractogramme correspondant est enregistré et ensuite la zone qui a diffracté est imagée. L'échantillon n'a ainsi pas été exposé aux électrons avant l'enregistrement du cliché de diffraction. Cette méthode a été privilégiée car elle permet d'enregistrer les données de diffraction avec un temps d'irradiation de l'échantillon minimal, de l'ordre de 0,25 s.

- Diffraction électronique des nanoparticules

Le CMONS possède trois polymorphes avec leur propre structure cristalline [29, 22, 23, 32], tableau 3. Les diffractogrammes des nanocristaux de CMONS encapsulés dans différentes matrices sol-gel ont été enregistrés. Leur analyse devrait permettre de déterminer l'influence de la coquille sur le polymorphe obtenu lors de la cristallisation du CMONS au cœur des particules.

	Forme a	Forme b	Forme c
Structure	monoclinique	monoclinique	monoclinique
Groupe d'espace	CC	CC	$P2_1/n$
a (Å)	3,859(1)	4,6002(7)	3,814(1)
b (Å)	30,971(5)	31,947(4)	12,371(3)
c (Å)	11,346(2)	9,511(1)	28,132(5)
β (°)	91,17(2)	92,81(1)	91,50(2)
Volume de la maille ($Å^3$)	1355,7(4)	1396,1(3)	1327,1(6)
références	[32]	[32]	[22, 23, 32]

Tableau 3 – Paramètres de maille des polymorphes du CMONS, voir annexe IV.

Dans un premier temps, les diffractogrammes ont été enregistrés pour des nanocristaux de CMONS insérés dans la matrice silicatée : 2 TMOS + 1 TMSE (figure 29).

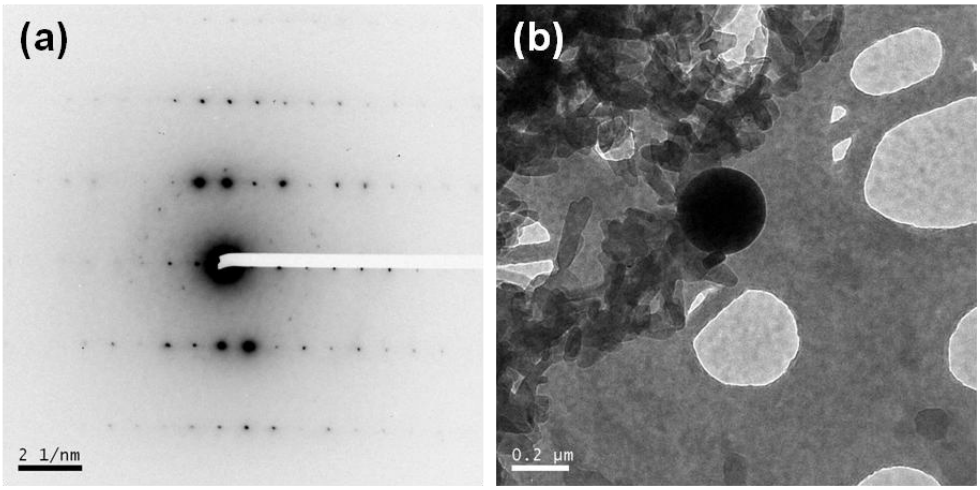


Figure 29 – (a) Diffractogramme d'un nanocristal de CMONS inséré dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE et (b) l'image de la nanoparticule partiellement dissoute donnant la figure de diffraction.

Les diagrammes de diffraction obtenus (figure 29-a) sont caractéristique de nanocristaux (figure 29-b) parfaitement monocristallins. Nous avons ensuite analysé ce cliché de diffraction, l'angle β mesuré est de 90,71° et les distances inter-réticulaires obtenues selon les axes présents sur le graphique sont de 11,675 Å et 3,924 Å.

Ces données ont été comparées à celles de la littérature [22, 23, 32] et elles correspondent à la forme (c) du CMONS, voir annexe IV. Cette forme semble être majoritairement présente dans les nanoparticules en coquille silicatée 2 TMOS + 1 TMSE. Cependant, les deux autres formes cristallines (a) et (b) ont été également obtenues suite au dépouillement mais dans des proportions beaucoup plus faibles. De plus, nous avons obtenu de nombreux diffractogrammes dont le dépouillement était plus difficile de par leur caractère polycristallin, figure 30. L'image en champ sombre (les parties qui diffractent apparaissent en blanc) correspondant à la zone ayant diffractée met en évidence la présence de nombreux nanocristaux de taille relativement petite (50 nm). Malgré la présence du diaphragme pour délimiter la zone analysée (cercle rouge figure 30-b), la zone irradiée est légèrement plus importante et les nanocristaux proches de cette zone diffractent et ajoutent donc leur contribution au cliché de diffraction.

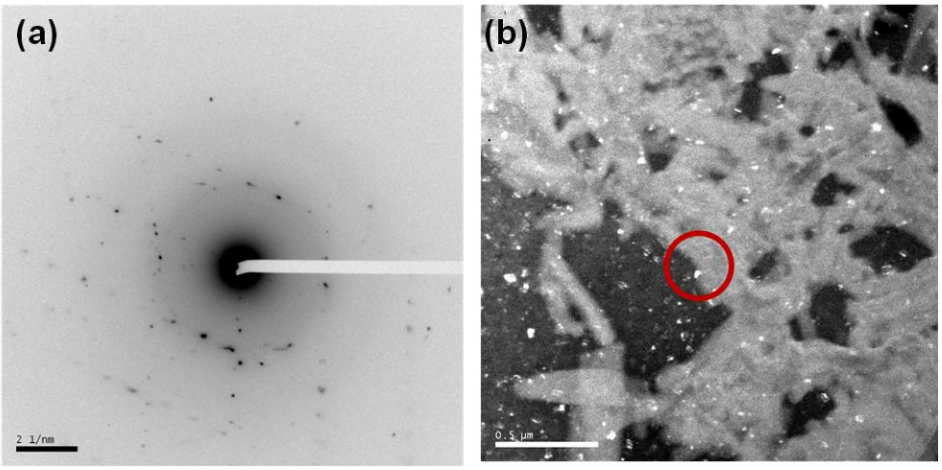


Figure 30 - (a) Diffractogramme polycristallin et (b) l'image en champs sombre des nanocristaux de CMONS insérés dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE ayant diffracté.

Dans un second temps, des diffractogrammes ont été enregistrés sur des nanocristaux de CMONS encapsulés dans une matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP. Ceci va permettre de vérifier si la nature de la coquille sol-gel impacte la nucléation et la croissance du CMONS au cœur des particules. L'analyse des différents diffractogrammes obtenus est rendue difficile par la présence de lignes diffuses, figure 31-a. La présence de ces lignes de diffusion peut correspondre à un maclage des nanocristaux. L'observation en champ sombre de la zone ayant diffracté montre que les nanocristaux de CMONS ne sont pas « homogènes » mais sont composés par une alternance de strates claires et sombres, agrandissement figure 31-c.

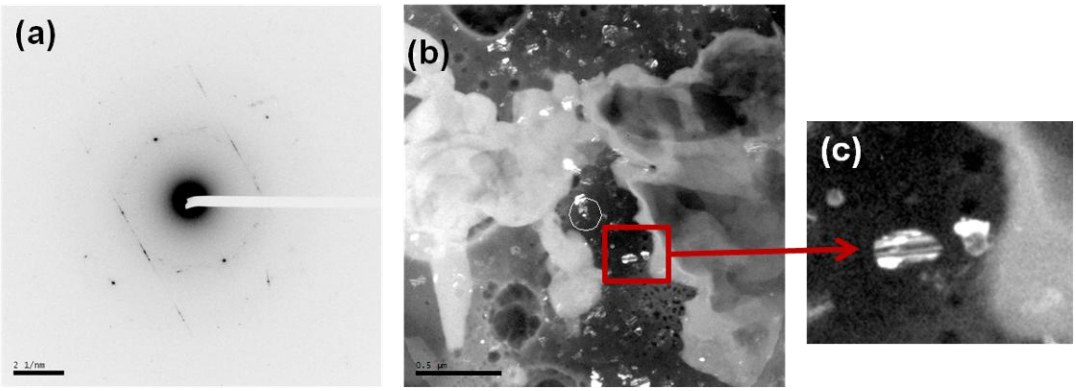


Figure 31 - (a) Diffractogramme polycristallin avec lignes diffuses, (b) l'image en champs sombre des nanocristaux ayant diffractés et (c) agrandissement d'un cristal de CMONS en matrice 8 TMOS + 1 BTP.

Nous avons pu expliquer la présence de cette alternance de strates dans les nanocristaux de CMONS en se basant sur des travaux antérieurs. Vrcelj [32] avait observé les différents polymorphes du CMONS et avait remarqué que les formes (a) et (b) ont des structures et des paramètres de maille relativement proches. Lorsqu'il imposait une déformation mécanique à un cristal de forme (b), il faisait apparaître dans ces domaines cristallins contraints la forme cristalline (a). Afin de confirmer cette hypothèse, le cliché de diffraction a été analysé. Les valeurs d'axes de zones obtenues semblent bien correspondre à la forme (a) du CMONS. Il semblerait donc qu'au cours de la nucléation et croissance du CMONS au cœur de la coquille 8 TMOS + 1 BTP, le cristal soit soumis à une forte déformation mécanique due aux forces capillaires lors du séchage de la coquille sol-gel qui entraine ainsi l'alternance des deux formes cristallines (a) et (b) au sein d'un même cristal. L'analyse générale des clichés de diffraction obtenus pour le CMONS cristallin dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP montre la coexistence des trois polymorphes mais avec une légère augmentation de la proportion de cristaux de forme (a) et (b).

Dans les deux types de matrices silicatées, nous avons observé la présence des trois polymorphes. Ceci peut venir du fait que les particules sont stockées à 140°C dans le filtre électrostatique durant plusieurs heures et qu'il y a une transformation progressive de la structure cristalline vers la forme la plus table thermodynamiquement, la forme (c). En effet, Oliver [29] a démontré que les trois polymorphes n'avaient pas la même stabilité thermodynamique : la forme (c) est plus stable que la forme (b), elle-même plus stable que la forme (a).

3.4. Conclusion

Les paramètres chimiques ont été définis pour obtenir rapidement une grande quantité de nanoparticules de petite taille, avec des diamètres inférieurs à 100 nm, contenant des concentrations élevées en fluorophore cristallisé parfaitement encapsulé par une coquille silicatée hydrophile. De plus, l'utilisation du CMONS nous a permis de vérifier la présence d'un cœur cristallin unique dans les particules. Nous avons ainsi validé l'hypothèse émise au début de cette étude : synthétiser en une étape des nanoparticules cœur cristallin organique / coquille silicatée amorphe très fluorescentes et hydrophiles. L'observation au MET a mis en évidence que le cœur organique des nanoparticules était constitué de monocristaux de très bonne qualité cristalline. Des taux de solvant importants, s = 500, favorisent la formation de très petites particules. Nous avons déterminé un taux en fluorophore autour d = 0,1 pour les différentes matrices (soit une proportion massique en

CMONS de 14 %) qui permet d'atteindre des concentrations élevées en fluorophore tout en conservant un bon confinement de la phase organique au cœur des particules. Ces taux de fluorophore équivalents sont dus à de fortes analogies entre les réactions d'hydrolyse et de condensation des alcoxydes de silicium utilisés. Les matrices 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP permettent à la fois un bon confinement de la nucléation et de la croissance du CMONS tout en conférant un caractère hydrophile marqué aux particules, ce qui sera favorable à leur dispersion en solution aqueuse.

4. Elaboration de nanoparticules hybrides avec d'autres types de fluorophores

En se basant sur les premiers résultats obtenus avec le CMONS, nous avons ensuite appliqué notre méthode d'élaboration à d'autres fluorophores pour démontrer l'aspect générique de cette méthode et pour trouver le meilleur candidat pour des applications comme traceurs fluorescents émettant si possible dans la fenêtre biologique. Les fluorophores choisis répondent tous aux critères établis dans le § 3.2.1.

4.1. Les molécules organiques

Pour l'imagerie *in-vivo*, il est nécessaire d'utiliser des molécules fluorescentes ayant des durées de vie courtes. En effet, nous utilisons un microscope à balayage biphotonique rapide qui nous permet d'acquérir en temps réel la circulation sanguine dans le cortex cérébral de la souris. Il faut donc que les fluorophores utilisés soient non seulement fluorescents à deux-photons mais aussi qu'ils aient des durées de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde. C'est le cas de nombreuses molécules organiques de petite taille appartenant aux familles des dérivées aromatiques ou encore des stilbènes. Ainsi, on peut obtenir des cycles excitation - désexcitation très rapides conduisant à l'émission d'un signal fluorescent constant (figure 32).

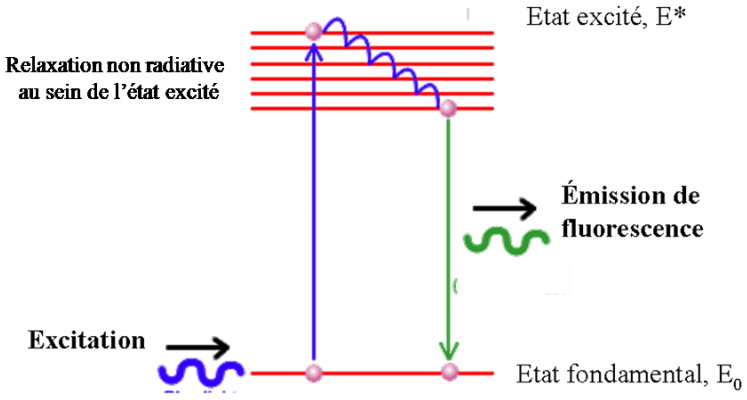


Figure 32 - Schéma de l'émission de fluorescence suite à une excitation : la molécule passe de son état fondamental, E_0, à un état d'énergie supérieur excité, E*, puis retourne à son état fondamental en émettant de la lumière.

Nous avons choisi de travailler avec des molécules commerciales, mais aussi avec des molécules synthétisées au laboratoire et des molécules issues de l'ingénierie moléculaire développée dans l'équipe CPO de l'ENS-Lyon.

4.2. 4-(Dicyanométhylène)-2-méthyl-6-(4-diméthylaminostyryl)-4*H*-pyrane ou DCM

Le DCM, figure 33, est un fluorophore organique commercial [46]. Il est utilisé entre autre pour étalonner les lasers à deux-photons ce qui en fait un candidat intéressant pour notre étude [47]. Il est soluble dans le THF et possède un point de fusion de 220°C. Son maximum d'émission de fluorescence est à $\lambda_{\text{émission max.}}$ = 640 nm ce qui en fait un candidat intéressant pour les applications biologiques. Le DCM utilisé est commercialisé par la société Radiant Dyes Laser et il a une pureté de 99,9 %.

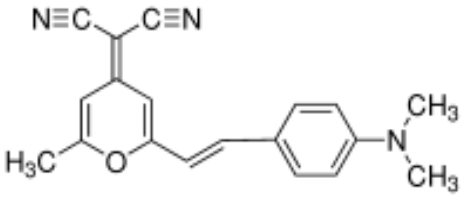


Figure 33 – Structure du DCM ou 4-(Dicyanométhylène)-2-méthyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4*H*-pyrane.

Les sols sont préparés de manière identique au CMONS et le chromophore est dissous juste avant la nébulisation. Le taux de fluorophore a été fixé à d = 0,1 comme dans le cas du CMONS. En effet, les deux fluorophores ont des masses molaires quasiment identiques, 303 g/mol pour le DCM et 280 g/mol pour le CMONS, les deux molécules devraient donc se comporter de manière similaire lors de l'encapsulation par la matrice silicatée.

La figure 34 montre que le DCM est parfaitement confiné dans la coquille silicatée, aucune trace de phase organique n'est visible à l'extérieur des nanoparticules.

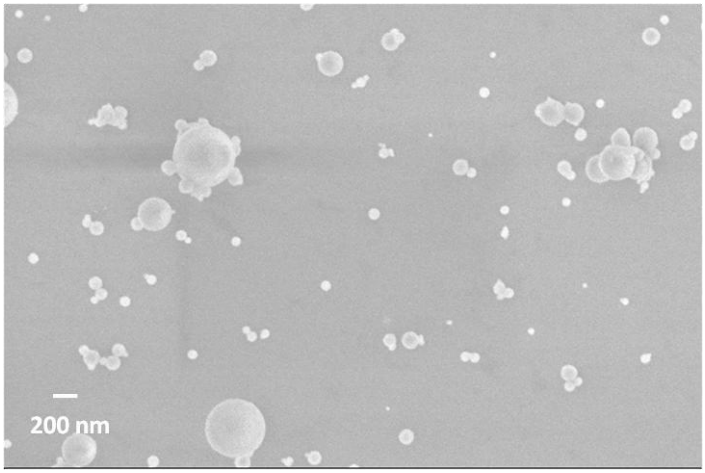


Figure 34 - Clichés MEB de nanoparticules silicatées contenant du DCM à d = 0,1.

4.3. Le 1,4-Bis[1-cyano-2-(4-diphénylamino)phényl)vinyl]benzène

Les COPV ou « cyano-oligo-phenylène-vinylènes » (figure 35) sont des molécules aromatiques appartenant à la famille des oligo-phenylène-vinylènes. Ces molécules ont été conçues et développées il y a une quinzaine d'années par S. Marder à Georgia Tech/USA [48-53].

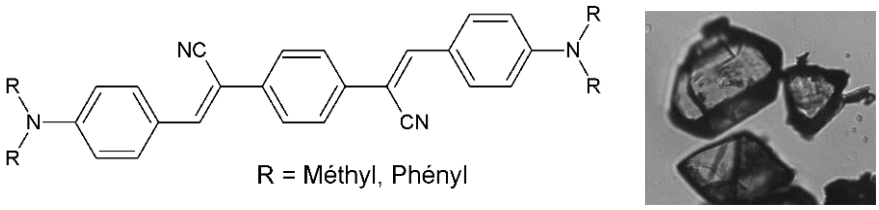
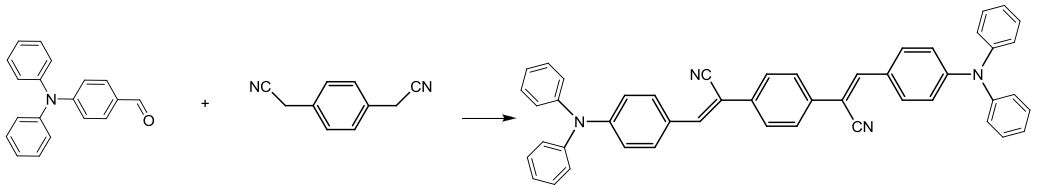


Figure 35 - Molécule de COPV (à gauche) ; cristaux de COPV observés au microscope optique en transmission (à droite).

Elles présentent une fluorescence à l'état dispersée et à l'état cristallin : $\lambda_{absorption}$ = 438 nm et un maximum d'émission à $\lambda_{émission\ max.}$ = 550 nm. Le rendement quantique de fluorescence à l'état dispersé du dérivé méthyle, COPVM ou « cyano oligo-phenylène-vinylène méthyle», est de 0,3 % et celui du dérivé phénylé, COPVB ou « cyano oligo-phenylène-vinylène benzyle», est de 1,5 %. De plus, le COPVB a une température de fusion plus élevée 190 – 200 °C contre 170°C pour le COPVM. Ces deux premiers critères, température de fusion et rendement quantique, nous ont conduit à sélectionner le COPVB. D'autre part, le COPVB est utilisé par l'équipe MOTIVE du laboratoire de Spectrométrie Physique de l'UJF dans le cadre de la thèse de M. Maurin, où il est dispersé dans une matrice pluronique pour développer des traceurs luminescents [54]. Le pluronique est un copolymère avec une alternance de blocs d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène. Les caractérisations spectroscopiques ont montré qu'en insérant le COPVB dans une matrice pluronique, le rendement quantique de fluorescence passait de 1,5 % à 8 % tandis que sa section efficace d'absorption à deux-photons à 800 nm était de 2500 GM. Les résultats obtenus lors de son application en imagerie *in-vivo* sont très encourageants [54]. Il a été possible d'imager la microvascularisation sur une profondeur de 500 µm. Ceci nous a incité à utiliser préférentiellement le COPVB dans notre étude mais cette fois sous sa forme cristalline afin de comparer les performances des traceurs avec la forme dispersée dans le pluronique.

Le COPVB, R = phényl, ou 1,4-Bis[1-cyano-2-(4-diphénylamino)phényl)vinyl]benzène a été synthétisé au laboratoire. Sa masse molaire est de 666 g/mol. La synthèse fait appel à une réaction dite de Knoevenagel entre deux produits commerciaux : le 4-(N,N'-diphénylamino)benzaldéhyde (Sigma) et le 1,4-phénylènediacétonitrile (Sigma).



La réaction s'effectue à chaud, sous reflux durant 2h dans l'éthanol absolu en présence d'un catalyseur : le tert-butoxyde de potassium. Le produit final précipite dans le milieu. Il est isolé par filtration, lavé, séché et recristallisé dans le toluène pour éliminer des traces éventuelles de réactifs. Le rendement de synthèse est d'environ 50 %. La pureté du produit final est vérifiée par chromatographie sur couche mince et par analyse RMN liquide du proton (annexe V).

4.3.1. Nanocristallisation du COPVB dans la matrice silicatée

4.3.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE

Le COPVB est dissous à un taux de fluorophore d = 0,1, dans un sol vieilli deux semaines à 65°C contenant des alcoxydes de silicium, 2 TMOS + 1 TMSE, un solvant, THF avec s = 500, h = 1, catalyse acide pH ≈ 1. La solution est nébulisée selon les paramètres physiques définis précédemment (§ 2).

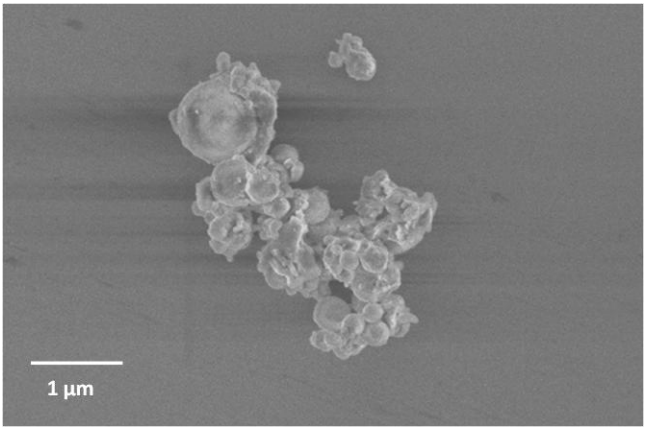


Figure 36 - Cliché MEB de nanoparticules 2 TMOS - 1 TMSE contenant d = 0,1 de COPVB.

L'observation au MEB, figure 36, met en évidence que tout le COPVB n'est pas encapsulé par la matrice silicatée. Les particules, quoique sphériques, forment des amas constitués de nanoparticules silicatées soudées entre elles par l'excès de phase organique se trouvant à l'extérieur des coquilles. Il faut donc diminuer le taux d'insertion de COPVB dans la matrice. Nous avons progressivement diminué le taux de COPVB dans le sol jusqu'à l'obtention de nanoparticules bien individualisées et sans résidus de phase organique à l'extérieur des nanoparticules. Nous avons fait varier le taux de fluorophore de 0,075 à 0,025. La figure 37 regroupe les clichés MEB obtenus suite à la nébulisation des différents sols.

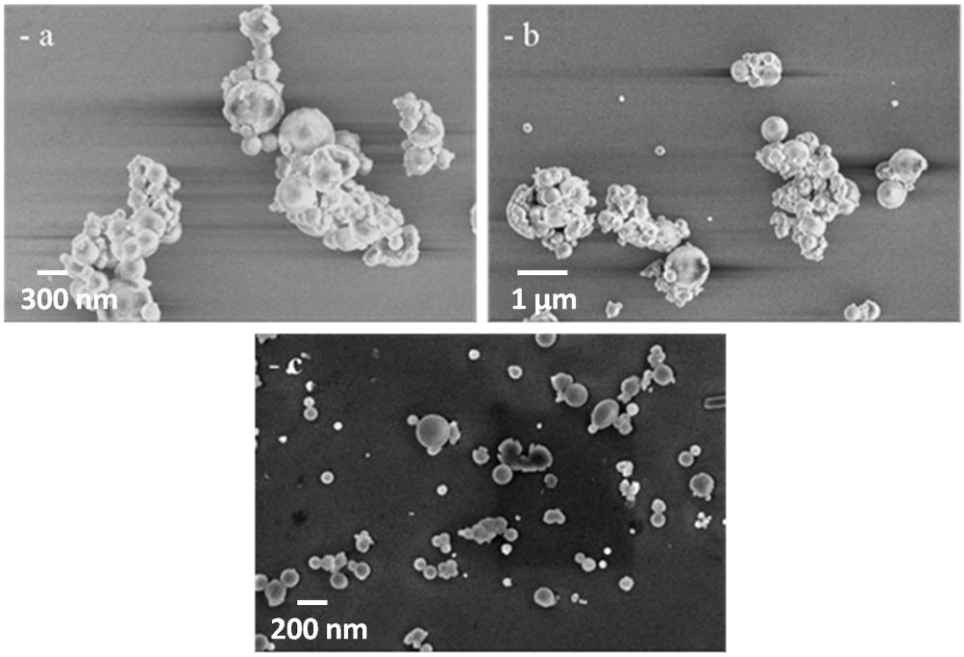


Figure 37 - Clichées MEB de nanoparticules 2 TMOS - 1 TMSE contenant du COPVB à différents taux de fluorophore : (a) d = 0,075, (b) d = 0,05 et (c) d = 0,025.

Pour des taux plus important : d = 0,075 (figure 37-a) et d = 0,05 (figure 37-b), nous observons le même phénomène que pour d = 0,1. La phase organique n'est pas totalement encapsulée par la coquille silicatée. Il est nécessaire de diminuer fortement la quantité de COPVB inséré afin de permettre sa totale encapsulation et une bonne nucléation et cristallisation du cœur organique. Pour un taux de dopage de d = 0,025, nous avons obtenu des nanoparticules bien définies sans traces de phase organique apparente, le confinement du COPVB a été total (figure 37-c). Le taux de fluorophore maximum du COPVB est plus faible que pour le CMONS, d = 0,025 contre d = 0,1. Ceci peut en partie être expliqué d'une part par la masse moléculaire du COPVB plus élevés que celle du CMONS, et d'autre part, par la solubilité du COPVB. En effet, une solubilité très élevée doit favoriser un meilleur confinement du fluorophore au cœur des nanoparticules. Malgré un taux de fluorophore plus faible, les poudres obtenues présentent une forte fluorescence, figure 38.

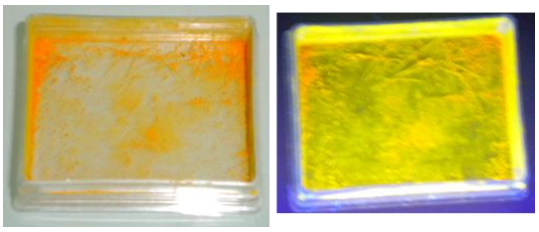


Figure 38 - Photos d'une poudre de nanoparticules dopées en COPVB sous lumière blanche (gauche) et sous UV 356 nm (droite).

4.3.1.2. Matrice 8 TMOS + 1 BTP

Comme dans le cas du CMONS, nous avons également inséré le COPVB dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP. Le COPVB est dissous à un taux de fluorophore d = 0,025, dans un sol vieilli deux semaines à 65°C contenant des alcoxydes de silicium, 8 TMOS + 1 BTP, solvant THF avec s = 500, h = 1, catalyse acide pH $\approx$ 1 (annexe I). Le taux de fluorophore a été fixé par rapport aux résultats obtenus précédemment lors de l'insertion du fluorophore dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE. La solution est nébulisée selon les paramètres physiques définis précédemment (§ 2). Les particules ainsi obtenues présentent une intense fluorescence jaune/orange. Les particules ont un comportement similaires à celles résultant de l'insertion du COPVB dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE avec un taux en fluorophore d = 0,025, figure 39. La nature de la matrice silicatée ne semble pas affecter l'encapsulation du COPVB.

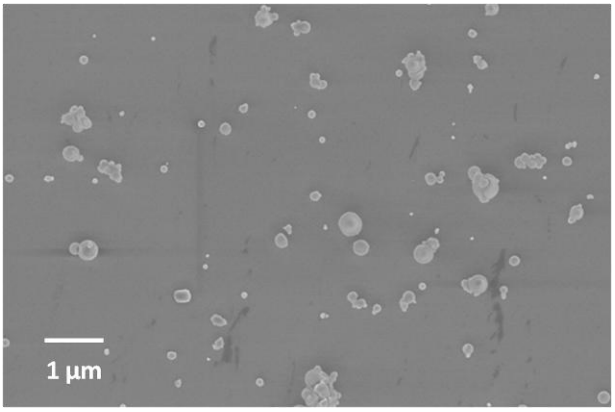


Figure 39 - Cliché MEB de nanoparticules 8 TMOS + 1 BTP contenant d = 0,025 de COPVB.

4.3.2. Conclusion

La méthode de synthèse est transposable à d'autres molécules tel que le COPVB à condition d'adapter le taux en fluorophore, d, qui est impacté par la masse molaire du

fluorophore et certainement par sa solubilité. Une solubilité élevée favorise le confinement de la phase organique dans la matrice. Le changement de matrice ne semble pas modifier le confinement du COPVB au cœur des particules. En fin de thèse, nous avons démarré une étude plus systématique de nouveaux fluorophores dans la cadre d'une collaboration avec l'équipe CPO de l'ENS-Lyon avec C. Andraud, Y. Bretoniere et J. Massin, portant sur la famille des di- et tricyanoisophores.

4.4. Les composés dicyanoisophorones et tricyanoisophorones

Ces composés appartiennent à la famille des di- et tri- cyanoisophorones (figure 40). Ils sont issus de l'ingénierie moléculaire développée par l'équipe CPO de l'ENS-Lyon dans le cadre d'une thèse [55, 56]. En utilisant une même structure moléculaire de base, certaines fonctions chimiques sont modulées pour obtenir un chromophore répondant aux critères souhaités (figure 40). C'est ainsi qu'ont été obtenus quatre composés qui ont la particularité d'émettre dans le proche infrarouge : $\lambda_{émission}$ = 700-850 nm, longueurs d'ondes idéales pour des applications biologiques (fenêtre biologique se situant entre 600 et 1100 nm). Par ailleurs, ils sont tous solubles dans le THF et présentent des températures de fusion supérieures à 170°C.

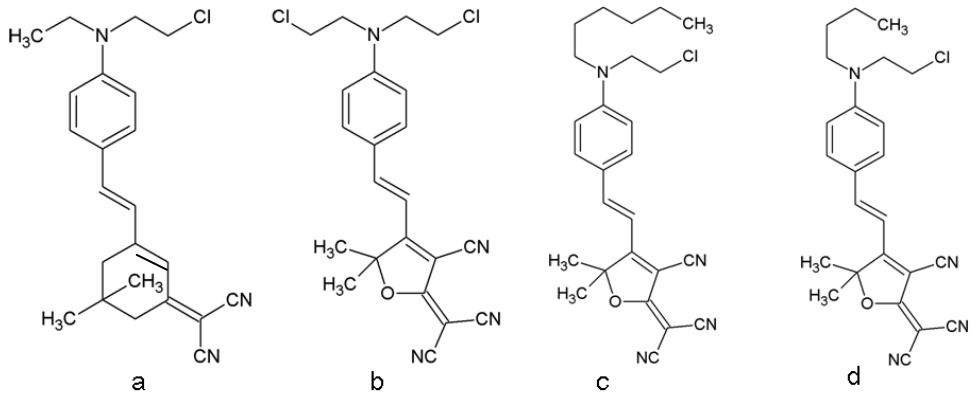


Figure 40 - Composés dicyanoisophorone (40-a) et tricyanoisophorones (40-b, -c et –d).

En se basant sur les constatations précédentes concernant le taux en fluorophore, d, celui-ci a été fixé de sorte qu'il ne dépasse pas un rapport massique de 14 % par rapport à la matrice sol-gel. Le tableau 4 regroupe les conditions expérimentales à respecter pour obtenir des nanoparticules cœur/coquille bien individualisées et sans démixtion de phase.

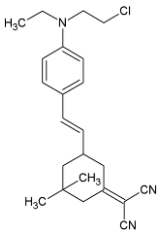
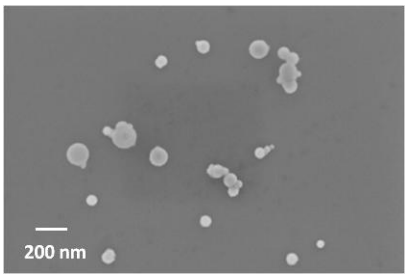
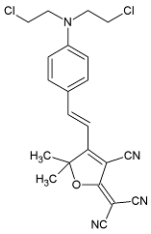
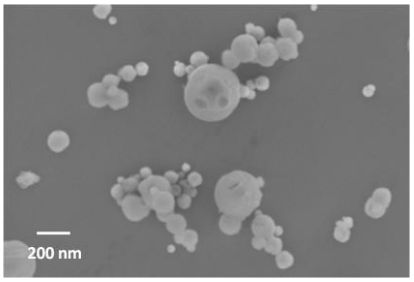
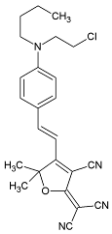
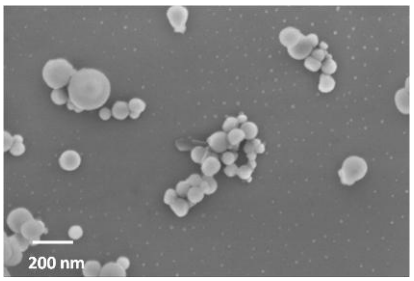
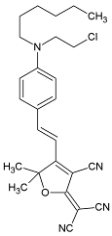
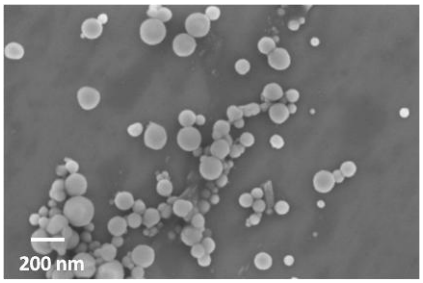
Chromophore	Masse moléculaire (g/mol)	Tf (°C)	Taux de fluorophore d	Clichés MEB
 Figure 40 - a	380	177	0,075	
 Figure 40 - b	427	191	0,05	
 Figure 40 - c	421	246	0,05	
 Figure 40 - d	449	178	0,05	

Tableau 4 - Conditions expérimentales pour obtenir des nanoparticules cœur/coquille fluorescentes dans le proche IR.

En contrôlant le taux de fluorophore, nous avons obtenu des nanoparticules bien sphériques et individualisées. La phase organique est totalement encapsulée par la matrice silicatée 2 TMOS + 1 TMSE. Les poudres obtenues sont colorées, mauve – violet, cependant leur fluorescence est difficilement observable sous lampe UV car elles émettent dans une gamme de longueur d'onde où l'œil est très peu sensible : le proche infra-rouge.

4.5. Conclusion

La méthode de nébulisation permet d'encapsuler différentes molécules organiques au sein de la coquille silicatée en préservant leur propriété de fluorescence dans l'état cristallin. Cependant, nous avons pu voir qu'il faut adapter le taux de dopage en fluorophore en fonction de la molécule organique (masse molaire, solubilité).

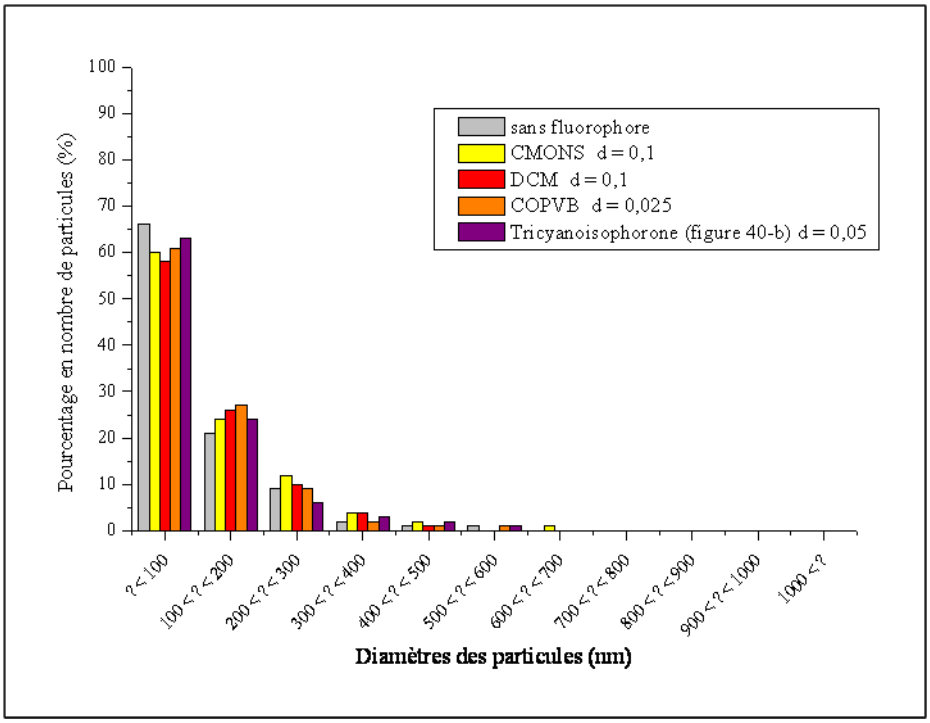


Figure 41 - Impact de la nature du chromophore sur la distribution en taille des particules.

La méthode de séchage d'aérosol est donc une méthode générique et reproductible. Elle permet d'obtenir en une étape des nanoparticules cœur/coquille encapsulant différentes familles de molécules organiques fluorescentes à l'état cristallin. De plus, quelle que soit la nature du fluorophore utilisé, on ne note pas d'influence significative sur la distribution en taille des nanoparticules hybrides, figure 41. Ceci est certainement favorisé par le fait que l'on introduit le fluorophore dans les sols juste avant l'étape de nébulisation. Ainsi, le

fluorophore n'influence pas les conditions d'hydrolyse et de polycondensation des précurseurs sol-gel.

Conclusion du chapitre

Ce deuxième chapitre a permis de démontrer la faisabilité de la méthode de nébulisation pneumatique et a mis en évidence que la nature de la source de l'aérosol n'influençait pas la formation des particules. L'optimisation des paramètres physiques, pression d'azote, débit de gaz vecteur (air), températures du four et du filtre électrostatique, ont permis d'assurer une nébulisation continue de l'aérosol, son séchage et une collecte des nanoparticules avec un rendement élevé (environ 80 %). Le contrôle de la chimie sol-gel a rendu possible la formation de nanoparticules cœur organique / coquille silicatée sans qu'il y ait démixtion de phase tout en favorisant les plus petits diamètres (Ø < 100 nm) avec une concentration élevée en fluorophore (14 % massique typiquement) dans une matrice hydrophile. Ces optimisations ont rendu possible en une seule étape et de façon reproductible la synthèse de particules hybrides très luminescentes et hydrophiles. Il a été démontré que la phase organique encapsulée par la coquille silicatée se trouvait sous sa forme cristalline. De plus, le cœur organique est constitué d'un monocristal de très bonne qualité ce qui permet d'envisager des propriétés d'émetteur unique pour ces particules.

Ce deuxième chapitre a également permis de mettre en évidence le caractère générique de cette technique de synthèse. Pour cela, il est apparu nécessaire de prendre en compte les caractéristiques propres des fluorophores telles que la masse moléculaire ou les affinités avec le solvant employé. Ceci nous conduit ensuite à la caractérisation spectroscopique des nanoparticules qui paraissaient les plus prometteuses pour des applications d'imagerie médicale.

Bibliographie

1. Areva, S., Boissiere, C., Grosso, D., Asakawa, T., Sanchez, C., and Linden, M., *One-pot aerosol synthesis of ordered hierarchical mesoporous core-shell silica nanoparticles*. Chemical Communications, 2004(14): p. 1630-1631.
2. Baccile, N., Grosso, D., and Sanchez, C., *Aerosol generated mesoporous silica particles*. Journal of Materials Chemistry, 2003. **13**(12): p. 3011-3016.
3. Boissiere, C., Grosso, D., Amenitsch, H., Gibaud, A., Coupe, A., Baccile, N., and Sanchez, C., *First in-situ SAXS studies of the mesostructuration of spherical silica and titania particles during spray-drying process.* Chemical Communications, 2003(22): p. 2798-2799.
4. Boissiere, C., Nicole, L., Gervais, C., Babonneau, F., Antonietti, M., Amenitsch, H., Sanchez, C., and Grosso, D., *Nanocrystalline mesoporous gamma-alumina powders "UPMC1 material" gathers thermal and chemical stability with high surface area.* Chemistry of Materials, 2006. **18**(22): p. 5238-5243.
5. Eerikäinen, H., *Preparation of nanoparticles consisting of methacrylic polymers and drugs by an aerosol flow reactor methodID - 568*. 2005, VTT Publication.
6. Eerikainen, H. and Kauppinen, E. I., *Preparation of polymeric nanoparticles containing corticosteroid by a novel aerosol flow reactor method.* International Journal of Pharmaceutics, 2003. **263**(1-2): p. 69-83.
7. Eerikainen, H., Kauppinen, E. I., and Kansikas, J., *Polymeric drug nanoparticles prepared by an aerosol flow reactor method.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(1): p. 136-143.
8. Eerikainen, H., Peltonen, L., Raula, J., Hirvonen, J., and Kauppinen, E. I., *Nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by an aerosol flow reactor method.* Aaps Pharmscitech, 2004. **5**(4).
9. Eerikainen, H., Watanabe, W., Kauppinen, E. I., and Ahonen, P. P., *Aerosol flow reactor method for synthesis of drug nanoparticles.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2003. **55**(3): p. 357-360.
10. TSI, *Model 3076 - Constant Output Atomizer*.
11. TSI, *Model 3074A - Filtered Air Supply*.
12. Jimenez, C. and Langlet, M., *Formation of tin by nitridation of TiO_2 films deposited by ultrasonically assisted sol-gel technique*. Surface & Coatings Technology, 1994. **68**: p. 249-252.
13. Labeau, M., Langlet, M., Reboux, V., and Joubert, J. C., *Deposit of oxide thin-film using aerosol pyrolysis - the transparent conducting oxide CDIN2O4.* Vide-Science Technique Et Applications, 1985. **40**(227): p. 315-318.
14. Langlet, M., Senet, E., Deschanvres, J. L., Delabouglise, G., Weiss, F., and Joubert, J. C., *High-TC superconducting films prepared by pyrolysis of an ultrasonic-generated aerosol.* Journal of the Less-Common Metals, 1989. **151**(1-2): p. 399-406.
15. Langlet, M. and Vautey, C., *Influence of the deposition parameters on the characteristics of aerosol-gel deposited thin films.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 1997. **8**(1-3): p. 347-351.
16. Langlet, M., Vautey, C., and Mazeas, N., *Some aspects of the aerosol-gel process.* Thin Solid Films, 1997. **299**(1-2): p. 25-32.
17. Langlet, M., Walz, D., Marage, P., and Joubert, J. C., *Glass and ceramic thin-film deposited by an ultrsonically assisted sol-gel technique*. Thin Solid Films, 1992. **221**(1-2): p. 44-54.
18. Langlet, M., Walz, D., Marage, P., and Joubert, J. C., *SiO_2 thin-film deposited by a new sol-gel technique*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1992. **147**: p. 488-492.

19. Marage, P., Langlet, M., and Joubert, J. C., *A new route for the deposition of SiO_2 sol-gel coatings.* Thin Solid Films, 1994. **238**(2): p. 218-227.
20. Philippot C., D. F., Bacia M., Djurado E., and Ibanez A., *Fluorescent organic nanocrystal confined in sol-gel matrix for bio-imaging.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2010.
21. Philippot C., M. N., Djurado E., and Ibanez A., *Nanocristaux fluorescents enrobés d'une coquille silicatée inorganique.* Patent, CNRS, France, 2009.
22. Sanz, N., Baldeck, P. L., Nicoud, J. F., Le Fur, Y., and Ibanez, A., *Polymorphism and luminescence properties of CMONS organic crystals: bulk crystals and nanocrystals confined in gel-glasses.* Solid State Sciences, 2001. **3**(8): p. 867-875.
23. Sanz, N., Zaccaro, J., Delmotte, L., Le Luyer, C., and Ibanez, A., *Preparation and characterization of N-4-nitrophenyl-L-prolinol nanocrystals in sol-gel matrices.* Journal of Solid State Chemistry, 2002. **165**(1): p. 25-34.
24. Botzung-Appert, E., *Nanocristaux organiques inclus dans des couches minces sol-gel: controle de leur distribution spatiale pour la réalisation de mémoires optiques; spectroscopie de luminescence pour la mise au pointde capteurs chimiques ou biologiques.* Thèse Docteur de l'université Josph Fourier, Grenoble 1, 2003.
25. Botzung-Appert, E., Monnier, V., Duong, T. H., Pansu, R., and Ibanez, A., *Polyaromatic luminescent nanocrystals for chemical and biological sensors.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(9): p. 1609-1611.
26. Sanz, N., Gaillot, A. C., Usson, Y., Baldeck, P. L., and Ibanez, A., *Organic nanocrystals grown in sol-gel coatings.* Journal of Materials Chemistry, 2000. **10**(12): p. 2723-2726.
27. Valeur, B., *Invitation à la fluorescence moléculaire.* ed. Boeck, D, 2004.
28. Sanz, N., *Elaboration, caractérisation structurale et etude des propriétés optiques linéaires et non linéaires de nanocristaux organiques en matrice sol-gel.* thèse de doctorat UJF- grenoble. 2000.
29. Oliver, S. N., Pantelis, P., and Dunn, P. L., *Polymorphism and crystal transformation of the highly optically nonlinear organic-compound alpha- (4'-methoxyphenyl)methylene-4-nitro-benzeneacetonitrile.* Applied Physics Letters, 1990. **56**(4): p. 307-309.
30. Treussart, F., Botzung-Appert, E., Ha-Duong, N. T., Ibanez, A., Roch, J. F., and Pansu, R., *Second harmonic generation and fluorescence of CMONS dye nanocrystals grown in a sol-gel thin film.* Chemphyschem, 2003. **4**(7): p. 757-760.
31. Brasselet, S., Le Floc'h, V., Treussart, F., Roch, J. F., Zyss, J., Botzung-Appert, E., and Ibanez, A., *In situ diagnostics of the crystalline nature of single organic nanocrystals by nonlinear microscopy.* Physical Review Letters, 2004. **92**(20).
32. Vrcelj, R. M., Shepherd, E. E. A., Yoon, C. S., Sherwood, J. N., and Kennedy, A. R., *Preparation and structural evaluation of the conformational polymorphs of alpha- (4-methoxyphenyl)methylene -4-nitrobenzeneacetonitrile.* Crystal Growth & Design, 2002. **2**(6): p. 609-617.
33. Wang, Y., Tam, W., Stevenson, S. H., Clement, R. A., and Calabrese, J., *New organic non-linear optical-materials of stilbene and diphenylacetylene derivatives* Chemical Physics Letters, 1988. **148**(2-3): p. 136-141.
34. Dubuisson, E., *Nanocristaux organiques fluorescents insérés en couche mince sol-gel : vers le développement d'un nouveau type de biopuces.* Institut Polytechniques de Grenoble-thèse de doctorat, 2009.

35. Innocenzi, P. A. M. O. a. G. M., *Structure and properties of sol-gel coatings from methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane.* Journal of Sol-Gel Science and Technology, 1994. **3**: p. 47-55.
36. Dubuisson, E., Monnier, V., Sanz-Menez, N., Boury, B., Usson, Y., Pansu, R. B., and Ibanez, A., *Brilliant molecular nanocrystals emerging from sol-gel thin films: towards a new generation of fluorescent biochips.* Nanotechnology, 2009. **20**(31): p. 315301.
37. Monnier, V. S. N. P. R. a. I. A., *PCT/FR2008/050490ID - 595*. 2008.
38. Boury, B., Ben, F., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Nobili, M., *Control of the anisotropic organization of nanostructured silica-based hybrid materials.* Chemistry of Materials, 2002. **14**(2): p. 730-738.
39. Boury, B. and Corriu, R. J. P., *Auto-organisation of hybrid organic-inorganic materials prepared by sol-gel process.* Chemical Communications, 2002(8): p. 795-802.
40. Monnier, V., *Elaboration et carctérisation structurale de nanocristaux moléculaires fluorescents inclus dans des couches minces : application à la réalisation de capteurs chimiques et biologiques*. Thèse de doctorat UJF - grenoble 2006.
41. Monnier V , D. E., Sanz-Menez N , Boury B , Rouessac V, Ayral A, Pansu RB, Ibanez A *Selective chemical sensors based on fluorescent organic nanocrystals confined in sol-gel coatings of controlled porosity*. Microporous and mesoporous materials 2010. **132**(3): p. 531-537.
42. Monnier V, Sanz, N., Pansu, R., Ibanez, A., *PCT/FR2800/050490ID - 596*. 2008, France.
43. Loy, D. A., Jamison, G. M., Baugher, B. M., Russick, E. M., Assink, R. A., Prabakar, S., and Shea, K. J., *Alkylene-bridge polysilsesquioxane aerogels - highly porous hybrid organic-inorganic materials* Journal of Non-Crystalline Solids, 1995. **186**: p. 44-53.
44. Boury, B., Chevalier, P., Corriu, R. J. P., Delord, P., Moreau, J. J. E., and Chiman, M. W., *Hybrid organic-inorganic xerogel access to meso- and microporous silica by thermal and chemical treatment.* Chemistry of Materials, 1999. **11**(2): p. 281-291.
45. Boury, B., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Le Strat, V., *Structure of silica-based organic-inorganic hybrid xerogel.* Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. **265**(1-2): p. 41-50.
46. Webster, F. G. M. W. C., *US patent 3852683ID - 611*. 1974.
47. Shao, P., Huang, Z. L., Li, J., Chen, S., Luo, J. L., Qin, J. G., and Liu, B. F., *Two-photon absorption properties of two (dicyanomethylene)-pyran derivatives.* Optical Materials, 2006. **29**(2-3): p. 337-341.
48. Perry, J. W., Albota, M., Ananthavel, S., Beljonne, D., Bredas, J. L., Cumpston, B., Dyer, D. L., Ehlrich, J. E., Heikal, A. A., Hess, S. E., Kogej, T., Kuebler, S. M., Lee, I. Y. S., Levin, M. D., Marder, S. R., McCord-Maughon, D., Rockel, H., Rumi, M., Subramanian, G., Webb, W. W., Wu, X. L., and Xu, C., *Design of organic molecules with large two-photon absorption cross-sections.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1999. **217**: p. 338-PHYS.
49. Zhan, X. W., Haldi, A., Risko, C., Chan, C. K., Zhao, W., Timofeeva, T. V., Korlyukov, A., Antipin, M. Y., Montgomery, S., Thompson, E., An, Z. S., Domercq, B., Barlow, S., Kahn, A., Kippelen, B., Bredas, J. L., and Marder, S. R., *Fluorenyl-substituted silole molecules: geometric, electronic, optical, and device properties.* Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(26): p. 3157-3166.

50. Kogej, T., Beljonne, D., Meyers, F., Perry, J. W., Marder, S. R., and Bredas, J. L., *Mechanisms for enhancement of two-photon absorption in donor-acceptor conjugated chromophores.* Chemical Physics Letters, 1998. **298**(1-3): p. 1-6.
51. Pond, S. J. K., Rumi, M., Levin, M. D., Parker, T. C., Beljonne, D., Day, M. W., Bredas, J. L., Marder, S. R., and Perry, J. W., *One- and two-photon spectroscopy of donor-acceptor-donor distyrylbenzene derivatives: Effect of cyano substitution and distortion from planarity.* Journal of Physical Chemistry A, 2002. **106**(47): p. 11470-11480.
52. Rumi, M., Pond, S. J. K., Meyer-Friedrichsen, T., Zhang, Q., Bishop, M., Zhang, Y., Barlow, S., Marder, S. R., and Perry, J. W., *Tetrastyrylarene derivatives: Comparison of one- and two-photon spectroscopic properties with distyrylarene analogues.* Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(21): p. 8061-8071.
53. Zheng, S. J., Leclercq, A., Fu, J., Beverina, L., Padilha, L. A., Zojer, E., Schmidt, K., Barlow, S., Luo, J. D., Jiang, S. H., Jen, A. K. Y., Yi, Y. P., Shuai, Z. G., Van Stryland, E. W., Hagan, D. J., Bredas, J. L., and Marder, S. R., *Two-photon absorption in quadrupolar bis(acceptor)-terminated chromophores with electron-rich bis(heterocycle)vinylene bridges.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(3): p. 432-442.
54. Maurin, M., Vurth, L., Vial, J. C., Baldeck, P., Marder, S. R., Van der Sanden, B., and Stephan, O., *Fluorescent Pluronic nanodots for in vivo two-photon imaging.* Nanotechnology, 2009. **20**(23).
55. Barsu, C., Cheaib, R., Chambert, S., Queneau, Y., Maury, O., Cottet, D., Wege, H., Douady, J., Bretonniere, Y., and Andraud, C., *Neutral push-pull chromophores for nonlinear optical imaging of cell membranes.* Organic & Biomolecular Chemistry. **8**(1): p. 142-150.
56. Nelson, R. L., Kajzar, F., Kaino, T., Bouit, P. A., Wetzel, G., Feneyrou, P., Bretonniere, Y., Kamada, K., Maury, O., and Andraud, C., *Near IR two photon absorption of cyanines dyes. application to optical power limiting at telecommunication wavelengths*, in *Organic Photonic Materials and Devices X*. 2008. p. U3-U11.

Chapitre III :

Caractérisations physico-chimiques et spectroscopiques des nanoparticules

Introduction …….…... **125**
1. Dispersion des nanoparticules en solution ……...…….. **125**
1.1. Stabilité colloïdale ……..……...….. 125
1.2. Dispersion des nanoparticules ……...….. 127
1.2.1. Dispersion en milieu aqueux ou tampon biologique ……....….. 127
1.2.2. Dispersion en milieu alcalin ……..……...….. 128
1.2.3. Sélection en taille …….....…….. 129
1.3. Caractérisation des charges de surface et de la dispersion des nanoparticules ……...…..……..…….. 131
1.3.1. Mesure ……..……..……...…….. 132
1.3.1.1. Matrice 2 TMOS – 1 TMSE ……..…….. 132
1.3.1.2. Matrice 8 TMOS – 1 BTP ……...……...….. 134
1.4. Conclusion ……..…….…….…... 135
2. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules hybrides ……...…….. **136**
2.1. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules de CMONS ..…... 136
2.1.1. Estimation de la concentration molaire en CMONS des solutions ..136
2.1.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du CMONS ….. 139
2.1.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du CMONS encapsulé en matrice sol-gel ……...…….. 142
2.1.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de CMONS …... 143
2.1.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de CMONS ……...……... 144
2.1.6. Mesures en FLIM des nanoparticules ……..…….. 146
2.1.7. Conclusion sur le CMONS cristallin inséré en coquilles silicatées …….147
2.2. Caractérisation spectroscopique de fluorescence à un photon de nanoparticules de COPVB en coquille silicatée …….…... 147
2.2.1. Estimation de la concentration molaire des solutions en COPVB encapsulé en matrice sol-gel ……...…….. 147
2.2.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du COPVB 148
2.2.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du COPVB encapsulé en matrice sol-gel ……...….. 150
2.2.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de COPVB …... 150
2.2.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de COPVB ……...……...….. 151
2.2.6. Conclusion sur le COPVB cristallin dans les coquilles silicatées ..153
Conclusion …….….. **153**
Bibliographie ……..….. **154**

Introduction

Dans un premier temps, nous présenterons l'optimisation des conditions de dispersion des nanoparticules en solution aqueuse, leur stabilité colloïdale en fonction du pH de la solution et la méthode de sélection en taille des nanoparticules dispersées. Dans un deuxième temps, nous étudierons la spectroscopie de fluorescence de ces nanoparticules soumises à une excitation à un et deux photons. Les propriétés de traceurs pour l'imagerie médicale de ces nanoparticules hybrides cœur organique cristallin / coquille silicatée amorphe seront ainsi évaluées.

1. Dispersion des nanoparticules en solution

En vue d'applications comme traceurs fluorescents injectables dans la circulation sanguine, il est impératif d'obtenir des nanoparticules stables colloïdalement dans un milieu aqueux biologique : eau à 0,9 g/L de NaCl, tampon biologique TRIS. D'autre part, nous avons pu voir dans le chapitre II que la méthode de synthèse par nébulisation génère des nanoparticules polydisperses de diamètre compris entre 50 et 700 nm. L'ajustement des paramètres physiques et chimiques a permis de réduire sensiblement la dispersion en taille, cependant on obtient toujours des particules qui présentent des diamètres trop importants pour être injectées *in-vivo* [1-3]. La mise en solution des nanoparticules nous permettra d'obtenir des solutions stables colloïdalement et de sélectionner les plus petites (diamètre inférieur à 100 nm) par centrifugation ou filtration.

1.1. Stabilité colloïdale

La stabilité des suspensions est liée à la taille et aux forces coulombiennes répulsives dues aux charges de surface existant autour de chaque particule. Pour que les particules ne s'agglomèrent pas et qu'elles ne précipitent pas, il faut qu'elles se repoussent à courte distance et qu'elles soient de petite taille (Ø < 200 nm) afin de ne pas sédimenter sous l'effet des forces de gravitation [4, 5]. Il existe deux types de forces répulsives générant de la stabilité colloïdale: la répulsion coulombienne et l'encombrement stérique, figure 1 [6-9].

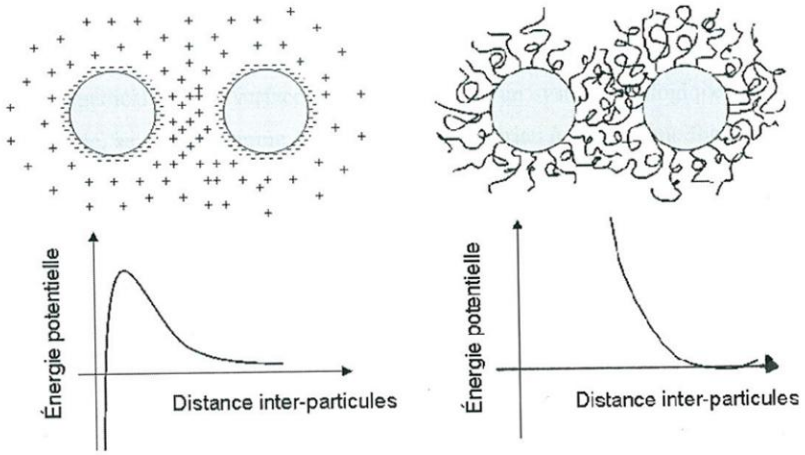
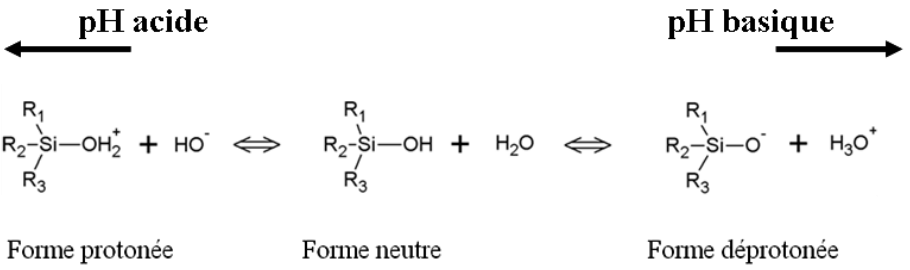


Figure 1 - Représentation de la répulsion coulombienne (à gauche) et de la répulsion stérique (à droite) [10].

- La stabilisation coulombienne

La stabilité est dite électrostatique lorsque les forces répulsives sont générées par la présence de charges de surface. Quand deux particules se rapprochent, la somme des forces attractives et répulsives présente un maximum de potentiel de répulsion à une distance donnée entre les deux particules, figure 1 [6-9]. Si les particules se rapprochent encore, l'énergie potentielle diminue fortement, les particules sont alors très fortement liées. Les forces de répulsion électrostatique sont particulièrement importantes en milieu aqueux où elles dépendent fortement du pH. Le point de charge nulle, PCN, est défini par le pH pour lequel la densité de charges de surface s'annule. Dans le cas des nanoparticules silicatées, les groupements ionisables en fonction du pH sont les fonctions silanols [11, 12]:



(1)

A la surface de la coquille silicatée, les charges de surface sont dues à la polarisation de la densité électronique de l'oxygène par le silicium ce qui entraîne un affaiblissement de la liaison OH des groupements silanol de surface. Ceci explique le comportement acido-

basique, de type Brönsted, des oxydes dont les groupements de surface s'ionisent en milieu aqueux.

- La répulsion stérique

La répulsion stérique est le deuxième mécanisme qui permet d'obtenir des dispersions de nanoparticules stables. Dans ce cas, la stabilisation est due aux forces de répulsion entre les molécules greffées à la surface des particules qui interdisent ainsi une mise en contact des particules. La courbe d'énergie potentielle totale du système ne présente plus de minimum, mais une barrière d'énergie qui tend vers l'infini lorsque la distance inter-particule tend vers zéro, figure 1 [6-9]. En effet, quand les chaînes de polymères s'interpénètrent, il se produit une perte d'entropie de configuration qui augmente l'énergie libre du système et provoque des forces de répulsion entre les chaînes. La barrière physique contribue également à diminuer les forces de Van der Waals entre les particules en les maintenant ainsi à distance.

Enfin, ces mécanismes de stabilisation (Coulombienne et stérique) sont interdépendants [4, 5]. Il faut donc bien les prendre en compte pour obtenir des solutions colloïdales fluorescentes et stables. Cependant, la répulsion stérique permet une bien meilleure stabilisation des nanoparticules dispersées.

1.2. Dispersion des nanoparticules

En nous appuyant sur les mécanismes de stabilisation, nous avons mis en place un protocole de dispersion des nanoparticules sèches, obtenues après synthèse et permettant d'obtenir des solutions stables de nanoparticules hybrides fluorescentes en milieux aqueux.

1.2.1. Dispersion en milieu aqueux ou tampon biologique

Des nanoparticules de CMONS dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE ont été dispersées en milieu aqueux afin de les réhydrater et d'obtenir des solutions stables colloïdalement (figure 2-a). Les concentrations en particules sont au départ de l'ordre du g/L. Cependant, après sonification pour bien homogénéiser les suspensions (figure 2-b), il est très rapidement observé une forte décantation des plus grosses particules (figure 2-c et 2-d). Cela permet leur élimination et l'obtention d'un surnageant homogène et fluorescent. Cependant, le surnageant ne reste pas stable longtemps. Au bout d'une semaine toutes les particules ont sédimenté au fond du flacon à cause de l'agrégation des nanoparticules tandis que la solution ne fluoresce plus (figure 2-e).

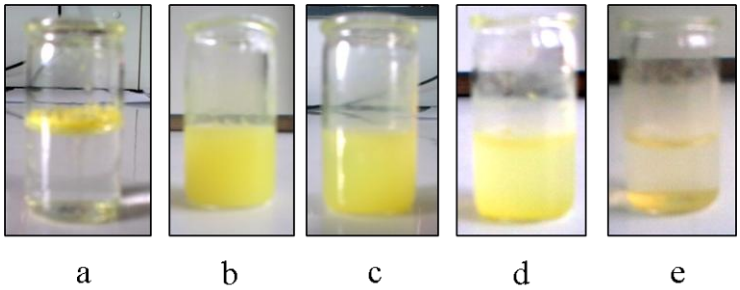


Figure 2 – Essais de dispersion des nanoparticules dans l'eau déminéralisée (lumière visible).

Les particules ne sont donc pas stables colloïdalement dans le temps par cette méthode simple de dispersion. Comme nous l'avons décrit précédemment, les particules doivent être chargées en surface pour être stable colloïdalement dans le temps. Il est convenu que les particules présentant des potentiels zêtas $\xi < -20$ mV ou $\xi > 20$ mV sont stables colloïdalement [6, 9, 13-18]. Ors, dans notre cas, les particules obtenues suite au séchage de l'aérosol ne sont pas ou peu chargées en surface. Les fonctions silanols présentes en surface sont essentiellement sous leur forme neutre, ce qui ne permet pas d'assurer la stabilité colloïdale de la dispersion. Il est donc nécessaire d'effectuer un traitement acido-basique des nanoparticules afin de générer des charges permettant d'obtenir des suspensions fluorescentes stables dans le temps.

1.2.2. Dispersion en milieu alcalin

Afin de créer des charges de surface sur les nanoparticules, nous les avons dispersées dans un milieu alcalin à pH = 12 dans une solution de soude à 0,01M. Au cours des travaux précédents, il a été mis en évidence que l'utilisation de solutions alcalines permet de dissoudre partiellement la coquille silicatée [19, 20]. De plus, étant à pH basique, des charges négatives sont créées en surface des nanoparticules (équation 1). Nous avons transposé cette technique de décapage contrôlé de couches sol-gel silicatée aux nanoparticules. L'utilisation de solutions de soude à 0,01 M a permis de dissocier d'une part les nanoparticules soudées entre elles en dissolvant légèrement les coquilles silicatées et de créer d'autre part des charges de surfaces afin d'obtenir des dispersions stables. La dissolution de la coquille silicatée doit être partielle afin d'éviter de faire émerger le cœur organique cristallin. Enfin, cette dissolution partielle amincit la coquille silicatée ce qui réduit d'autant plus la taille des nanoparticules.

Nous avons optimisé ce traitement des nanoparticules en les dispersant par sonification dans une solution de soude à 0,01 M durant 24h à l'abri de la lumière.

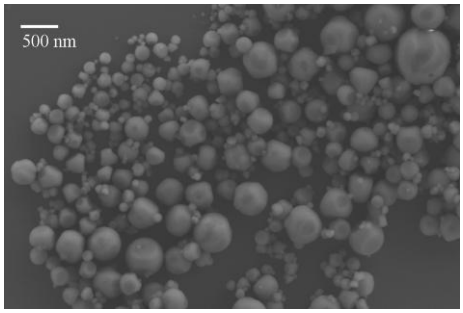


Figure 3 - Cliché MEB de nanoparticules traitées 24 h dans une solution de soude 0,01M.

Cette première étape a permis de bien individualiser les particules (figure 3), ce qui est indispensable avant leur sélection en taille. Les suspensions de nanoparticules de CMONS cristallin dans une coquille 2 TMOS + 1 TMSE obtenues présentent une forte fluorescence mais sont légèrement troubles à cause de la présence de particules ayant des diamètres trop importants (Ø > 200 nm). Il faut donc à la fois éliminer ces particules et stopper la réaction afin d'éviter la dissolution totale de la coquille silicatée.

1.2.3. Sélection en taille

Deux techniques ont été envisagées pour effectuer la sélection en taille des particules : la centrifugation et la filtration. Dans les deux cas, nous avons travaillé avec les solutions NaOH (10^{-2}M durant 24h) qui permettent de bien dissocier les nanoparticules (figure 3) et de les disperser électrostatiquement.

- Centrifugation

La sélection en taille par centrifugation s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, la solution est centrifugée à 8 000 tours/mn durant 5 minutes pour éliminer les particules ayant un diamètre supérieur à 600 nm. Le surnageant résultant est ensuite centrifugé une deuxième fois mais plus lentement à 500 tours/mn durant 2 h afin de décanter les particules de diamètre compris entre 200 et 600 nm. Les suspensions résultantes présentent des nanoparticules ayant un diamètre maximum de 150 nm, figure 4. Une fois neutralisé, ces suspensions fluorescentes sont stables colloïdalement durant plusieurs mois.

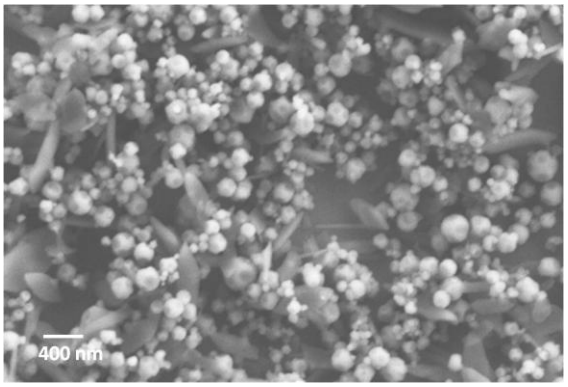


Figure 4 - Clichés MEB d'une solution de nanoparticules de diamètres compris entre 50 et 150 nm obtenue par centrifugation.

- Filtration

La filtration a été la deuxième voie envisagée pour sélectionner les plus petites particules. Pour cela, il faut employer différentes tailles de filtres (de 5µm à 100 nm) afin de filtrer la solution jusqu'à obtention d'une solution contenant uniquement des particules avec un diamètre inférieur à 100 nm. Cependant, les solutions initiales sont de l'ordre du g/L et il est impératif de changer fréquemment de filtre pour un même seuil de filtration pour limiter les risques de saturation de la membrane et de perte de produit. D'autre part, la nature de la membrane filtrante est importante. En effet, nous travaillons en milieu aqueux, il faut donc que la membrane soit hydrophile et qu'il n'y ait pas d'interactions chimiques entre les particules chargées et la membrane. Les membranes qui permettent une bonne filtration de nos solutions sont des membranes en nylon, en PVDF ou en acétate de cellulose.

- Centrifugation puis filtration

Au vu des résultats obtenus par les deux techniques pour sélectionner les plus petites particules, il est apparu intéressant de les associer. Une centrifugation à 8.000 tours/mn durant 5 minutes permet d'éliminer rapidement les plus grosses particules qui ont tendance à boucher les filtres. Puis le surnageant est filtré avec des filtres ayant des seuils de filtration dégressifs : 5.000, puis 1200, 800, 450 et enfin 100 nm, pour obtenir au final des solutions concentrées en nanoparticules avec des diamètres inférieurs à 100 nm.

Nous optons donc pour cette dernière technique qui nous permet d'obtenir rapidement des solutions injectables. Cependant, il est nécessaire de passer par une ultime étape : la neutralisation de la solution car celle-ci est à pH = 12 et ne peut donc pas être injecté dans le vivant. Il faut donc abaisser ensuite la solution au pH biologique : 7,5 – 8.

- Neutralisation

La neutralisation est une étape impérative de la mise en solution des nanoparticules afin qu'elles puissent être injectées dans le vivant sans causer de chocs irréversibles au petit animal. Les solutions sont ramenées à un pH compris entre 7,5 et 8 à l'aide d'une solution d'HCl (1M). Cet ajout entraine la formation de chlorure de sodium, NaCl, compatible avec la future application biologique. Cependant, le taux de NaCl généré dans la solution doit être contrôlé pour ne pas excéder la concentration de 0,9 g/l. En effet, au-delà de cette concentration il y a des risques de chocs osmotiques (éclatement des hématies suivis d'une hémorragie) lors de l'injection d'une solution trop saline dans la circulation sanguine du petit animal.

La neutralisation à l'HCl permet de stopper la dissolution de la coquille silicatée. Les charges de surfaces présentes sur les nanoparticules ont été mesurées afin de confirmer l'obtention de solutions stables colloïdalement.

1.3. Caractérisation des charges de surface et de la dispersion des nanoparticules

La zêtamétrie (annexe VI) est une technique permettant de mesurer le potentiel zêta de particules en suspension et de caractériser ainsi la stabilité des ces suspensions en fonction de différents paramètres (pH, concentration en ions). Le potentiel zêta, ξ, représente la charge moyenne que les particules acquièrent grâce aux ions qui les entourent en solution. Le potentiel zêta peut être considéré comme un bon indicateur des interactions (répulsions coulombiennes) entre particules et donc de la stabilité colloïdale. Une solution est considérée stable lorsque $\xi > |30|$ mV. Le potentiel zêta dépend de nombreux paramètres tels que la température, ξ diminue lorsque la température augmente, et surtout le pH du milieu de dispersion (voir § 1.1) [13-18].

Le système de Zêtasizer NANO-ZS de Malvern Instrument qui nous a permis de mesurer le potentiel zêta est couplé à un spectromètre de corrélation de photon, PCS (annexe VII). Cela donne la distribution des rayons hydrodynamiques des particules en suspension en supposant que les particules sont sphériques et que l'échantillon est stable. Cette étude va nous permettre de vérifier les observations effectuée au MEB sur l'état dispersé des particules dans la solution aqueuse. De plus, nous pourront suivre l'état de stabilité de dispersion des particules en fonction du pH de la solution.

1.3.1. Mesure

Les mesures ont été effectuées à une température constante de 25 ± 1 °C avec le Zêtasizer NANO-ZS de Malvern. Il est constitué d'un montage optique comprenant : une source laser He-Ne (50mW, λ = 532 nm) équipée d'un filtre spatial et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu d'une cellule de mesure, d'un photomultiplicateur placé à 90°C du faisceau incident permettant la mesure d'intensités diffusées très faibles générées par des particules de très petite taille. Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations de la lumière diffusée dues aux mouvements Browniens des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation du signal. Les conditions opératoires sont fixées par un logiciel de pilotage. Nous pouvons ainsi mesurer à la fois le potentiel zêta de la solution à un pH donné et la distribution en taille correspondante.

1.3.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE

Dans un premier temps, nous avons étudié la stabilité d'une solution fluorescente de nanoparticules dont la coquille est issue de l'hydrolyse/condensation du mélange 2 TMOS – 1 TMSE (voir chapitre II, § 3.2). Les solutions ont été préparées selon le mode opératoire défini précédemment (§ 1.2). La stabilité colloïdale a été étudiée dans une gamme de pH comprise entre 2 et 12. Le potentiel zêta ainsi que la distribution en taille des diamètres hydrodynamiques ont été mesurés en parallèle, figure 5.

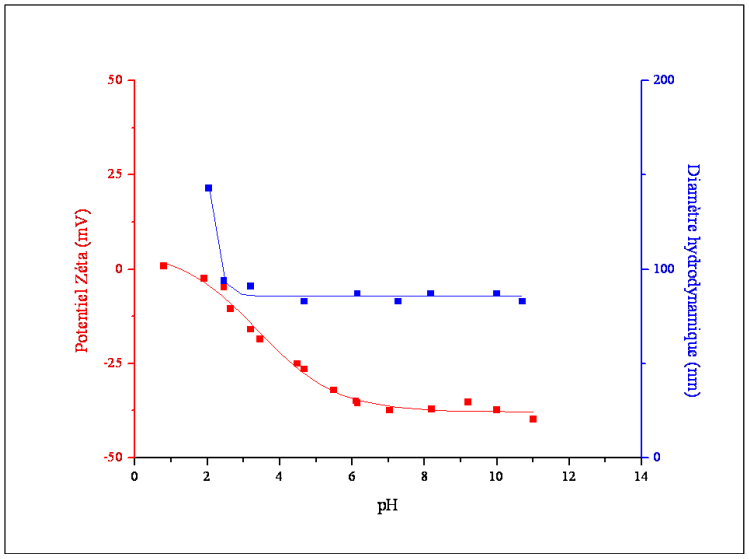


Figure 5 - Evolution du potentiel zêta (rouge) et du diamètre hydrodynamique moyen (bleu) des nanoparticules préparées à partir de précurseurs sol-gel 2 TMOS + 1 TMSE.

La figure 5 met en évidence le domaine de stabilité colloïdale des nanoparticules pour une plage de pH compris entre 5 et 11. En effet, le potentiel zêta est quasi-constant dans ce domaine et il est inférieur à -30 mV ce qui confirme le caractère stable de la suspension colloïdale. De plus, la mesure de la distribution en taille des diamètres hydrodynamiques vient confirmer la présence de nanoparticules uniques et bien dispersées dans le milieu comme nous pouvons le voir sur le cliché MEB, figure 6. Les diamètres observés sur le cliché et ceux obtenus suite à l'analyse PCS sont parfaitement similaires. La PCS donne un diamètre hydrodynamique moyen à 90 nm tandis que l'on observe au MEB des particules avec un diamètre moyen de 100 nm, figure 6. Le diamètre est légèrement plus important pour le MEB à cause de la couche de NaCl résiduel qui s'est déposée sur les nanoparticules suite à l'évaporation totale de l'eau.

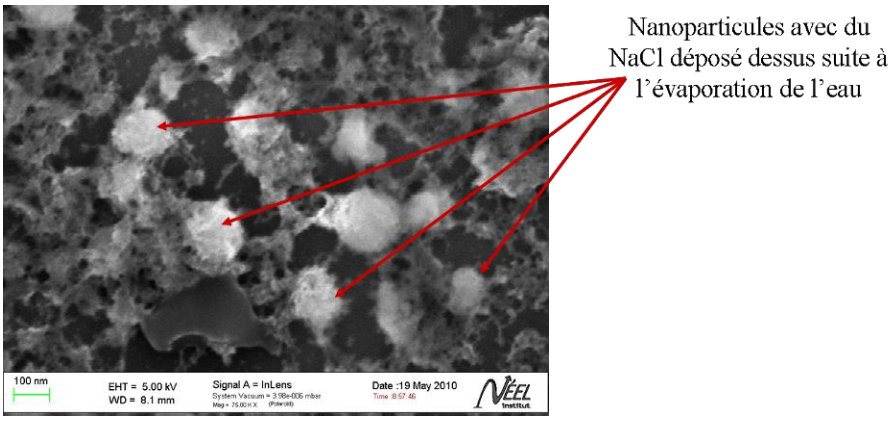


Figure 6 - Cliché MEB de nanoparticules de matrice silicatée 2 TMOS + 1 TMSE provenant de la solution analysée en zêtamétrie. En surface des particules, il y a un dépôt de NaCl résiduel suite à l'évaporation de l'eau.

Pour des pH < 5, le potentiel zêta augmente progressivement jusqu'à tendre vers 0 pour un pH proche de 2. Ce point peut être assimilé au point de charge nulle (PCN) des particules qui avoisine celui de particules de silice qui est à pH = 2,2. Au voisinage du PCN, nous pouvons voir une profonde modification du comportement de la distribution en taille du diamètre hydrodynamique des particules. Leur diamètre croîent très rapidement et les particules, en s'agrégeant, floculent.

En conclusion, la gamme de pH de stabilité colloïdale de ce type de particule est compatible avec le pH des milieux biologiques, ce qui est prometteur pour leur utilisation comme agent imageant.

1.3.1.2. Matrice 8 TMOS + 1 BTP

Les mêmes analyses ont été effectuées sur des nanoparticules composées d'une matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP encapsulant du COPVB. De la même manière, une solution stable de nanoparticules a été préparée en les dispersant en solution NaOH (10^{-2}M) durant 24h, en sélectionnant la taille par centrifugation puis filtration et enfin en abaissant le pH à 8 avec une solution d'HCl (1M). Le potentiel zêta ainsi que le diamètre hydrodynamique moyen des particules en solution ont été mesurés sur une gamme de pH comprise entre 2 et 12 pour juger de la stabilité colloïdale de la solution, figure 7.

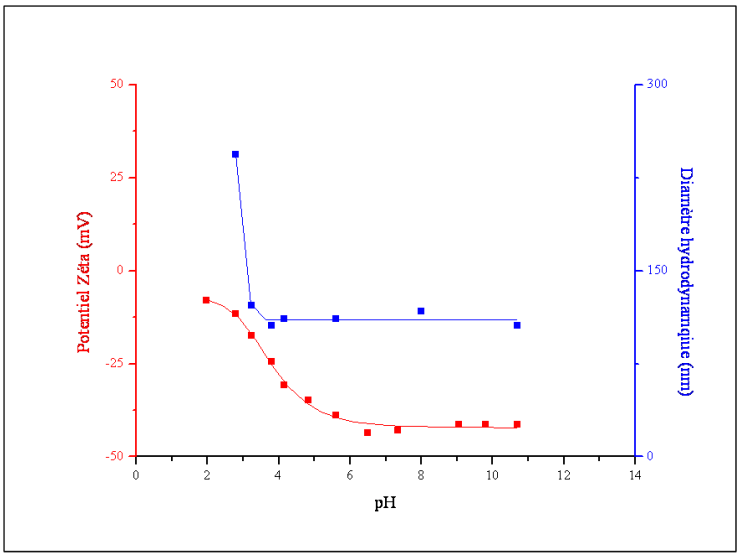


Figure 7 - Evolution du potentiel zêta (rouge) et du diamètre hydrodynamique moyen (bleu) des nanoparticules élaborées avec une matrice sol-gel 8 TMOS + 1 BTP

La figure 7 met en évidence le domaine de stabilité colloïdale de la solution pour la même plage de pH que précédemment, entre 5 et 11. Le potentiel zêta, inférieur à -30 mV, est quasi-constant confirmant ainsi le caractère stable de la solution. La mesure de la distribution en taille des diamètres hydrodynamiques vient confirmer la présence de nanoparticules uniques et bien dispersées dans le milieu comme nous pouvons le voir sur le cliché MEB, figure 8. Les diamètres observés sur le cliché et ceux obtenus suite à l'analyse PCS sont similaires. La PCS donne un diamètre hydrodynamique moyen de 110 nm tandis qu'il est observé au MEB des particules ayant un diamètre moyen de 120 nm, figure 8, l'élargissement du diamètre au MEB est dû comme précédemment au dépôt résiduel de NaCl. Les diamètres hydrodynamiques sont plus élevés dans le cas de cette matrice à base de 8 TMOS + 1 BTP que pour la matrice 2 TMOS + 1 TMSE. Ceci pourrait être expliqué

par l'espaceur du BTP qui a une taille nettement plus grande que celle du groupement diméthyl du TMSE.

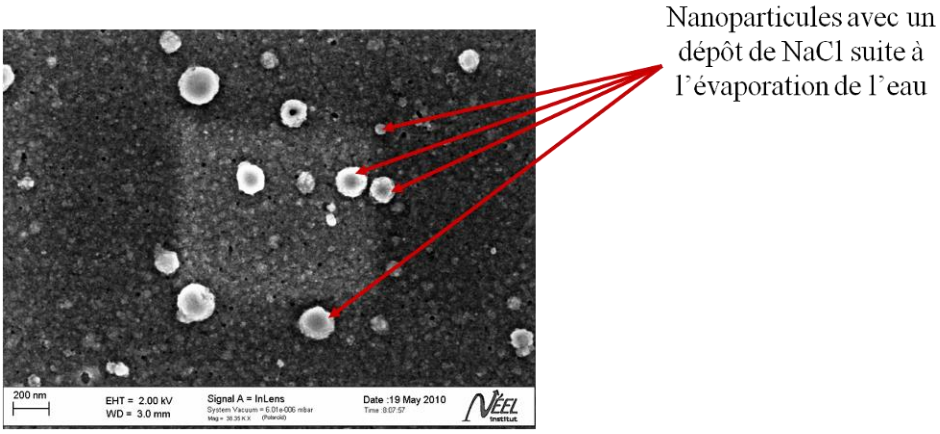


Figure 8 - Cliché MEB des nanoparticules ayant une matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP provenant de la solution analysée en zêtamétrie. En surface des particules, il y a un dépôt de NaCl résiduel suite à l'évaporation de l'eau.

Pour des pH < 5, le potentiel zêta augmente rapidement pour tendre à 0 pour un pH proche de 2 comme précédemment. Cette augmentation du potentiel zêta s'accompagne d'un élargissement du diamètre hydrodynamique des particules qui s'agrègent et floculent.

Cette deuxième analyse a permis de mettre en évidence le caractère stable de la solution de nanoparticules avec une matrice 8 TMOS + 1 BTP dans une gamme de pH compatible avec une application biologique. Ceci semble donc limiter les risques de floculation des particules dès leur injection dans le vivant.

1.4. Conclusion

Afin d'obtenir une solution stable de nanoparticules, il faut passer par une étape de dispersion dans un milieu fortement alcalin (NaOH à 10^{-2}M, pH = 12) durant 24h. Ce traitement permet de dissocier les agrégats de nanoparticules par dissolution partielle de la coquille silicatée par la soude. Les solutions sont ensuite centrifugées et filtrées afin d'obtenir des solutions finales contenant uniquement des particules ayant un diamètre inférieur à 100 nm. Enfin, pour avoir une solution qui soit injectable dans le vivant et pour stopper l'attaque de la coquille silicatée par la soude, le pH de la solution est abaissé à pH = 8 qui est compatible avec une application biologique.

Les charges de surfaces des nanoparticules ont été mesurées, par zêtamétrie, afin de confirmer que les solutions se trouvent dans un état stable colloïdalement. Quelle que soit la nature de la coquille silicatée : 2 TMOS + 1 TMSE ou 8 TMOS + 1 BTP, il a été observé que dans la gamme 5 < pH < 10, les solutions présentent un potentiel zêta inférieur à – 30 mV ce qui garantit la stabilité colloïdale des particules dans le milieu. Des mesures des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules sont venues confirmer ce résultat. Pour la gamme de stabilité du potentiel zêta, les particules sont bien individualisées et ne s'agrègent pas, ce qui a été également observé au MEB. Ces solutions stables ont pu ensuite être caractérisées spectroscopiquement.

2. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules hybrides

Nous avons étudié par spectroscopie d'absorption et de fluorescence le comportement spectroscopique des nanocristaux de CMONS et de COPVB encapsulés dans deux types de matrices silicatées différentes : 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP. Ces caractérisations ont permis d'observer l'effet de l'enrobage silicaté sur les propriétés de fluorescence à un (annexe VIII) et deux photons (annexe IX) des nanocristaux moléculaires [21].

2.1. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules de CMONS

Le CMONS présente des propriétés de fluorescence à l'état cristallin intéressantes qui dépendent du type de structure cristalline obtenue. Les suspensions colloïdales de nanoparticules hybrides, cœur nanocristallin CMONS / coquille silicatée, sont caractérisées spectroscopiquement afin de comparer ces propriétés optiques à celles connues pour le CMONS cristallisé [22-25].

2.1.1. Estimation de la concentration molaire en CMONS des solutions

Les nanoparticules ont été dispersées en milieu aqueux et sélectionnées en taille comme décrit précédemment (§ 1.2.). La concentration molaire finale en fluorophore dans les solutions n'est donc pas connue. Elle peut varier en fonction de la distribution en taille des particules après le traitement chimique, de la filtration et du taux de chargement en CMONS dans les particules. Afin de déterminer les caractéristiques spectroscopiques des particules, il est important d'estimer la teneur en CMONS des solutions obtenues. Pour déterminer la concentration en CMONS, nous pouvons nous appuyer sur la loi de Beer-

Lambert (voir annexe) qui permet de remonter à la concentration en fluorophore en fonction de l'absorbance de la solution et du coefficient d'extinction molaire du fluorophore à une longueur d'onde donnée [21].

Le spectre d'absorption du CMONS dilué dans le THF est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer (voir annexe VIII) sur une gamme spectrale comprise entre 250 et 800 nm. Le maximum d'absorbance du CMONS dissous dans ce solvant se situe à $\lambda_{abs.\ max}$ = 370 nm (spectre noir, figure 9-a) et le spectre est composée d'une bande unique. Afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire du CMONS, l'absorbance de plusieurs solutions de CMONS dissous dans le THF à des concentrations connues variables a été mesuré à $\lambda_{abs.}$ = 370 nm. La droite obtenue permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire du CMONS : $\boldsymbol{\varepsilon_{CMONS\ dissous} = 32200\ M^{-1}.cm^{-1}}$.

Nous avons ensuite comparé les spectres d'absorption du CMONS selon qu'il soit dissous dans le THF ou sous une forme cristalline au cœur d'une coquille silicatée en suspension dans l'eau afin de les comparer.

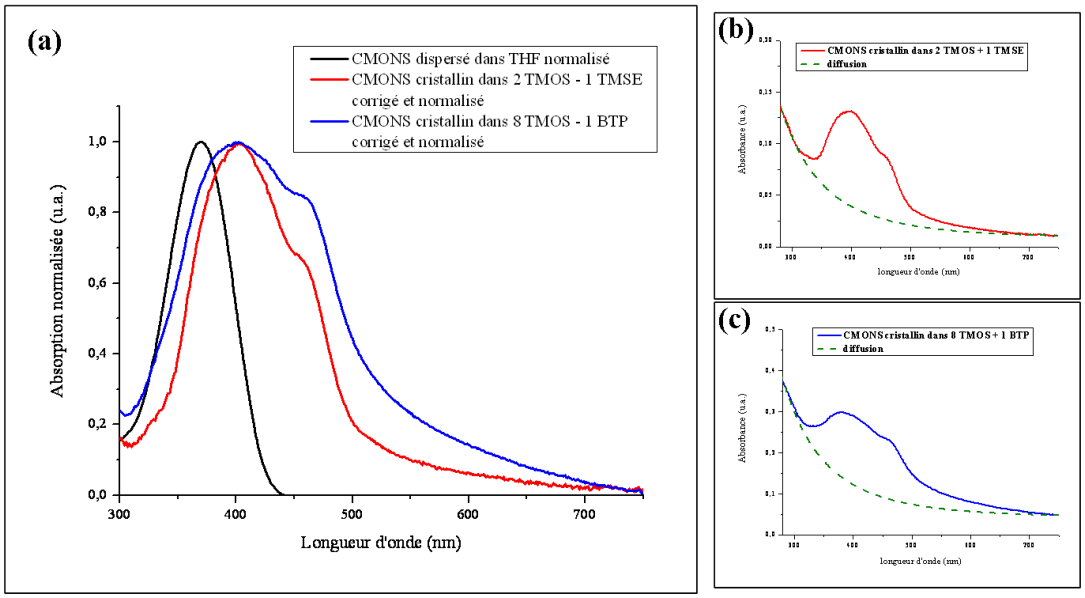


Figure 9 – (a) Spectres d'absorption normalisés du CMONS dissous dans le THF (noir), le CMONS cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE en suspension dans l'eau (rouge) et le CMONS cristallin dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP en suspension dans l'eau (bleu) ; (b) Spectre d'absorption « brut » du CMONS cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE et (c) Spectre d'absorption « brut » du CMONS cristallin dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP.

Pour mettre en parallèle les spectres d'absorptions du CMONS dissous en solution et cristallin dans les coquilles silicatées, il est nécessaire dans un premier temps, de traiter les spectres d'absorption des nanoparticules afin de soustraire la contribution de la diffusion de la lumière, figure 9-b et 9-c. Puis, une déconvolution a mis en évidence que dans le cas du CMONS cristallin les spectres d'absorption sont composés de deux bandes, figure 10. Ceci est dû à une double contribution moléculaire provenant directement de la maille cristalline du CMONS qui est composée de 4 molécules de CMONS identiques 2 à 2. La figure 9-a montre également qu'en fonction de l'environnement et de l'état cristallin du CMONS, le spectre d'absorption varie. Il apparait que lorsque le CMONS est sous sa forme cristalline le spectre d'absorption s'élargit et se décale vers le rouge. Dans le cas du CMONS encapsulé dans une coquille silicatée 8 TMOS + 1 BTP, le spectre d'absorption s'élargit un peu plus que celui mesuré dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE, d'environ 20 %. Ce phénomène peut s'expliquer par la coexistence de deux formes cristallines comme nous avons pu le voir en diffraction électronique dans le chapitre II, § 3.3.4.

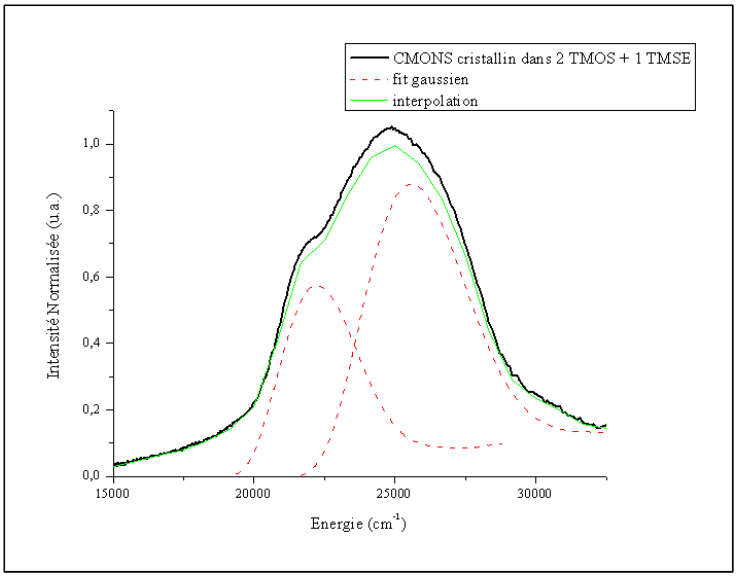


Figure 10 - Spectre d'absorption en énergie du CMONS cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE (noir) avec mise en évidence de la double contribution moléculaire (ajustement à l'aide de courbe gaussienne en rouge et interpolation en vert).

La présence de deux contributions moléculaires dans le spectre d'absorption du CMONS cristallin par rapport au CMONS dissous impacte sur le coefficient d'extinction molaire de la molécule à l'état cristallin (figure 10). Afin d'estimer le coefficient molaire du CMONS cristallin, nous avons comparé les aires intégrées en énergie des spectres d'absorption du

CMONS cristallin et de du CMONS dissous dans le THF, tableau 1. En posant l'hypothèse qu'à densité optique équivalente, on a l'équivalence suivante :

$$\varepsilon_{\text{CMONS dissous}} \cdot A_{\text{CMONS dissous}} = \varepsilon_{\text{CMONS cristallin}} \cdot A_{\text{CMONS cristallin}}$$

Nous obtenons donc une estimation des coefficients d'extinction molaire du CMONS cristallin selon la nature de matrice silicatée donnée au tableau 1.

	Aire intégrée en énergie (cm^{-2})	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)
CMONS dispersé dans le THF	5500	32200
2 TMOS + 1 TMSE	7900	22400
8 TMOS + 1 BTP	9840	18000

Tableau 1- Valeurs des aires intégrées en énergie des spectres d'absorption du CMONS dissous en solution (THF) et cristallin enrobé d'une coquille silicatée ainsi que les coefficients d'extinction molaire correspondants à λ = 370 nm.

Un écart de 20 % est présent entre les coefficients d'extinction molaire du CMONS cristallisé au sein des deux différentes matrices sol-gel. Ceci vient corroborer l'observation faite sur l'élargissement du spectre d'absorption lorsque le CMONS est dans la matrice 8 TMOS + 1 TMSE, figure 9-a. Cette différence est certainement liée à la différence de polymorphe du CMONS selon la nature de la coquille silicatée comme préalablement observé au chapitre II § 3.3.4.

2.1.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du CMONS

De nombreuses matrices silicatées ont été testés au cours de cette étude et seulement deux ont été retenues : 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP. Il a été vu que les interactions matrice silicatée / fluorophore jouaient un rôle important sur l'enrobage du CMONS par la coquille, chapitre II § 3.3.4. On a pu voir au travers de la diffraction électronique et des spectres d'absorption que la matrice silicatée impactait sur la forme cristalline. Le CMONS qui a la particularité d'être fluorescent uniquement à l'état cristallin, présente trois polymorphes possédant chacun des caractéristiques spectroscopiques qui leur sont propre, tableau 2 [22-25].

Forme cristalline	Seuil d'absorption (nm)	Maximum d'émission de fluorescence (nm)
CMONS – (a)	493	539
CMONS – (b)	524	560
CMONS – (c)	503	550
Mélange CMONS – (a) + (c)	510	555

Tableau 2 - Seuil d'absorption et maximum de fluorescence pour les différents polymorphes du CMONS [23].

Nous allons donc pouvoir comparer les données spectroscopiques avec les structures cristallines obtenues par diffraction électronique afin de caractériser les polymorphes formés au cours de la nucléation et croissance confinée du CMONS dans les nanoparticules. Afin de comparer le comportement spectroscopique du CMONS en fonction de la nature de la coquille silicatée, nous avons mesuré les spectres d'émission de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 400 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluromax@4 Horiba de chez Jobin-Yvon (voir annexe VIII), figure 11.

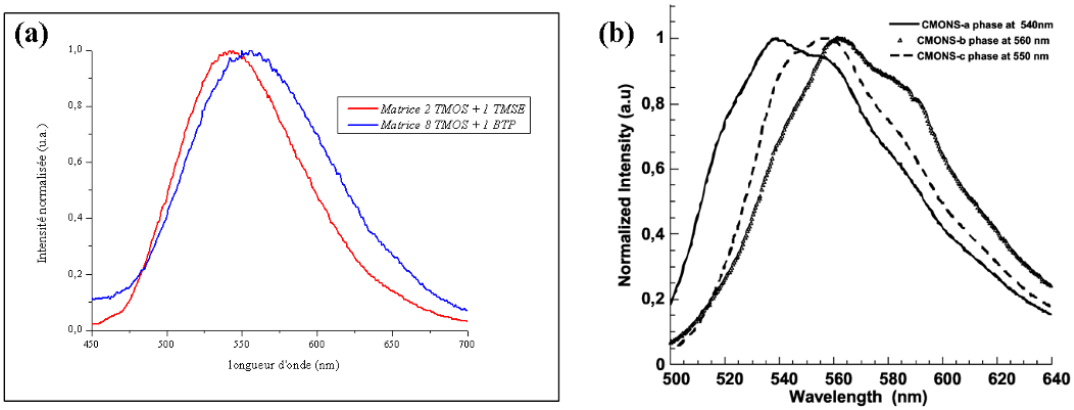


Figure 11 – (a) Spectres d'émission λ = 400 nm du CMONS encapsulé dans deux types de matrices silicatées : 2 TMOS + 1 TMSE (rouge) et 8 TMOS + 1 BTP (bleu) ; (b) Spectres d'émission de fluorescence des trois polymorphes du CMONS [23].

La figure 11-a fait apparaitre une différence de comportement spectroscopique du CMONS en fonction de la nature de la matrice sol-gel. En effet, il apparait que lorsque le CMONS est enrobée dans la coquille silicatée 8 TMOS + 1 BPT, les spectres d'absorption (figure 9-

a) et d'émission (figure 11-a) se décalent vers rouge. Les valeurs d'émission maximales ainsi que les seuils d'absorption ont été consignées dans le tableau 3 afin de les comparer à celles listées dans le tableau 2 pour remonter aux formes cristallines du CMONS selon le type de matrice.

Matrice sol-gel	Seuil d'absorption (nm)	Maximum d'émission de fluorescence (nm)
2 TMOS + 1 TMSE	506	544
8 TMOS + 1 BTP	525	555

Tableau 3 - Seuil d'excitation et maximum d'émission de fluorescence du CMONS en fonction de la nature de la coquille silicatée.

La comparaison de ces valeurs et des spectres obtenus pour les nanoparticules permet une analyse de la forme cristalline du CMONS présent dans les nanoparticules. Ces valeurs différent légèrement des valeurs théoriques [23], tableau 2, car dans notre cas les cristaux de CMONS sont encapsulés dans une matrice sol-gel qui peut entraîner un léger décalage des spectres d'émissions de fluorescence vers le bleu. Il semblerait que :

- Pour la matrice 2 TMOS + 1 TMSE, il s'agisse soit du polymorphe (a) ou du polymorphe (c)
- Pour la matrice 8 TMOS + 1 BTP, il s'agisse du polymorphe (b) ou d'un mélange des polymorphes (a) et (c).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en diffraction électronique dans le chapitre II § 3.3.4. Les différences de polymorphe cristallin selon la nature de la matrice sol-gel provient du fait que les interactions CMONS – matrice sont différentes selon la nature de la coquille silicatée. La présence d'une chaine PEG dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP modifie l'environnement chimique autour du CMONS, les oxygènes de la chaine PEG peuvent interagir avec le CMONS pour créer des liaisons faibles du type Van der Waals, liaisons hydrogène. Ceci impacte la nucléation et la croissance confinée du cœur organique et peut expliquer la coexistence des deux polymorphes dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP.

2.1.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du CMONS encapsulé en matrice sol-gel

Une estimation des rendements quantiques du CMONS cristallin selon la nature de la matrice silicatée a été faite [21, 26]. Pour cela, nous avons utilisé comme référence la rhodamine 6G pouvant être dissoute dans l'eau et qui a un rendement quantique de 0,9. Les solutions de nanoparticules ont été quant à elles préparées selon le protocole décrit précédemment (§ 1.2.2.).

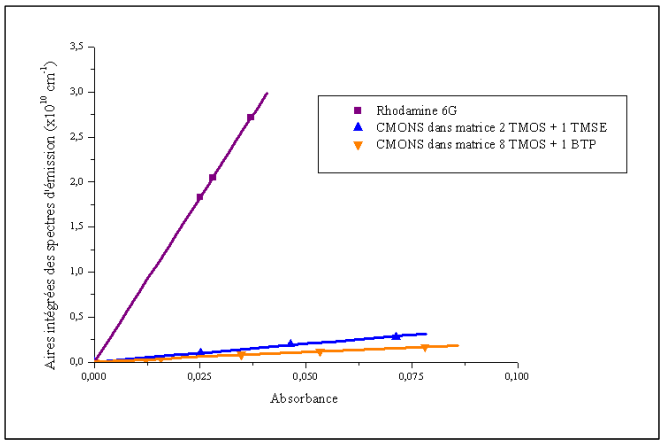


Figure 12 - Courbes de l'intégrale des aires des spectres d'émission en $*10^{10}$ cm^{-1} en fonction de l'absorbance des solutions : Rhodamine 6G (mauve), CMONS dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE (bleu) et CMONS dans la matrice 8 TMOS + BTP (orange).

	Pente	$\Theta_{référence}$	$\Theta_{estimé}$
Rhodamine 6G	73,36	0,9	-
2 TMOS + 1 TMSE	4,05	-	0,049
8 TMOS + 1 BTP	2,23	-	0,027

Tableau 4 - Estimation des rendements quantiques relative du CMONS cristallin selon la matrice silicatée en suspension aqueuse.

Afin d'estimer le rendement quantique moléculaire du CMONS en fonction de la nature de la matrice silicatée (figure 12 et tableau 4), nous nous sommes appuyés sur l'équation 4 (voir annexe) car le solvant est le même pour les nanoparticules et pour la rhodamine 6G.

Nous pouvons voir nettement à la fois sur la figure 12 et sur le tableau 4 que les rendements quantiques du CMONS cristallin sont relativement faibles. De plus, il apparait que le rendement quantique du CMONS dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP est légèrement plus faible que dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE. Ceci est certainement dû à la présence de deux phases cristallines dans ce type de matrice silicatée. Cependant, les valeurs obtenues sont des estimations portant sur le rendement quantique moléculaire, dans notre cas le CMONS est présent dans les nanoparticules sous la forme d'un cristal composé d'une grande quantité de molécules (10^6 à 10^7 molécules par cristal). C'est en jouant sur la quantité de molécule composant le cœur cristallin qu'on augmente l'intensité de fluorescence des solutions de nanoparticules.

2.1.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de CMONS

Nous avons pu monter que les propriétés spectroscopiques ainsi que la structure cristalline du CMONS étaient sensiblement influencées par la nature de la matrice silicatée. Les mesures de durée de vie de fluorescence ont été effectuées (voir annexe VIII) afin de vérifier si la matrice silicatée impacte aussi la durée de vie de fluorescence du CMONS cristallin.

	Corrélation Bi-exponentielle				Corrélation Tri-exponentielle					
	τ_1 (ns)	%1	τ_2 (ns)	%2	τ_1 (ns)	%1	τ_2 (ns)	%2	τ_3 (ns)	%3
2 TMOS + 1 TMSE					1,92	16	0,25	53	0,05	31
8 TMOS + 1 BTP	0,35	43	0,05	57						

Tableau 5 - Impact de la matrice silicatée sur les durées de vie de fluorescence du CMONS.

Dans les travaux antérieurs de l'équipe, les durées de vie de fluorescence du CMONS cristallisé dans des massifs sol-gel ont été mesurées [24, 25]. Deux durées de vie de fluorescence ont été mises en évidence : une courte de 0,23 ns et une plus longue à 1,8 ns [24, 25]. Le tableau 5 montre que les valeurs obtenues pour les nanoparticules de CMONS s'approchent de celles précédemment obtenues dans les sol-gel massifs avec une

composante de l'ordre de 0,3 ns. De plus, nous pouvons voir une différence de comportement du CMONS selon la matrice silicatée et donc de sa forme cristalline. Le CMONS encapsulé par la matrice 2 TMOS + 1 TMSE présente un comportement tri-exponentiel avec une durée de vie de fluorescence supérieure à la nanoseconde qui correspond à la valeur obtenue pour les massifs sol-gel. Le CMONS enrobé par une matrice 8 TMOS + 1 BTP a un comportement bi-exponentiel avec deux durées de vie de fluorescence courtes dont une à 0,05 ns. Cette différence peut s'expliquer en se basant sur les spectres d'absorption des solutions, figure 20. En effet, plus le spectre d'absorption s'élargit plus les durées de vie de fluorescence sont courtes ce qui est le cas pour le CMONS inséré dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP. Nous avons pu voir un élargissement significatif du spectre d'absorption accompagné également d'une diminution du coefficient d'extinction molaire.

2.1.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de CMONS

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'émission de fluorescence à deux-photons (voir annexe IX) des solutions à $\lambda_{excitation}$ = 800 nm avec un laser accordable Sa:Ti femtosecondes à une puissance de 50 mW et un temps d'acquisition de 1 seconde, figure 13-a [27, 21]. Nous retrouvons les mêmes profils spectraux d'émission de fluorescence que lors des mesures à un photon avec un décalage des spectres selon le type de matrice silicatée utilisée (§ 2.1.2.). Le CMONS cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE présente un maximum d'émission à 545 nm alors qu'en matrice 8 TMOS + 1 BTP il a un maximum de fluorescence à 558 nm. D'autre part, ces mesures ont mis évidence une différence de comportement entre les deux matrices silicatées. En effet, le CMONS cristallin dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP (spectre bleu – figure 13) présente un signal de génération de seconde harmonique (GSH) assez important. Ce phénomène de GSH est induit par la forme non-centrosymétrique du CMONS cristallin, il est très important dans le cas du polymorphe (a) et faible pour le polymorphe (b) [22-25] (chapitre II § 3.3.4). Seulement deux polymorphes du CMONS présentent une structure non-centrosymétrique : la forme (a) et la forme (b) ce qui corrobore les résultats obtenus en diffraction électronique (chapitre II § 3.3.4). Nous avons vu que dans la matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP, nous avons au sein d'un même cristal de CMONS une alternance des formes cristallines (a) et (b). En ce qui concerne le CMONS encapsulé dans la coquille 2 TMOS + 1 TMSE (spectre rouge – figure 13), la GSH est très faible ce qui vient également conforter les résultats

obtenus en diffraction électronique où la forme (a) est très minoritaire par rapport à la forme (c).

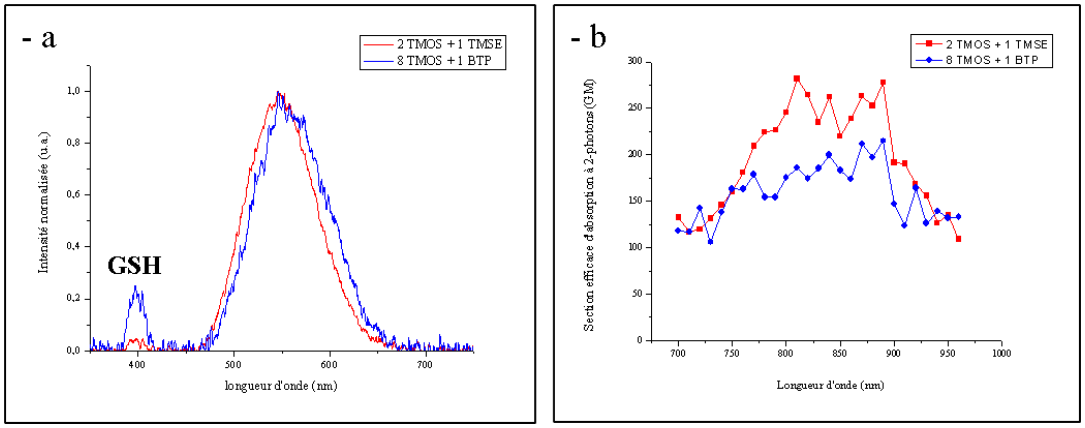


Figure 13 – (a) Spectres d'émission de fluorescence à 2-photons à $\lambda_{excitation}$ = 800 nm et (b) mesure de la section efficace d'absorption à deux photons du CMONS cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE (rouge) et 8 TMOS + 1 BTP (bleu).

	Concentration estimée (mol/L)	σ_{TPA} (GM)
2 TMOS + 1 TMSE	$3{,}3.10^{-6}$	270
8 TMOS + 1 BTP	$2{,}6.10^{-6}$	220

Tableau 6 – Estimation des concentrations et de la section efficace d'absorption à 2 photons.

Dans un second temps, nous avons estimé la section efficace d'absorption molaire à deux-photons (σ_{TPA}, voir annexe IX) des solutions en faisant varier la longueur d'onde d'excitation du laser entre 700 et 950 nm par pas de 10 nm. La concentration des solutions a été estimée en utilisant les coefficients d'extinction molaire déterminés précédemment (§ 2.1.1.) et leur absorbance maximale à un photon, tableau 6. La figure 13-b montre que la section efficace d'absorption à deux-photons du CMONS est quasiment la même quelle que soit la matrice silicatée. L'écart existant entre les deux matrices, tableau 6 et figure 13-b, peut provenir des estimations faite pour déterminer la concentration des solutions et des erreurs de détermination du rendement quantique de fluorescence à un photon.

2.1.6. Mesures en FLIM des nanoparticules

Le FLIM (Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy) est une technique d'analyse qui permet à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser et d'un laser pulsé bi-photonique (laser pulsé Ti : Sa fs, 'Tsunami' Spectra-Physics de 690 à 1100 nm) de dresser une cartographie des durées de vie de fluorescence. Ces mesures ont été effectuées à l'institut Albert Bonniot de Grenoble sur la plateforme Microscopie Photonique - Imagerie Cellulaire. Les échantillons ont été préalablement déposés sur une lamelle de microscope puis observés au microscope à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{excitation}$ = 820 nm, figure 14.

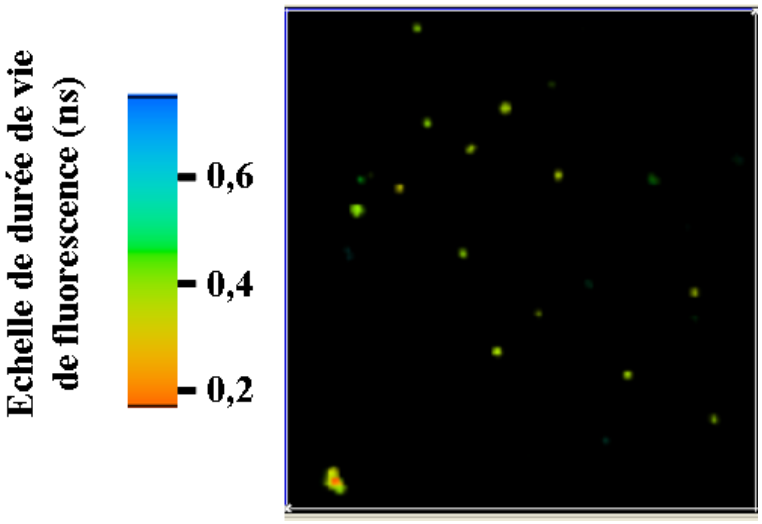


Figure 14 - Cliché FLIM de CMONS cristallin dans une matrice silicatée 2 TMOS + 1 TMSE.

L'analyse de la figure 14 met en évidence que les durées de vie de fluorescence sont relativement homogènes pour des particules ayant des tailles similaires. Nous pouvons observer dans le coin inférieur gauche du cliché une différence de comportement qui provient certainement du fait qu'il s'agit d'un amas au lieu de particules isolées. L'analyse des déclins de fluorescence met en évidence un comportement bi-exponentiel avec une durée de vie courte de 0,35 ns et une seconde plus longue de 1,6 ns. Ces résultats viennent corroborer ceux obtenus lors des mesures de durée de vie de fluorescence en solution (§ 2.1.4.). Nous ne retrouvons pas la plus petite durée de vie de fluorescence (0,05 ns) car la limite de résolution du FLIM est de l'ordre de 0,15 ns.

2.1.7. Conclusion sur le CMONS cristallin inséré en coquilles silicatées

Les mesures spectroscopiques ont montré que le CMONS cristallin avait un comportement différent selon la matrice dans laquelle la nucléation et la croissance confinée du cristal avaient eu lieu. Ces données sont venues également corroborer les résultats obtenus dans le chapitre II § 3.3.4 par diffraction électronique qui avait permis de définir les formes cristallines du CMONS présentes au cœur des particules. Il a ainsi été confirmé que dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE, nous étions en présence de CMONS sous la forme cristalline (c) et pour la matrice 8 TMOS + 1 BTP, il y avait coexistence des polymorphes (a) et (b).

2.2. Caractérisation spectroscopique de fluorescence à un photon de nanoparticules de COPVB en coquille silicatée

Le COPVB est la seconde molécule que nous avons testée. Elle présente des propriétés de fluorescence à un et deux photons très intéressantes. Nous avons donc étudié les propriétés de fluorescence des nanoparticules de COPVB [28, 29] afin de les comparer ensuite à celles du CMONS.

2.2.1. Estimation de la concentration molaire des solutions en COPVB

Nous avons appliqué le même procédé de mise en suspension aqueuse que pour les nanoparticules contenant du CMONS (§ 2.1.1.). Comme pour le CMONS, une estimation de la concentration des solutions finales a été faite en se basant sur le coefficient d'extinction molaire du COPVB et l'absorbance des solutions. Les spectres d'absorption des nanoparticules sont traités comme dans le cas du CMONS en enlevant la contribution due la diffusion de la lumière (§ 2.1.1.). Afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire du COPVB, l'absorbance de plusieurs solutions de COPVB dissous dans le THF à des concentrations connues a été mesurée à $\lambda_{abs.}$ = 440 nm. D'après la loi de Beer-lambert (voir annexe VIII), nous avons pu remonter au coefficient d'extinction molaire du COPVB : $\boldsymbol{\varepsilon_{COPVB} = 50000\ M^{-1}.cm^{-1}}$ qui correspond à celui donné dans la littérature [29]. Nous avons ensuite comparé les spectres d'absorption du COPVB selon qu'il soit dispersé dans le THF ou sous une forme cristalline au cœur d'une coquille silicatée.

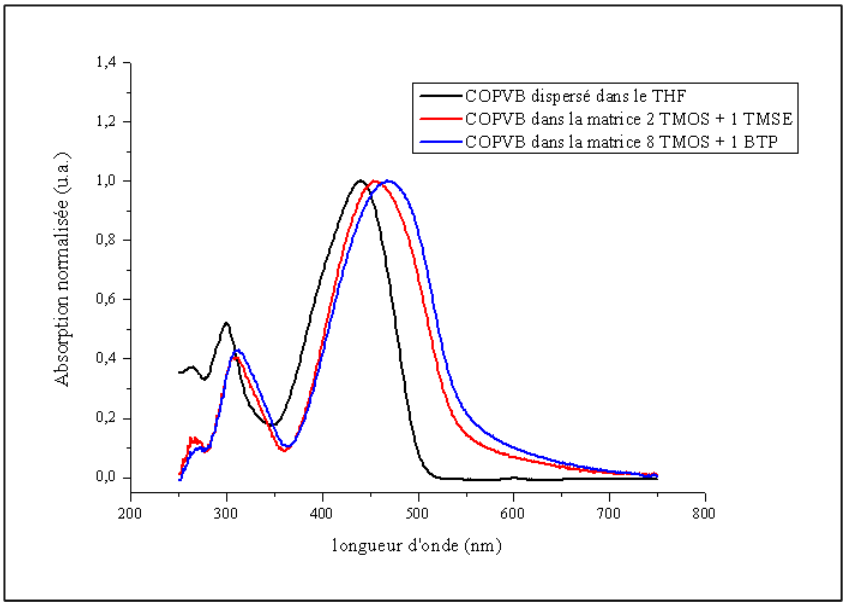


Figure 15 - Spectres d'absorption normalisés du COPVB dissous dans le THF (noir), le COPVB cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE en suspension dans l'eau (rouge) et le COPVB cristallin dans la matrice 8 TMOS + 1 BTO en suspension dans l'eau (bleu).

La figure 15 montre que le COPVB a comportement en absorbance relativement identique selon qu'il soit dissous dans le THF où inséré dans les matrices silicatées. Les spectres sont composés de deux bandes, la principale aux alentour de λ = 440 nm caractéristique de la molécule et une seconde bande vers λ = 300 nm qui correspond à l'absorption des cycles aromatiques présents dans la molécule. L'insertion du COPVB dans une matrice silicatée entraine un léger décalage vers le rouge des spectres d'absorptions ainsi qu'un léger élargissement du spectre. Le décalage et l'élargissement du spectre sont plus important dans le cas de la matrice 8 TMOS + 1 BTP, ce qui est certainement dû aux interactions pouvant exister entre les oxygènes de la chaine PEG contenue dans le BTP et les fonctions cyano du fluorophore. Cependant, nous pouvons considérer que le COPVB a un comportement stable quelque soit son état (dissous en solution ou cristallisé). Le coefficient d'extinction molaire reste donc identique : $\varepsilon_{COPVB} = 50000\ M^{-1}.cm^{-1}$.

2.2.2. Impact de la matrice silicatée sur la fluorescence du COPVB

Dans le cas du CMONS, nous avons pu observer que la nature de la matrice silicatée impactait non seulement la cristallisation du CMONS mais aussi ses propriétés spectroscopiques. Nous avons donc souhaité voir si l'on observait aussi une modification des spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence à un photon du COPVB selon la

nature de la matrice silicatée ou à l'état dissous dans le dichlorométhane [29] ou encore dans une matrice pluronique obtenue dans le cadre de la thèse de M. Maurin au laboratoire de Spectroscopie Physique de Grenoble [28]. Les spectres d'émission ont été mesurés à λ = 460 nm, figure 16.

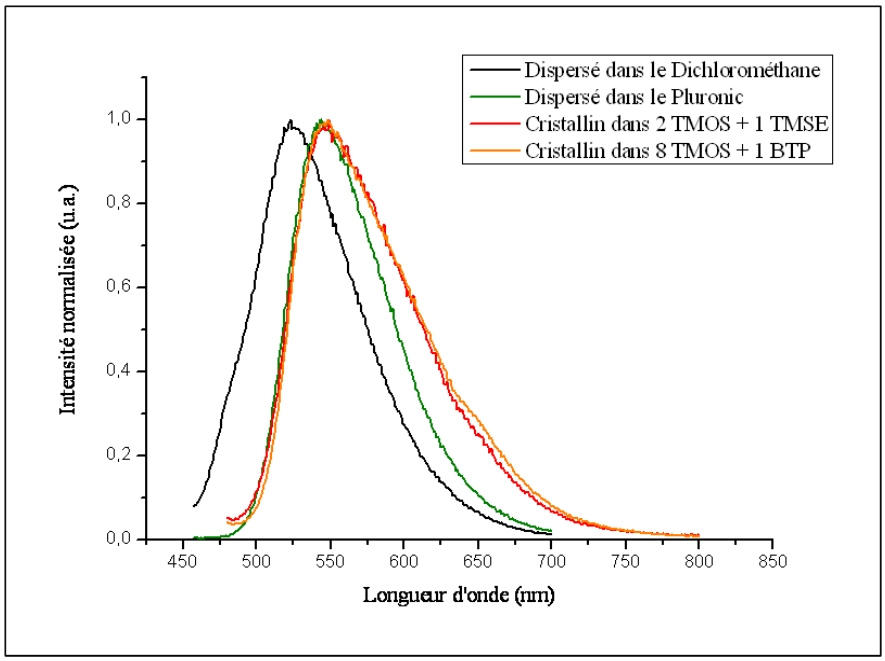


Figure 16 - Spectres d'émission λ = 460 nm du COPVB encapsulé dans deux types de matrices silicatées : 2 TMOS + 1 TMSE (rouge) et 8 TMOS + 1 BTP (orange), à l'état dispersé dans le dichlorométhane (noir) et dans le pluronique (vert).

Le COPVB semble être modérément affecté par son environnement chimique. Certes, comme nous pouvons le voir sur la figure 16, l'allure des spectres d'émissions de fluorescence est sensiblement identique que le COPVB soit à l'état dissous dans le dichlorométhane (noir – figure 16), semi-dispersé dans une matrice pluronique (vert – figure 16) ou encore cristallin dans les nanoparticules silicatées (rouge et orange – figure 16). Le fait d'encapsuler le COPVB entraîne un décalage vers le rouge du spectre de fluorescence. Nous remarquons aussi un léger élargissement des spectres pour le COPVB encapsulé dans une matrice silicatée. Ceci peut venir du fait que le COPVB est dans ce cas à l'état cristallin contrairement au COPVB dispersé dans le pluronique.

2.2.3. Estimation du rendement quantique moléculaire du COPVB encapsulé en matrice sol-gel

Afin d'estimer les rendements quantiques moléculaire du COPVB cristallin selon la nature de la matrice silicatée, nous avons utilisé le même protocole expérimental que celui utilisé dans le cas du CMONS (§ 2.1.3).

	Pente	$\Theta_{référence}$	$\Theta_{estimé}$
Rhodamine 6G	73,36	0,9	-
2 TMOS + 1 TMSE	2	-	0,025
8 TMOS + 1 BTP	2,85	-	0,035

Tableau 7 - Estimation des rendements quantiques du COPVB selon la matrice silicatée.

Nous pouvons voir nettement sur le tableau 7 que les rendements quantiques du COPVB sont relativement faibles quelle que soit la matrice silicatée. Cependant, le rendement quantique du COPVB à l'état dissous dans le dichlorométhane est encore plus faible 0,015 [29]. L'encapsulation dans une matrice silicatée ainsi que la cristallisation a permis d'augmenter le rendement quantique moléculaire du fluorophore. De plus, comme dans le cas du CMONS, les valeurs obtenues sont des estimations portant sur le rendement quantique moléculaire, dans notre cas le fluorophore est sous sa forme cristalline. La présence de ce cœur cristallin nous assure une grande quantité de molécule et donc une très forte section efficace d'absorption conférant normalement une forte fluorescence aux nanoparticules.

2.2.4. Durée de vie de fluorescence des nanoparticules de COPVB

Afin de compléter les données spectroscopiques, nous avons mesuré les durées de vie de fluorescence du COPVB dans les deux types de matrices silicatées : 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP. Nous avons pu voir qu'en ce qui concerne les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ainsi que les rendements quantiques, la nature de la matrice silicatée n'avait pratiquement aucun effet. Cette série de mesures nous a ainsi permis de confirmer ce fait.

	Corrélation Tri-exponentielle					
	$\tau_{1\ (ns)}$	$\%_1$	$\tau_{2\ (ns)}$	$\%_2$	$\tau_{3\ ns)}$	$\%_3$
2 TMOS + 1 TMSE	3,51	24	1,62	57	0,58	20
8 TMOS + 1 BTP	3,53	18	1,29	50	0,42	32

Tableau 8 - Impact de la matrice silicatée sur les durées de vie de fluorescence du CMONS.

Le tableau 8 montre qui n'y a pas de différences importantes entre les durées de vie de fluorescence du COPVB selon la matrice silicatée utilisée. Dans les deux cas, le déclin de fluorescence est tri-exponentiel avec trois durées de vie de fluorescence très différentes : l'une supérieure à 3 ns, la deuxième de l'ordre de 1,5 ns et la dernière beaucoup plus courte aux alentours de 0,5 ns. Nous remarquons dans le cas de la matrice 8 TMOS + 1 BTP que la proportion de la durée de vie de fluorescence la plus longue décroît en faveur de la plus courte. Ceci est certainement dû au léger élargissement observé sur le spectre d'absorption, figure 26. A l'état dispersé, il a été déterminé que le COPVB avait une durée de vie de fluorescence mono-exponentielle de l'ordre de 0,074 ns [29] et lorsqu'il est est inséré dans une matrice pluronique, les durées de vie de fluorescence ont alors un comportement bi-exponentiel avec 0,345 ns et 1,187 ns [28]. Ces différences par rapport au comportement du COPVB encapsulé dans une matrice silicatée peuvent provenir du fait que le COPVB est à l'état dispersé dans les nanoparticules de pluronique et cristallisé dans les nanoparticules silicatées.

2.2.5. Fluorescence et section efficace d'absorption à deux photons des nanoparticules de COPVB

Tout d'abord, l'émission de fluorescence à deux-photons des solutions à $\lambda_{excitation}$ = 800 nm avec une puissance laser de 50 mW et un temps d'acquisition de 1 seconde a été mesurée pour les deux types de nanoparticules en solution à l'aide d'un laser accordable Sa:Ti femtosecondes (annexe IX), figure 17-a. Nous retrouvons les mêmes allures de spectres d'émission de fluorescence que lors des mesures à un photon avec un décalage des spectres selon le type de matrice silicatée utilisée (§ 2.2.2.). Le COPVB cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE présente un maximum d'émission à 549 nm alors qu'en matrice 8 TMOS + 1 BTP son maximum de fluorescence est à 548 nm. Les deux solutions ont des comportements identiques, ce qui corrobore les précédentes mesures

spectroscopiques où l'on a pu voir que la matrice silicatée n'impactait pas les propriétés du COPVB.

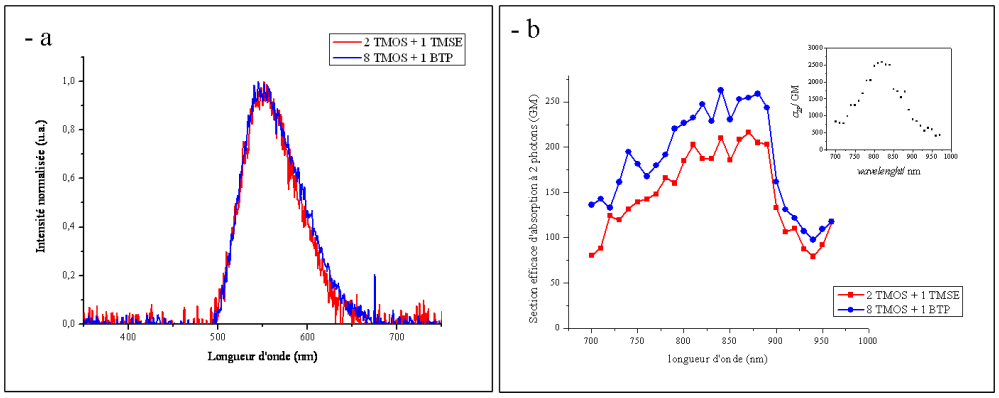


Figure 17 – (a) Spectres d'émission de fluorescence à 2-photons à $\lambda_{excitation}$ = 800 nm et (b) mesure de la section efficace d'absorption à deux photons du COPVB cristallin dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE (rouge) et 8 TMOS + 1 BTP (bleu).

	Concentration estimée (mol/L)	σ_{TPA} (GM)
2 TMOS + 1 TMSE	$6{,}6.10^{-6}$	270
8 TMOS + 1 BTP	$1{,}1.10^{-5}$	220

Tableau 8 – Estimation des concentrations et de la section efficace d'absorption à 2 photons.

Dans un second temps, nous avons estimé la section efficace d'absorption molaire à deux-photons (σ_{TPA}) des solutions en faisant varier la longueur d'onde d'excitation du laser entre 700 et 950 nm par pas de 10 nm. La concentration des solutions a été estimée en utilisant les coefficients d'extinction molaire déterminés précédemment (§ 2.2.1.) et leur absorbance maximale à un photon, tableau 8. La figure 17-b montre que la section efficace d'absorption à deux-photons du COPVB reste inchangée quelle que soit la matrice. L'écart existant peut provenir des approximations faites auparavant pour déterminer à la fois la concentration molaire des solutions et le rendement quantique de fluorescence, pour lesquels nous nous sommes basés sur un état moléculaire alors que le fluorophore est cristallisé. Cependant, on peut voir que la section efficace d'absorption du COPVB dispersé est 10 fois plus importante (2500 GM) [28]. Ceci peut être dû au fait que dans les nanoparticules le COPVB est cristallin, ce qui est confirmé également par les durées de

vies de fluorescence qui augmentent lorsque le COPVB est confiné dans la matrice silicatée (§ 2.2.4).

2.2.6. Conclusion sur le COPVB cristallin dans les coquilles silicatées

Nous avons pu voir que les propriétés de fluorescence du COPVB n'étaient pas influencées par la nature de la matrice silicatée encapsulant le fluorophore cristallisé. Il a pu également être mis en évidence une différence de comportement entre le COPVB à l'état dispersé et celui à l'état cristallin. Ceci confirme la présence d'un cœur organique cristallin au cœur des nanoparticules. Malheureusement, il semble que l'efficacité de fluorescence à 2-photon soit nettement plus faible dans l'état cristallin ($\sigma_{TPA} \approx 220 - 270$ GM) que dans l'état moléculaire dispersé ($\sigma_{TPA} \approx 2500$ GM) [28].

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu voir que pour obtenir des solutions de nanoparticules stables colloïdalement, il était nécessaire de passer par une étape de dispersion en milieu alcalin. Cette étape permet non seulement de charger en surface les particules mais aussi de dissocier les amas de nanoparticules formés lors de la nébulisation et du stockage dans le filtre électrostatique. Ceci nous permet d'obtenir des solutions stables colloïdalement sur une large gamme de pH comprise entre $5 < pH < 12$ et sur plusieurs mois. Au niveau de la fluorescence, nous avons pu remarquer que le CMONS était fortement influencé par son environnement : polymorphe cristallin ou dispersé en solution. Ceci est donc venu conforter les observations effectuées dans le chapitre II § 3.3.4 suite aux mesures en diffractions électronique. En ce qui concerne le COPVB, il est beaucoup moins sensible à la nature de la matrice silicatée. Son comportement spectroscopique reste inchangé. Les mesures à deux photons ont mis en évidence que les deux fluorophores avaient des comportements similaires quelle que soit la matrice silicatée et que les efficacités de fluorescence à 2 photons n'étaient pas très élevées. Il est donc envisageable d'utiliser ces deux produits *in-vivo* pour de premiers tests d'imagerie par fluorescence laser excitée à deux-photons, quelle que soit la nature de la coquille sol-gel.

Bibliographie

1. Moghimi, S. M. and Hunter, A. C., *Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups.* Pharmaceutical Research, 2001. **18**(1): p. 1-8.
2. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C., *Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice.* Pharmacological Reviews, 2001. **53**(2): p. 283-318.
3. Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J., *Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.* Environmental Health Perspectives, 2005. **113**(7): p. 823-839.
4. Malvern, *Automated protein characterizationwith the MPT-2 autotitrator.* Application note
5. Malvern, *Théroie de DLVO.* Application note.
6. Duddeck, H., *Carbon-C13 nuclear magnetic resonance spectra -steric repulsion and intramolecular interaction of subtituents in 4 subtituted adamanta-2,6-diones* Tetrahedron, 1983. **39**(8): p. 1365-1369.
7. Jindal, S. P., Sohoni, S. S., and Tidwell, T. T., *Steric effects in bicyclic ring systems 2 angle strain and non-bonding repulsion in base-catalysed deuterium exchange of bicyclic ketones* Tetrahedron Letters, 1971(11): p. 779-&.
8. McIntosh, T. J., Magid, A. D., and Simon, S. A., *Steric repulsion between phosphatidylcholine bilayers* Biochemistry, 1987. **26**(23): p. 7325-7332.
9. Peschel, G. and Belouschek, P., *Experimental separation of electrosatic and steric repulsion effects in thin aqueous-electrolyte layers between 2 solid-surfaces* Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Frankfurt, 1977. **108**(2): p. 145-156.
10. Hu, L., *Etude de nouveaux procédés de greffage de polymères biocompatibles sur des nanoparticules d'oxyde de fer - Intérêt de la voie micro-onde.* Thèse de Doctorat, Univ. de Bourgogne, 2009.
11. Buurma, N. J., Blandamer, M. J., and Engberts, J., *General-base catalysed hydrolysis and nucleophilic substitution of activated amides in aqueous solutions.* Journal of Physical Organic Chemistry, 2003. **16**(8): p. 438-449.
12. Grignondubois, M., Dunogues, J., and Calas, R., *Influence of ring size on electrophilic substitution of cycloalkyltrimethylsilanes - synthesis of cycloalkydimethylfluorosilanes* Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie, 1980. **58**(3): p. 291-295.
13. Heller, J. H., Freeborn, J. F., and Wilkins, D. J., *Effect of radio-frequency fields on zeta-potential of a colloidal suspension.* Nature, 1963. **197**(487): p. 997-&.
14. Hunter, R. J., *The use of zeta-potential in characterizing transport processes in colloidal dispersions* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1982. **184**(SEP): p. 41-COLL.
15. McFadyen, P., *Electrophoretic mobility and zeta-potential of colloidal particles* American Laboratory, 1987. **19**(4): p. 64-&.
16. Parker, A. and McFadyen, P., *Advances in zeta potential and size measurement of colloidal particles* American Laboratory, 1990. **22**(13): p. 34-35.
17. Sennett, P. and Olivier, J. P., *Colloidal dispersions electrokinetic effects and concept of zeta potential* Industrial and Engineering Chemistry, 1965. **57**(8): p. 32-&.
18. Tsypin, N. V. and Simkin, E. S., *Electronic device for measurement zeta-potentials of colloidal particles* Zavodskaya Laboratoriya, 1973. **39**(8): p. 1030-1030.

19. Dubuisson, E., Monnier, V., Sanz-Menez, N., Boury, B., Usson, Y., Pansu, R.B., Ibanez, A., *Brilliant molecular nanocrystals emerging from sol-gel thin films: towards a new generation of fluorescent biochips.* Nanotechnology, 2009. **20**(31): p. 315301.
20. Monnier, V., *PCT/FR2008/0504901D-595*. 2008.
21. Boeck, E. and Valeur, B., *Invitation à la fluorescence moléculaire*. 2004.
22. Sanz, N., *Elaboration, caractérisation structurale et etude des propriétés optiques linéaires et non linéaires de nanocristaux organiques en matrice sol-gel*. 2000.
23. Sanz, N., Baldeck, P. L., Nicoud, J. F., Le Fur, Y., and Ibanez, A., *Polymorphism and luminescence properties of CMONS organic crystals: bulk crystals and nanocrystals confined in gel-glasses.* Solid State Sciences, 2001. **3**(8): p. 867-875.
24. Treussart, F., Botzung-Appert, E., Ha-Duong, N. T., Ibanez, A., Roch, J. F., and Pansu, R., *Second harmonic generation and fluorescence of CMONS dye nanocrystals grown in a sol-gel thin film.* Chemphyschem, 2003. **4**(7): p. 757-760.
25. Treussart, F., Brasselet, S., Zyss, J., Roch, J. F., Sanz, N., Baldeck, P. L., and Ibanez, A., *Photoluminescence from a single organic nanocrystal embedded in a sol-gel thin film.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2001. **221**: p. 345-PHYS.
26. Martini, M., Montagna, M., Ou, M., Tillement, O., Roux, S., and Perriat, P., *How to measure quantum yields in scattering media: Application to the quantum yield measurement of fluorescein molecules encapsulated in sub-100 nm silica particles.* Journal of Applied Physics, 2009. **106**(9).
27. Shen, Y. Z., Jakubczyk, D., Xu, F., Swiatkiewicz, J., Prasad, P. N., and Reinhardt, B. A., *Two-photon fluorescence imaging and spectroscopy of nanostructured organic materials using a photon scanning tunneling microscope.* Applied Physics Letters, 2000. **76**(1): p. 1-3.
28. Maurin, M., Vurth, L., Vial, J. C., Baldeck, P., Marder, S. R., Van der Sanden, B., and Stephan, O., *Fluorescent Pluronic nanodots for in vivo two-photon imaging.* Nanotechnology, 2009. **20**(23).
29. Pond, S. J. K., Rumi, M., Levin, M. D., Parker, T. C., Beljonne, D., Day, M. W., Bredas, J. L., Marder, S. R., and Perry, J. W., *One- and two-photon spectroscopy of donor-acceptor-donor distyrylbenzene derivatives: Effect of cyano substitution and distortion from planarity.* Journal of Physical Chemistry A, 2002. **106**(47): p. 11470-11480.

Chapitre IV :

Conception de traceurs biologiques

Introduction **159**
1. Tests préliminaires : nanoparticules dans des systèmes biologiques **159**
1.1. Développement cellulaire en présence de nanoparticules 160
1.2. Stabilité colloïdale dans le sang de souris 162
2. Application *in-vivo* : test d'angiographie cérébrale **164**
2.1. Méthode d'observation 164
2.2. Préparation des animaux 165
2.3. Visualisation de la microvascularisation 166
2.3.1. COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE 166
2.3.2. COPVB encapsulé dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP 168
2.4. Conclusion 169
3. Modification de surface des nanoparticules : application *in-vitro* et augmentation de la furtivité *In-vivo* **169**
3.1. Intéraction biotine-stréptavidin 170
3.1.1. Synthèse de nanoparticules aminées (NP-NH_2) 171
3.1.1.1. Mode opératoire 171
3.1.1.2. Mesure du potentiel zêta 172
3.1.1.3. Test avec des billes de latex-streptavidine 173
3.2. Ciblage des intégrines αvβ3 par des nanoparticules fonctionnalisées par un peptide RGD 175
3.2.1. Synthèse de nanoparticules thiolées (NP-SH) 176
3.2.1.1. Mesure potentiel zêta 177
3.2.1.2. Tests d'interactions NP-RGD-integrines αvβ3 178
3.2.2. Conclusion 180
3.3. Réaction de pégylation des nanoparticules 180
3.3.1. Couplage de PEG sur les NP-SH 181
3.3.2. Premières observations 182
3.3.3. Perspectives 184
Conclusion **184**

Bibliographie **185**

Introduction

Les nanoparticules obtenues par notre procédé de nébulisation sont de bonnes candidates pour des applications de traceurs biologiques *in-vitro* ou *in-vivo*. En effet, la fluorescence à 1 ou 2 photons du cœur organique cristallin permet d'envisager de fortes intensités de fluorescence et de moduler la longueur d'onde d'émission en modifiant le fluorophore utilisé. De plus, la coquille silicatée est biocompatible et aisément fonctionnalisable. Dans ce chapitre, nous allons, dans un premier temps, effectuer des analyses préliminaires caractérisant le comportement des nanoparticules dans des milieux ou des systèmes biologiques :

- Une étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules dans du sang de souris afin de déterminer la faisabilité d'une injection dans le flux sanguin de l'animal.
- L'influence sur le développement de culture cellulaire en présence de nanoparticules afin de vérifier le caractère non toxique des particules.

Dans un deuxième temps, nous analyserons le comportement in vivo des nanoparticules, dans une souris, après injection dans le flux sanguin. Enfin, nous détaillerons des développements en fonctionnalisation de surface des nanoparticules permettant de greffer des biomolécules pour des applications de ciblage *in vitro* et *in vivo* ou permettant d'augmenter les propriétés de furtivité des nanoparticules pour des applications futures. Le fluorophore sélectionné pour ces études est le COPVB, afin de comparer les performances de nos nanoparticules avec les résultats obtenus par le groupe MOTIVE sur cette molécule incorporée dans un polymère biocompatible [1].

1. Tests préliminaires : nanoparticules dans des systèmes biologiques

Avant tout test *in-vivo*, il est primordial de passer par une étape de caractérisation *in-vitro* des solutions de nanoparticules. Nous avons donc procédé à des tests sur culture cellulaire afin d'étudier l'impact des nanoparticules sur le développement cellulaire. Il a été également effectué des hémocultures, ce qui nous a permis d'étudier la stabilité colloïdale des nanoparticules dans le sang de la souris avant des futures injections dans le flux sanguin de l'animal.

1.1. Développement cellulaire en présence de nanoparticules

Dans un premier temps, les nanoparticules ont été testées dans un milieu cellulaire afin d'étudier leur impact sur le développement des cellules. L'expérience consiste à comparer le développement cellulaire en absence et en présence de nanoparticules afin de déterminer si l'injection de nanoparticules dans le milieu de culture provoque un accroissement de la mortalité des cellules. Cette étude préliminaire nous indiquera la faisabilité d'utiliser ces particules comme traceur *in-vitro* sans influencer le développement de la culture cellulaire (taux de mortalité) et d'injecter les nanoparticules *in vivo*.

Les cellules utilisées pour ce test sont issues de la lignée HeLa. Leur culture a été effectuée en incubateur dans un milieu nutritif composé d'eau, de sels minéraux, de glucose, d'acides aminés, d'acide gras et à pH = 7,4, contrôlé par la présence d'un indicateur coloré : le rouge de phénol. Les boîtes de Pétrie ont été placées dans l'incubateur à 37°C sous une atmosphère très humide, 84 – 85%, et à teneur en CO_2 contrôlée, 5%. Le milieu nutritif est changé tous les deux / trois jours. Deux boîtes de culture cellulaires ont été préparées : une boite témoin et une boite test. Dans la boite témoin, les cellules ont été mises en incubation dans 1 mL de milieu nutritif, en absence donc de nanoparticules. Dans la deuxième boîte de culture, nous avons ajouté en plus 200 µL de solution de nanoparticules. Ce volume correspond à une concentration en particules supérieure ou égale à celle nécessaire pour réaliser des expériences de ciblage *in-vivo*. Les cultures cellulaires ont été ensuite incubées durant 3 jours. Le milieu nutritif a été ensuite éliminé et les cultures cellulaires ont été rincées à l'aide de sérum physiologique. Les cultures ont été observées au microscope optique en transmission, afin d'estimer le taux de mortalité des cellules, et en fluorescence, afin de visualiser la présence ou l'absence de nanoparticules dans le milieu après rinçage.

L'observation en transmission des cultures nous a permis de visualiser l'aspect des cellules et dénombrer le taux de mortalité. Les cellules vivantes sont caractérisées par une forme ovoïde et adhérent sur le fond de la boîte de Pétri alors que les cellules mortes se sont décollées de la surface et forment des sphères. La figure 1 met en parallèle la culture sans nanoparticules (figure 1–a) et celle incubée avec 200 µL de nanoparticules en solution (figure 1–b). Une analyse statistique du nombre de cellules mortes a mis en évidence que dans les deux cas le taux de mortalité était de 9 %. La présence de nanoparticules dans le milieu nutritif n'a donc pas perturbé le développement cellulaire.

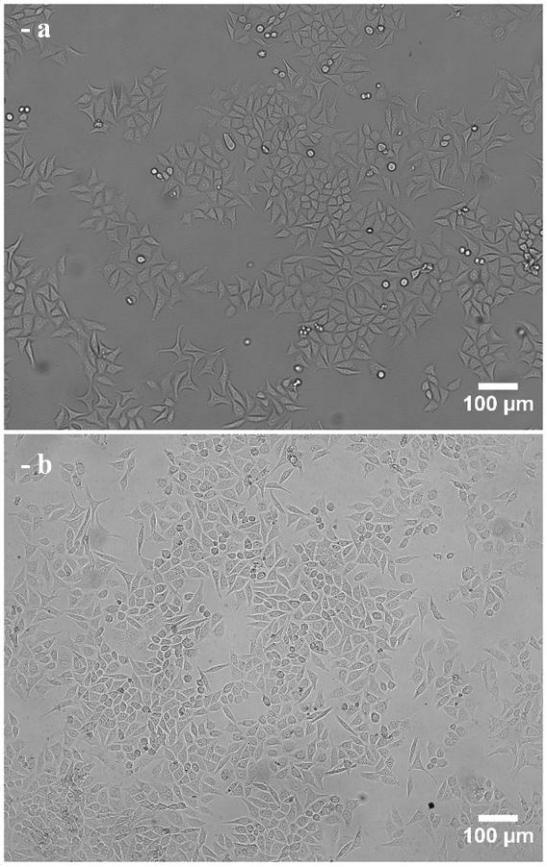


Figure 1 - Clichés de microscopie optique en transmission grossissement x10 : (a) culture cellulaire témoin et (b) culture cellulaire incubée avec 200 µL d'une solution de nanoparticules.

La culture effectuée en présence de nanoparticules a ensuite été observée en fluorescence afin de visualiser si les particules se sont agrégées, ont adhérées aux cellules ou si les cellules ont internalisées les nanoparticules, Figure 2.

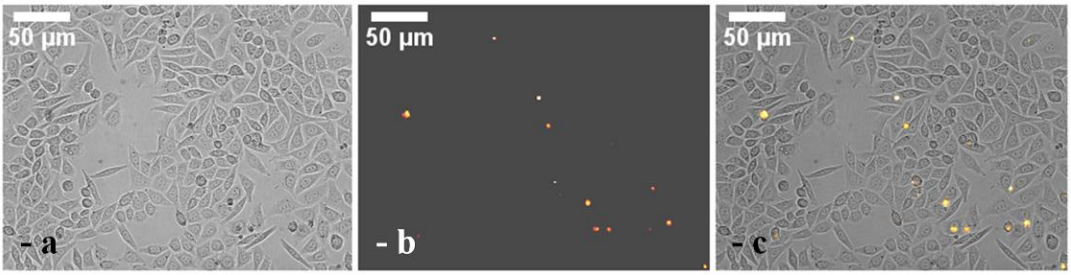


Figure 2 - Clichés au microscope optique de la culture cellulaire incubée avec des nanoparticules grossissement x 10 : (a) en transmission, (b) en fluorescence en couleur arbitraire et (c) superposition du cliché en transmission et en fluorescence.

L'étape de rinçage élimine en quasi-totalité les nanoparticules, indiquant l'absence de précipitation des particules dans le milieu de culture et l'absence d'adhésion non spécifique des particules sur la surface des cellules. Des traces de fluorescence ont été observées dans les cellules mortes alors que nous n'avons pas observé de fluorescence au niveau des cellules vivantes. La présence de nanoparticules au sein des cellules mortes peut venir de deux paramètres :

- Lorsque les cellules meurent, elles se décollent pour se recroqueviller, elles emprisonnent alors un peu de milieu nutritif et par là même des nanoparticules en suspension.
- Les cellules internalisent les nanoparticules ce qui provoque leur mort.

Afin de déterminer l'origine de la présence des nanoparticules dans les cellules mortes, nous avons observé les cellules encore vivantes. Aucun signal de fluorescence sur ces cellules n'est observé. Ceci signifie donc que les cellules n'internalisent pas les nanoparticules avant de mourir. La présence de nanoparticules dans les cellules mortes est donc due à l'emprisonnement d'un peu du liquide de culture.

La présence des nanoparticules dans le milieu biologique ne perturbe donc pas le développement cellulaire car le taux de mortalité est identique en présence ou non de particules et il est apparu que les cellules ne les internalisent pas. Ce résultat préliminaire indique la possibilité d'une utilisation de ces particules comme agent de marquage *in-vitro ou in-vivo* de cibles exprimées à la surface de cellules, après fonctionnalisation.

1.2. Stabilité colloïdale dans le sang de souris

Avant d'envisager des expériences d'angiographie nécessitant l'injection des nanoparticules dans le flux sanguin d'un animal, il est important de vérifier la stabilité colloïdale des nanoparticules dans le sang, *in-vitro*.

Un peu de sang de souris a été prélevé et conditionné dans de l'héparine pour éviter tout risque de coagulation. Afin de définir le volume de nanoparticules à injecter dans le sang, nous avons recréé les conditions expérimentales lors des tests d'imagerie in-vivo chez le petit animal. Le volume sanguin total d'une souris est de 2 mL. Il est primordial de ne pas trop augmenter ce volume sous peine de provoquer une hémorragie. Le volume injecté ne doit pas dépasser 10% du volume total. Nous avons donc appliqué ces conditions pour

procéder au test de stabilité colloïdale des particules dans le sang. Pour reproduire les conditions des futurs tests sur le petit animal, le lot a été fractionné en deux :

- Test en présence de nanoparticules COPVB encapsulées dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE : 100 µL de sang + 10 µL de solution de nanoparticules à une concentration de COPVB moléculaire estimée (chapitre III, § 2.2.1) à environ 10^{-4} mol/L
- Test en présence de nanoparticules COPVB encapsulées dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP : 100 µL de sang + 10 µL de solution de nanoparticules d'environ 10^{-4} M.

Après avoir injecté les solutions de nanoparticules dans le sang, des gouttes ont été déposées sur des lames de verre afin d'observer au microscope optique les échantillons. Étant donné que la résolution du microscope optique est de 200 nm et que les nanoparticules ont des diamètres inférieurs à 100 nm, nous n'avons pas observé en transmission les échantillons. Les observations ont été effectuées directement en mode fluorescence afin d'observer si le signal de fluorescence est continu au sein de la goutte de sang, démontrant ainsi une bonne stabilité colloïdale, ou s'il y a floculation des nanoparticules et formation d'amas fortement fluorescents.

Les tests effectués sur des nanoparticules constituées de deux matrices silicatées différentes ont donné les mêmes résultats. En effet, lorsqu'on a observé sous fluorescence les gouttes de sang, nous avons pu remarquer que le signal de fluorescence était diffus dans toute la goutte, comme le montre la figure 3. Le bord de goutte montre une démarcation franche entre le sang présentant une fluorescence verte et le support non fluorescent (coin supérieur gauche de la figure 3).

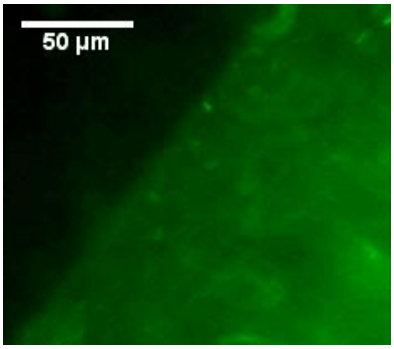


Figure 3 - Cliché au microscope optique en fluorescence du bord d'une goutte de sang contenant des nanoparticules fluorescentes.

Au cours de 3h d'observation, il n'a y pas eu formation d'amas. Les deux types de nanoparticules sont donc stables colloïdalement dans le sang en régime statique. Cela indique la faisabilité d'une injection de ce type de nanoparticules dans le flux sanguin de la souris, sans problème d'agrégation.

2. Application *in-vivo* : test d'angiographie cérébrale

Les nanoparticules, préalablement caractérisées structuralement, spectroscopiquement et dont le comportement en milieu biologique a été étudié, ont été injectées dans la circulation sanguine de la souris afin d'imager, *in-vivo,* la microvascularisation corticale par fluorescence excitée à 2-photons, sous balayage laser [2, 3].

2.1. Méthode d'observation

La microscopie à deux photons est réalisée à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 7 MP, figure 4. Le principe est le suivant : le laser pulsé femtoseconde centré autour de 800 nm à 26% de sa puissance est focalisé dans le cerveau de la souris par un objectif à eau de grandissement 20. La fluorescence n'étant générée qu'au niveau du volume focal du laser, toute la fluorescence émergeant du tissu est collectée par l'objectif et directement dirigée sur des photomultiplicateurs, avec sélection spatiale de la fluorescence par un diaphragme comme dans le cas de la microscopie confocale. Le balayage du faisceau excitateur dans le plan x-y est réalisé par la rotation de miroirs galvanomètriques et permet d'obtenir une image de 512 par 512 pixels en 1 seconde : chaque pixel de l'image correspond donc à la lumière collectée pour une position donnée du laser excitateur. La translation motorisée de l'objectif permet la variation de la profondeur d'observation et l'acquisition de piles d'images séparées d'un pas réglable (de 0,1 à plusieurs microns). La puissance incidente d'excitation peut être modulée manuellement au cours de l'acquisition. Notamment la puissance est augmentée avec la profondeur d'exploration pour compenser l'atténuation par le tissu traversé des lumières d'excitation et d'émission.

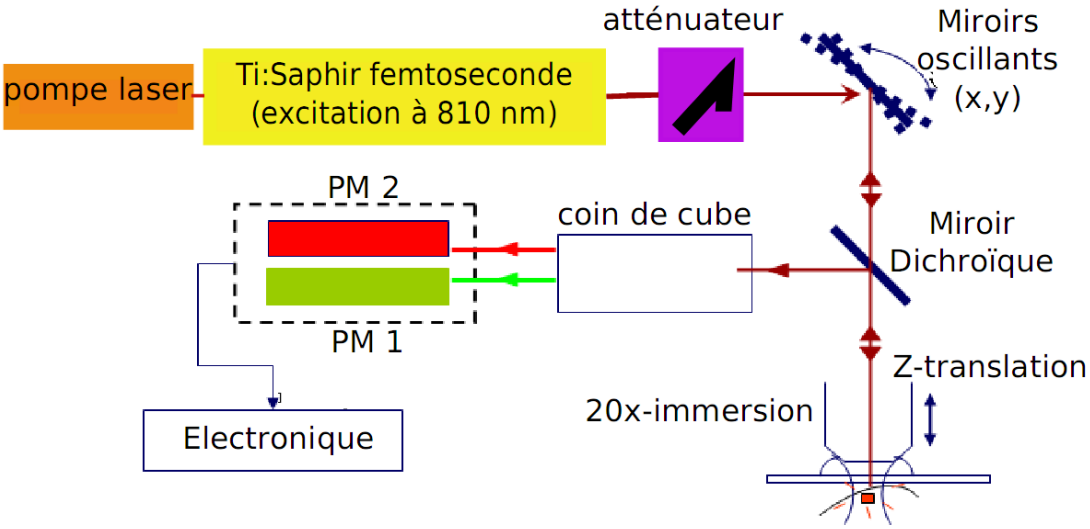


Figure 4 - Schéma du dipositif de microscopie biphotonique [3].

2.2. Préparation des animaux

Afin d'observer la microsvascularisation du cortex cérébral de la souris, il est nécessaire de passer par un acte de chirurgie pour enlever un peu de la calotte crânienne car il n'est pas possible d'observer la fluorescence des nanoparticules au travers de celle-ci.

Les souris sont anesthésiées par un gaz, l'isofluorane, qu'elles inhalent à travers un masque facial avec un mélange de protoxyde d'azote (NO_2, 70 %) et d'oxygène (O_2, 30 %). La concentration d'isofluorane est de 5 % pour l'induction de l'anesthésie et de 1,5 % ensuite pendant l'opération et l'observation. Une craniotomie de 3 mm de diamètre est réalisée au-dessus du cortex. Le cortex ainsi exposé est protégé par une solution saline de sérum physiologique [3].

Les souris sont ensuite placées sous le microscope de sorte que la partie rendue émergente du cortex cérébral se situe sous l'objectif, Figure 5. Pendant les observations, leur température corporelle est contrôlée par une circulation d'eau chaude sous leur corps tout en maintenant l'anesthésie. Une fois les souris positionnées, les nanoparticules sont injectées par une veine de la queue à raison d'un volume de 200 µL à l'aide d'un catéther préalablement fixé. Les observations sont faites quelques minutes après l'injection des nanoparticules.

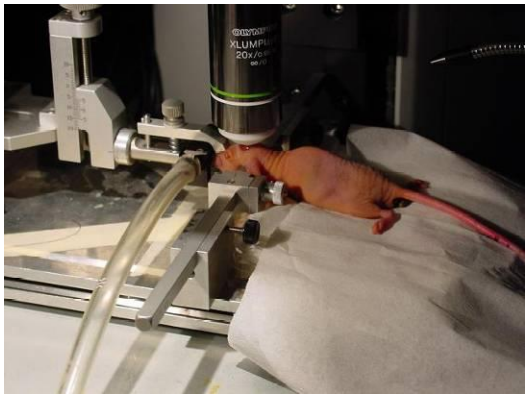


Figure 5 - Photo d'une souris placée sous le microscope [3].

2.3. Visualisation de la microvascularisation

Pour ces tests, nous avons utilisé deux suspensions colloïdales de nanoparticules :

- COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE.
- COPVB encapsulé dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP.

Dans les deux cas, les suspensions colloïdales ont été filtrées à 100 nm et concentrées au maximum, environ 10^{-4} mol/L de COPVB moléculaire, afin d'avoir une très forte concentration en nanoparticules dans les 200 µL injectés. De plus, il a été ajouté avant l'injection du chlorure de sodium à raison de 0,9 g/L afin de ne pas créer un choc osmotique entre la solution injectée et le sang (risque d'explosion des globules rouge).

2.3.1. COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE

Une suspension colloïdale concentrée de COPVB encapsulé dans une matrice silicatée 2 TMOS + 1 TMSE a été injectée dans des souris. Les souris ont résisté à l'injection et n'ont montré aucun signe de stress post-injection. Cependant, aucune fluorescence n'a été détectée au niveau du cortex cérébral. Il semblerait que les nanoparticules ne circulent pas dans l'organisme et qu'elles soient rapidement stockées par l'organisme dans les organes filtrants. Afin de vérifier cette hypothèse, une autopsie a été effectuée suite à l'euthanasie des souris. Nous avons alors observé les organes filtrant : les reins et le foie.

Les organes ont été déposés dans une solution saline de sérum physiologique et observés au microscope biphotonique. Le microscope permet de découpler l'image en trois canaux afin

de collecter les données dans trois zones du spectre : rouge, bleu et vert. Ceci va permettre de séparer l'autofluorescence des tissus de la fluorescence propre aux nanoparticules. Les nanoparticules émettent à 550 nm, leur fluorescence est donc observable dans les canaux vert et rouge, alors que l'autofluorescence des tissus se situe majoritairement dans le bleu et un peu dans le vert et le rouge. En faisant la somme des trois images obtenues dans chaque canal, nous pourrons mettre en évidence la présence des nanoparticules qui apparaîtront en vert / rouge alors que l'autofluorescence des tissus sera en blanc.

L'observation du foie, Figure 6, a montré que les nanoparticules ont marqué les tissus de cet organe. Elles ont donc été détectées comme corps étranger, filtrées et stockées dans le foie.

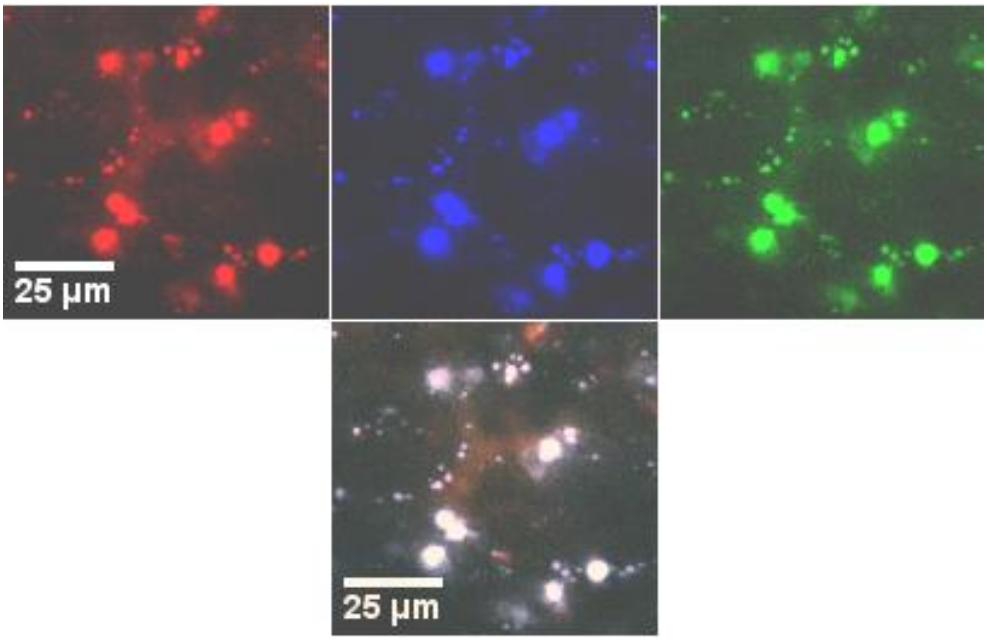


Figure 6 - Clichés d'une tranche de foie observée au microscope sous excitation biphotonique collectés dans trois canaux : rouge, bleu et vert, puis sommés en un seul cliché.

D'autre part, l'observation du rein, figure 7, a mis clairement en évidence la présence d'une très forte concentration en nanoparticules. Les nanoparticules y sont regroupées sous forme d'amas très fluorescents.

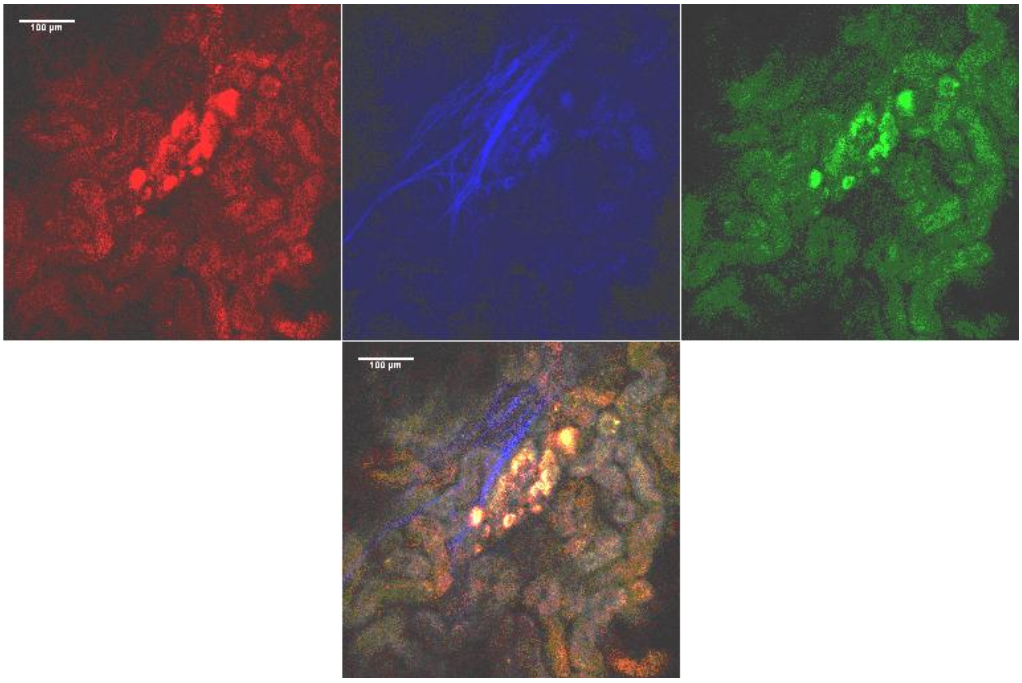


Figure 7 - Clichés d'une tranche de rein observée au microscope sous excitation biphotonique collectés dans trois canaux : rouge, bleu et vert, puis sommés en un seul cliché.

Les nanoparticules avec une coquille silicatée 2 TMOS + 1 TMSE ne semblent donc pas être furtives dans l'organisme. Elles sont très rapidement détectées comme corps étranger et envoyées vers les organes filtrant, les reins et le foie en vue de leur élimination. Cependant, les nanoparticules présentent un fort signal de fluorescence ce qui est encourageant pour les prochains essais.

2.3.2. COPVB encapsulé dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP

Les polymères hydrophiles et flexibles de type polyéthylèneglycol (PEG) sont connus pour empêcher les protéines de s'adsorber à leurs surfaces. Lorsque ces chaînes PEG sont greffées sur des nanoparticules, elles augmentent donc la furtivité des particules en diminuant les adsorptions non spécifiques dans le milieu biologique. La matrice 8 TMOS + 1 BTP contient de courtes unités PEG insérées dans la matrice silicatée. Malgré la courte longueur de ces chaines pégylées et le fait qu'elles soient insérées et non émergentes sur les particules, cette matrice pourrait avoir un comportement plus furtif en milieu biologique.

Dans un second temps, nous avons donc injecté une suspension colloïdale concentrée de COPVB encapsulé dans une matrice 8 TMOS + 1 BTP. Plusieurs injections ont été

effectuées sur différentes souris. A chaque fois, nous n'avons pas pu observer un signal de fluorescence au niveau du cerveau des animaux. La présence de courtes chaînes PEG insérées au cœur de la coquille silicatée n'a pas permis d'augmenter la furtivité des particules. Suite à leur injection dans le système vasculaire du petit animal, elles sont détectées comme corps étranger et envoyées vers les organes filtrant comme dans le cas précédent.

2.4. Conclusion

L'injection des nanoparticules dans le flux sanguin des souris ne provoque pas d'effets néfastes sur le comportement vital de la souris. Cependant, Il n'a pas été possible d'observer la micro-vascularisation du cortex cérébral à l'aide du COPVB encapsulé dans une coquille silicatée. Nous avons pu voir que quelle que soit la nature de la matrice sol-gel, les nanoparticules, une fois injectées dans le réseau sanguin, sont détectées comme corps étrangers et sont stockées dans l'organisme au niveau des organes filtrants tels que le foie et les reins. Il est donc impératif d'augmenter la furtivité des particules afin de rendre possible l'imagerie du système sanguin à l'aide de ce type de traceur. Le greffage de polymères de types polyéthylèneglycol, à la surface de la matrice silicatée, devrait permettre d'atteindre cet objectif. La fluorescence des nanoparticules stockées dans les reins et le foie est bien détectée ce qui est prometteur pour les futurs tests une fois que le problème de furtivité sera contourné.

3. Modification de surface des nanoparticules : application *in-vitro* et augmentation de la furtivité *In-vivo*

La voie de fonctionnalisation des nanoparticules silicatées la plus répandue est la réaction de silanisation [4-16]. Elle consiste à faire réagir un alcoxyde de silicium portant un groupement chimique fonctionnel (NH_2, COOH, SH…) [4, 14-16] sur les groupements silanol présents à la surface des nanoparticules silicatées. Cette modification de la chimie de surface permet de greffer un grand nombre de molécules apportant les différentes fonctionnalités désirées (propriété de furtivité *in-vivo*, biomolécule, agent de ciblage, agent de complexation de métaux, molécule issue de l'ingénierie moléculaire…) [17-19, 6, 7, 9, 20-24]. La richesse de la fonctionnalisation des nanoparticules silicatées a permis le développement d'applications variées de ces nano-objets dans des domaines très vastes tels que la science des matériaux, les dispositifs optiques, l'imagerie, les senseurs chimiques ou

biologiques, les biotechnologies… Ces modifications de surface ouvrent aussi la porte vers la synthèse de matériaux polyfonctionnels.

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps démontrer la faisabilité d'obtention de nanoparticules fonctionnalisées grâce à un modèle très répandu : l'interaction biotine-stréptavidine [25, 26]. Ensuite nous avons réalisé le greffage d'un agent de ciblage, le RGD, protéines portant un motif Arg-Gly-Asp, reconnaissant spécifiquement des intégrines alpha v beta3 (αvβ3), récepteurs transmembranaires surexprimées dans les cellules cancéreuses[17-19, 21, 23, 24]. Enfin, nous avons commencé à jeter les premières bases afin de rendre possible le greffage de chaînes pégylées émergentes à la surface des nanoparticules afin d'augmenter la furtivité des nanoparticules une fois injectées dans le vivant pour permettre, à l'avenir, d'imager en profondeur la micro-vascularisation du cortex cérébral de la souris [4, 27, 6-9, 22].

3.1. Intéraction biotine-stréptavidine

La biotine (ou vitamine B_8) est une vitamine hydrosoluble aussi connue sous le nom de vitamine H (figure 8). Cette vitamine possède une très forte affinité avec la stréptavidine, protéine tétramère. La constante de dissociation (Kd) du complexe biotine-stréptavidine est de l'ordre de $\sim 1\times10^{-15}$ mol/L, se classant parmi les plus fortes interactions non-covalentes (liaisons hydrogènes) connues dans la nature [25, 26].

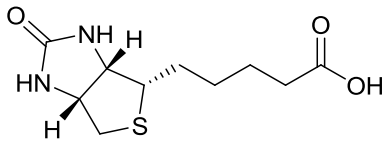


Figure 8 - Structure de la biotine.

Nous avons greffé de la biotine sur les nanoparticules en deux étapes : une silanisation des nanoparticules par le 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) permet l'obtention de nanoparticules possédant des fonctions amines en surface (NP-NH_2, (1) figure 9). La biotine sous forme de l'ester activé de la N-hydroxysuccinimide biotine (biotine-NHS) est ensuite greffée de manière covalente par liaison amide sur les nanoparticules aminées (NP-biotine, (2) figure 9).

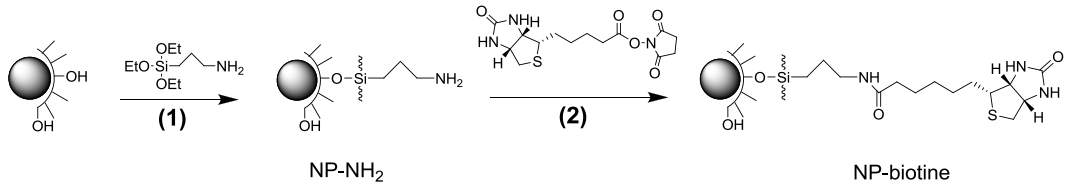


Figure 9 - Synthèse de nanoparticules biotinylées (NP-biotine) via la formation de nanoparticules aminées (NP-NH_2).

3.1.1. Synthèse de nanoparticules aminées (NP-NH_2)

Le greffage de l'APTES sur des nanoparticules silicatées est très souvent utilisé dans la littérature pour fonctionnaliser des nanoparticules. Cependant, dans la plupart des cas, cette réaction s'effectue dans un solvant organique (toluène…) [4, 10, 13, 15]. Dans notre cas, l'enjeu est de pouvoir réaliser cette réaction en milieu aqueux car le cœur organique des nanoparticules risque de se dissoudre si l'on travaille avec des volumes important en solvants organiques.

3.1.1.1. Mode opératoire

Nous avons fait réagir 5 ml d'une solution de nanoparticules de type COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE, préalablement dispersées dans l'eau à une concentration molaire en COPVB avoisinant 10^{-5} M, avec 55,6 µl d'une solution diluée d'APTES (SIGMA) à 5.10^{-3} M durant 3 h. L'APTES étant peu soluble dans l'eau, la solution diluée de cet alcoxyde de silicium a été préparée dans le méthanol. La petite quantité de méthanol introduite dans le milieu est insuffisante pour dissoudre le cœur organique des nanoparticules. La réaction s'effectue à température ambiante, en catalyse légèrement acide, pour cela 500 µl l'acide acétique à 10 mM sont additionnés au mélange réactionnel, Figure 10.

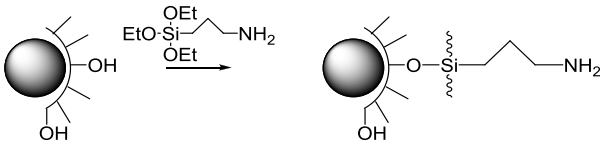


Figure 10 - Réaction dans l'eau en catalyse légèrement acide, pH = 4 - 5, entre les nanoparticules et l'APTES durant 3 h.

Au bout de 3h, la réaction est stoppée par centrifugation : 10.000 tours / minutes durant 10 minutes puis le dépôt est lavé, redispersé dans de l'eau désionisée puis centrifugé une

nouvelle fois afin d'éliminer l'APTES n'ayant pas réagi. Cette opération est répétée 5 à 6 fois. Les nanoparticules NP-NH_2 sont ensuite mises en suspension dans de l'eau et stockées à l'abri de la lumière.

3.1.1.2. Mesure du potentiel zêta

La réaction de silanisation par l'APTES est analysée par la mesure du potentiel zêta des nanoparticules ainsi qu'en DLS afin de mesurer les modifications des charges de surfaces des nanoparticules résultant du greffage de l'APTES et mesurer les variations des diamètres hydrodynamiques engendrées par cette modifications de surface. En effet, suite au greffage des fonctions amines sur les silanols de surface, les charges de surfaces doivent évoluer et la stabilité colloïdale doit être modifiée. Les nanoparticules de départ présentaient un potentiel zêta ξ compris entre -35 mV et -45 mv et un diamètre hydrodynamique moyen $\Phi_{hydro\ moy}$ = 90 nm dans une gamme de pH allant de 6 à 11, voir chapitre III. 1.3. La même étude de mesure de potentiel zêta en fonction du pH est réalisée sur les nanoparticules aminées (NP-NH_2). Le pH a été modifié à l'aide d'acide chlorhydrique dilué et de soude.

La figure 11 montre que le potentiel zêta des particules NP-NH_2 est fortement différent de celui mesuré sur les nanoparticules de départ. Le potentiel zêta mesuré se situe à environs 0 mV, en accord avec les données de la littérature [4, 10, 13, 15], sur toute la gamme de pH mesurée, ce qui nous indique une modification profonde de la chimie de surface des particules.

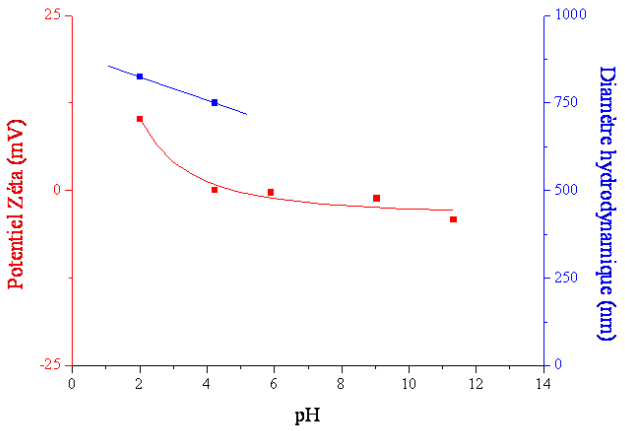


Figure 11 - Evolution du potentiel zêta (rouge) et du diamètre hydrodynamique (bleu) d'une solution de nanoparticules aminées (NP-NH_2) en fonction du pH.

L'absence de charge en surface démontre une instabilité colloïdale des particules aminées, évoquée dans la littérature, qui est confirmée par la mesure des tailles des particules en suspension. Des tailles supérieures à 700 nm ont été observées, Figure 15, indiquant la formation d'amas de particules. Les particules se sont agglomérées en raison de leurs charges de surface extrêmement faibles. Les solutions ont été ensuite observées au MEB où l'on a pu voir nettement cet effet d'agglomération des petites particules, figure 11. Cependant, malgré cette instabilité connue des NP-NH_2, il est possible de continuer la fonctionnalisation de ces particules, en utilisant des particules aminées fraîchement préparées et dispersées par ultrasons juste avant la réaction de couplage avec une biomolécule.

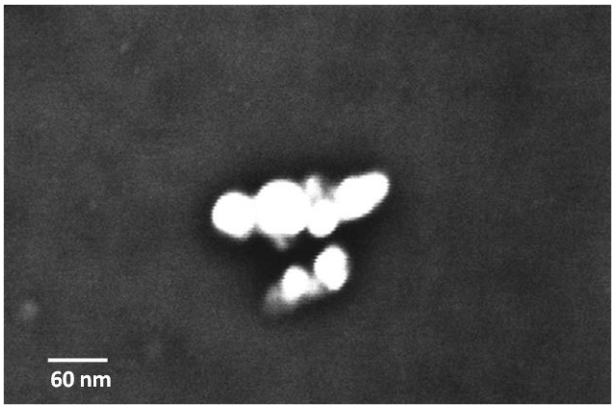


Figure 12 - Cliché MEB d'un amas nanoparticules fonctionnalisées par l'APTES.

3.1.1.3. Test avec des billes de latex-streptavidine

La réaction de couplage entre la biotine-NHS et les nanoparticules aminées (NP-NH_2) [25, 26] est effectuée sur des particules NP-NH_2 fraichement préparées et dispersées par ultrasons, figure 13.

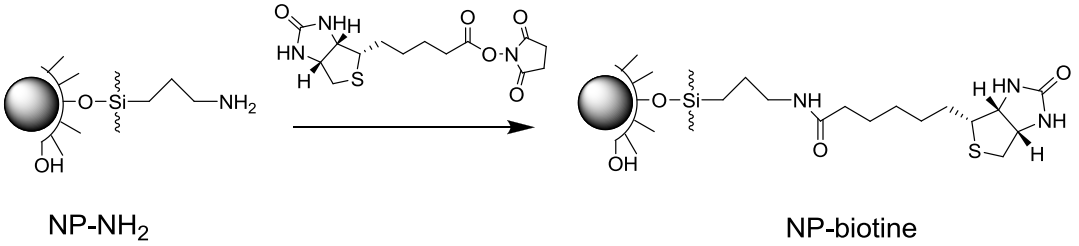


Figure 13 - Réaction de greffage de la biotine sur les nanoparticules aminées (NP-NH_2).

Une solution de 2 mg de biotine-NHS dans le DMF est préparée juste avant son utilisation. A 1 ml de solution aqueuse de nanoparticules aminées (NP-NH_2) fraîchement préparée et

dispersée aux ultrasons pendant 15 minutes, est additionné 100 µl de la solution de biotine-NHS. La solution est incubée pendant 2 heures à température ambiante. Les nanoparticules sont isolées par centrifugation (1000 tours/min, 10 min). Le dépôt est lavé, redispersé dans de l'eau désionisée puis centrifugé une nouvelle fois afin d'éliminer la biotine-NHS n'ayant pas réagi. Les nanoparticles biotinylées (NP-biotine) sont enfin redispersées dans 500 µL d'eau à l'aide d'ultrasons.

L'interaction entre les NP-biotine et la stréptavidine se fait à l'aide de billes de latex fonctionnalisées en surfaces par de la stréptavidine, achetée chez SIGMA (suspension 1% dans du PBS à pH 7.1, en présence de 2 mM de NaN_3). 20 µL de la suspension de billes de latex-streptavidine sont dispersées dans 300 µL d'eau, centrifugées et dispersées dans 1 mL d'eau, dans un tube Eppendorf. 250 µL de la solution de NP-biotine sont additionnés et la solution est incubée 1h30 à température ambiante. La solution est centrifugée à 4000 tours/min pendant 5 minutes (conditions de centrifugation permettant aux billes de latex de tomber au fond de l'Eppendorf mais préservant la dispersion des nanoparticules en solution). Le surnageant est éliminé et les billes de latex sont lavées, dispersées dans de l'eau désionisée puis centrifugées une nouvelle fois. Les billes de latex sont enfin dispersées dans 500 µL d'eau désionisée avant analyse.

Les billes de latex sont observées au microscope, en mode fluorescence. Afin d'être sûr que la fluorescence des billes de latex résulte uniquement de l'interaction entre les NP-biotine et la stréptavidine, un témoin négatif a été réalisé en mettant en contact des NP-NH_2 avec des billes de latex stréptavidine, en absence de biotine, figure 14.

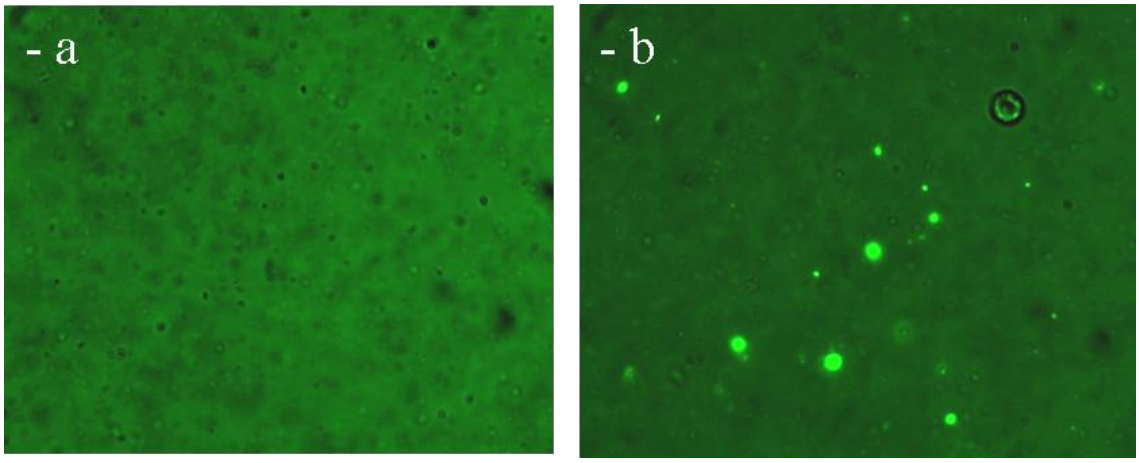


Figure 14 - test avec des billes latex-streptavidin : (a) en présence de NP-NH_2 et (b) en présence de NP-biotine.

Les NP-NH_2, en absence de biotine, figure 14-a, n'adhère pas au billes de latex. Celles-ci ne sont donc pas fluorescentes après l'étape de rinçage. Il n'y a pas d'interactions non spécifiques entre les nanoparticules et les billes de latex-stréptavidine. Par contre, comme le montre le cliché figure 14-b, les billes de latex mises en contact avec des NP-biotine, sont fluorescentes. Il semble donc bien que les NP-biotine soient venue interagir avec les stréptavidines à la surface des billes de latex rendant celles-ci fluorescentes

Nous avons donc mis en évidence un greffage fonctionnel de la biotine sur les nanoparticules aminée (NP-NH_2) et démontré ainsi la présence d'interactions efficaces entre les NP-biotine et la stréptavidine [25, 26].

3.2. Ciblage des intégrines αvβ3 par des nanoparticules fonctionnalisées par un peptide RGD

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires permettant des interconnections cellule-cellule et cellule-protéine de la matrice extracellulaire. À ce jour on connaît plus de 20 intégrines différentes. Plusieurs de ces intégrines lient des protéines portant un motif Arg-Gly-Asp (ou RGD) telles que la fibronectine, le fibrinogène, etc. La fonction cellulaire de ces récepteurs semble assez vaste puisqu'ils seraient impliqués dans la prolifération, la croissance, la migration et la différenciation [17-19, 23, 24]. La métastase cancéreuse fait intervenir une succession d'événements de migration cellulaire et de protéolyse de la matrice conduisant à l'invasion des tissus sains par les cellules tumorales. Ce processus complexe implique la participation de molécules d'adhésion, telles que les intégrines surexprimées à la surface des cellules cancéreuses [28, 20, 22].

Dans cette partie nous allons imager en fluorescence l'interaction entre des intégrines (de type αvβ3) surexprimée par des cellules de gliome et des nanoparticules fonctionnalisées par un peptide de type RGD [28, 20, 22]. Le greffage du peptide sur la surface des nanoparticules se fait en deux étapes. Une silanisation des nanoparticules par le 3-(mercaptopropyl)-triméthoxysilane (MPS) permettant l'obtention de nanoparticules possédant des fonctions thiols en surface (NP-SH), (1) figure 15. Le peptide est ensuite couplé sur les NP-SH à l'aide d'un agent de couplage, (2) figure 15.

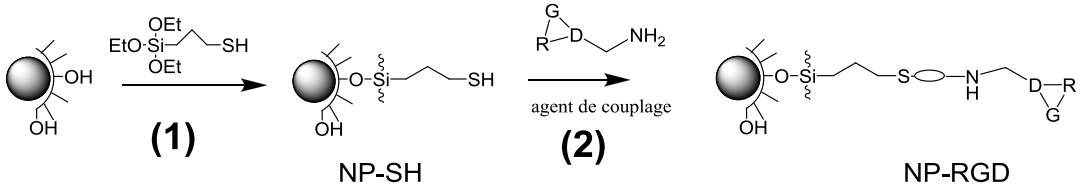


Figure 15 – Schéma général de synthèse de la fonctionnalisation des nanoparticules par un peptide RGD.

3.2.1. Synthèse de nanoparticules thiolées (NP-SH)

Comme dans le cas de la modification de surface par l'APTES, la réaction avec la 3-(mercaptopropyl)-triméthoxysilane (MPS) doit être réalisée en phase aqueuse afin d'éviter de dissoudre le cœur cristallin organique des nanoparticules [14, 16]. Le mode opératoire est légèrement modifié par rapport à la réaction avec le 3-aminopropyl-triéthoxysilane (APTES).

Nous avons fait réagir 5 ml d'une solution de nanoparticules de type COPVB encapsulé dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE, préalablement dispersées dans l'eau, avec 50,5 µl d'une solution diluée de MPS (SIGMA) à 5.10^{-2} M durant 6 h. Comme dans le cas de l'APTES, le volume de méthanol introduit dans la solution est limité. La réaction s'effectue à température ambiante, en catalyse légèrement basique, pH compris entre 8 et 9. Pour cela nous ajoutons au milieu réactionnel 500 µl de NaOH à 10^{-2} M en contrôlant le pH au pH-mètre, Figure 16.

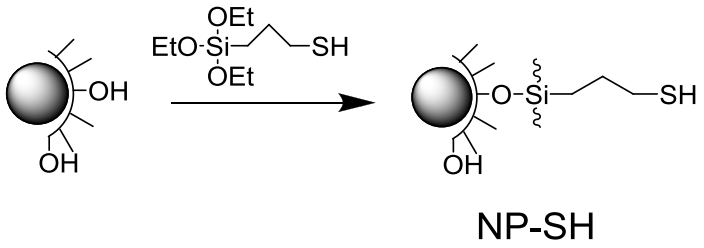


Figure 16 - Réaction dans l'eau en catalyse légèrement basique, pH = 8 - 9, entre les nanoparticules et le MPS durant 6 h.

Après 6 heures, la réaction est stoppée par centrifugation (10.000 tours/minutes durant 10 minutes). Le dépôt est lavé, redispersé dans de l'eau désionisée et centrifugé une nouvelle fois afin d'éliminer le MPS n'ayant pas réagi. Cette opération est répétée 5 à 6 fois. Les nanoparticules NP-SH sont ensuite mises en suspension dans de l'eau et stockées à l'abri de la lumière.

3.2.1.1. Mesure potentiel zêta

Comme dans le cas des NP-NH_2, les nanoparticules thiolées (NP-SH) sont analysées en mesurant le potentiel zêta ainsi qu'en PCS et comparées aux nanoparticules de départ. Nous avons, comme dans les cas précédent, mesuré ces paramètres en solutions en fonction du pH.

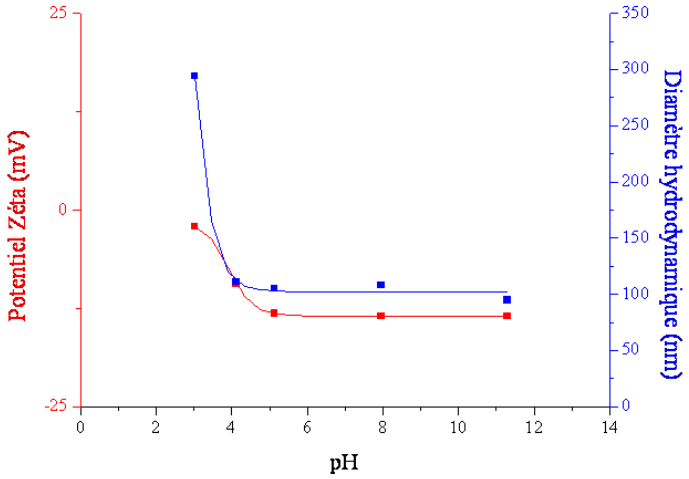


Figure 17 -Evolution du potentiel zêta (rouge) et du diamètre hydrodynamique (bleu) d'une d'une solution de nanoparticules thiolées (NP-SH) en fonction du pH.

La figure 17 montre que le potentiel zêta des particules NP-SH est différent de celui mesuré sur les nanoparticules de départ. Le potentiel zêta passe d'un potentiel compris entre –35 MV et -45 mV en milieu basique pour les particules non fonctionnalisées à - 15 mV dans une gamme de pH allant de pH = 11 à pH = 5 pour les NP-SH. Le diamètre hydrodynamique des NP-SH est stable aux alentours de 110 nm dans cette gamme de pH. L'augmentation du diamètre, suite à la silanisation, est due au greffage du MPS sur les nanoparticules et non à une agglomération. En effet, lorsque le pH avoisine pH = 4, nous observons une augmentation nette du diamètre des particules due à leur agglomération. Le potentiel zêta tend alors vers 0 mV entraînant donc une instabilité colloïdale et la précipitation des particules. La dispersion colloïdale des NP-SH semble être plus stable que la suspension colloïdale des NP-NH_2 en raison d'un potentiel zêta négatif résiduel dans le cas des NP-SH.

3.2.1.2. Tests d'interactions NP-RGD-integrines αvβ3

Le greffage de la protéine RGD sur les NP-SH est effectué grâce à l'agent de couplage bifonctionnel SMCC (4-(*N*-Maleimidométhyl)cyclohexanecarboxylic acid *N*-hydroxysuccinimide ester), permettant de relier la fonction thiol présent sur les NP-SH et une fonction amine primaire présent sur le peptide RGD utilisée, figure 18. Le peptide, synthétisé par la société Pierce est le peptide cyclo-[Arg-Gly-Asp-d-Phe-Lys(PEG-PEG)] (avec PEG = acide 8-Amino-3,6-Dioxaoctanoic), composé d'un cyclopeptide comportant l'unité RGD et une chaîne espaceur pegylée possédant une amine primaire terminale, permettant des réactions de couplage, sans modification de l'unité RGD [28, 20, 22].

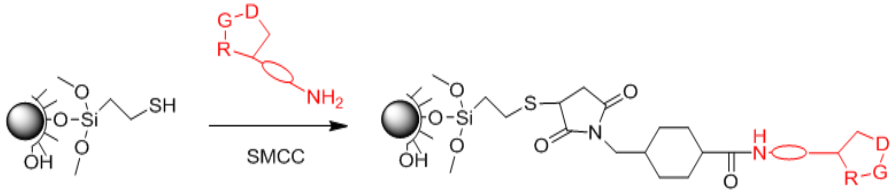


Figure 18 - Réaction de greffage du cyclopeptide-RGD sur les NP-SH en présence de SMCC.

Le couplage du RGD sur les nanoparticules thiolées s'effectue en deux temps. Il faut tout d'abord activer le RGD par le SMCC. Pour cela, nous avons dissous 10 mg de SMCC dans 10 ml d'eau. Comme le SMCC est peu soluble dans l'eau, 200 µl de DMF ont été ajoutés pour permettre une totale dissolution du composé. En parallèle, 5 mg de cyclopeptide-RGD ont été mis en solution dans 500 µl l'eau. Nous avons ensuite effectué un mélange 1/1 des deux solutions soit 100 µl de la solution de RGD additionnés à 100 µl de la solution de SMCC. Nous avons laissé la réaction d'activation du RGD se faire durant 2 h à température ambiante. Ensuite, 2 ml de nanoparticules thiolées (NP-SH) sont additionnées au mélange réactionnel. La solution est stockée au réfrigérateur à une température de 4 °C durant 24 h.

Les NP-RGD sont mises en incubation avec des cellules de type gliome U87MG sur-exprimant l'intégrine αvβ3 durant 1 h à 37°C sous 5% de CO_2. Après incubation, le surnageant est éliminé et les cultures cellulaires sont lavées puis observées au microscope en fluorescence pour visualiser si les NP-RGD ont ciblées les intégrines surexprimées par ce type cellulaire. Différent tests sont effectués en parallèle afin de déterminer le caractère spécifique de l'interaction NP-RGD avec les intégrines :

- Une cuve témoin : cellules U87MG seules dans 1 mL de milieu nutritif, figure 19–a.

- Cellules U87MG dans 1 mL de milieu nutritif + 100 µL de NP-SH, en absence de peptide RGD, figure 19–b.
- Cellules U87MG dans 1 mL de milieu nutritif + 100 µL NP-RGD, figure 19–c.
- Cellules U87MG dans 1 mL de milieu nutritif + 200 µL NP-RGD, figure 19–d.

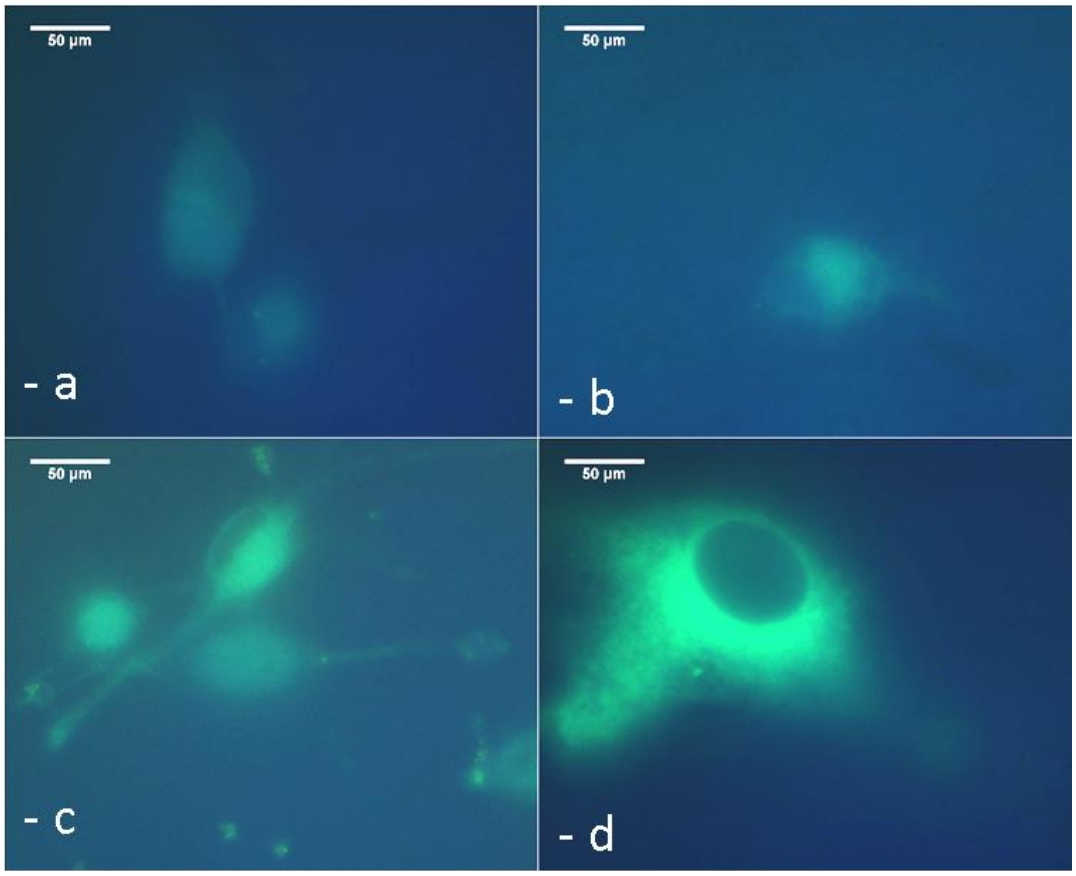


Figure 19 – Test sur cellules U87MG surexprimant l'intégrine αvβ3 : (a) cuve témoin, (b) en présence de NP-SH uniquement, (c) en présence de 100 µL de NP-RGD et (d) en présence de 200 µL de NP-RGD.

Les cellules U87MG mises en présence de NP-SH, c'est-à-dire en absence de RGD, sont faiblement marquées, figure 19-b, semblant indiquer la présence d'interactions non spécifiques entre les cellules et les nanoparticules. Le marquage des cellules en présence de NP-RGD est beaucoup plus important que pour les nanoparticules thiolées, indiquant le greffage fonctionnel du RGD sur les nanoparticules, figure 19-c et 19-d. Le contraste est d'autant plus important que la quantité de nanoparticules mises à incuber avec les cellules est importante, figure 19-d.

La diminution des interactions non spécifiques, figure 19-b, pourrait être obtenue par le greffage de polyéthylèneglycol à la surface des nanoparticules. Enfin, le remplacement de l'agent de couplage SMCC par le sulfo-SMCC (le sel de sodium 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylique acid 3-sulfo-*N*-hydroxysuccinimide ester), plus soluble dans l'eau devrait permettre d'augmenter l'efficacité du greffage des biomolécules sur les nanoparticules, sans ajout de DMF qui pourrait partiellement dissoudre le cœur cristallin de certain fluorophores.

3.2.2. Conclusion

La fonctionnalisation des nanoparticules par le MPS a permis d'obtenir des nanoparticules thiolées NP-SH, possédant une bonne stabilité colloïdale, bien meilleure que dans le cas des nanoparticules aminées NP-NH_2. D'autre part, les premiers tests avec le RGD sont très encourageants pour la suite. L'interaction entre les NP-RGD et des cellules surexprimant les intégrines à été mise en évidence, indiquant un couplage fonctionnel entre les NP-SH et le RGD.

3.3. Réaction de pégylation des nanoparticules.

La non-circulation des nanoparticules dans le flux sanguin, décrit au § 2.3, ainsi que les problèmes d'adsorption non spécifique décrits ci-dessus, nous indiquent la nécessité de modifier la chimie de surface des nanoparticules par des groupements polyéthylèneglycol, connue pour diminuer les interactions non spécifiques avec les entités biologiques.

Deux voies de synthèse sont envisagées pour greffer le PEG sur les nanoparticules. La première consiste à coupler un polyéthylèneglycol possédant une amine primaire terminale (PEG-NH_2) sur des nanoparticules thiolées (NP-SH), via un agent de couplage, (1) figure 20 [22]. La deuxième consiste en une réaction directe de silanisation sur les nanoparticules à l'aide d'un alcoxyde de silicium pegylé, (2) figure 20.

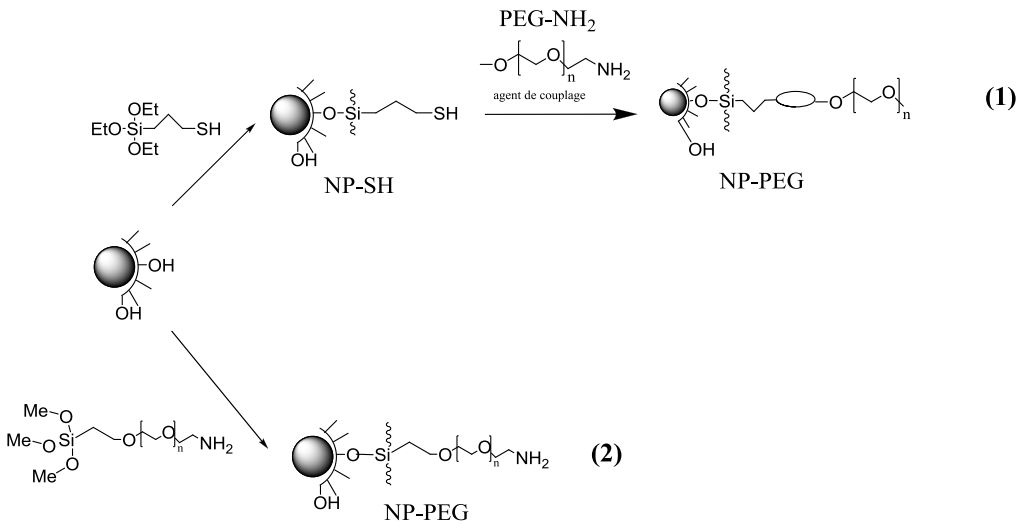


Figure 20 - Schéma de synthèse de nanoparticules pégylées : (1) via le couplage d'un polyéthylèneglycol gréffé sur des NP-SH. (2) via la silanisation des NP par un alcoxyde de silicium pégylée.

Dans le cadre de ce travail, nous avons commencé en fin de thèse à explorer la première voie de synthèse tandis que la silanisation directe sera développée prochainement au laboratoire.

3.3.1. Couplage de PEG sur les NP-SH

Pour ces premiers tests, nous avons sélectionné le sulfo-SMCC utilisé comme agent de couplage entre les NP-SH et le PEG-NH_2. Le polyéthylèneglycol utilisée est le O-(2-aminoethyl)-O'-méthylpolyethylèneglycol 750 de chez Sigma (PEG-NH_2). Les NP-SH sont des nanoparticules de type COPVB encapsulées dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE, préparées selon la méthode décrite au § 3.2.1. La réaction de couplage est réalisée en milieu tamponnée comme recommandé par le fabriquant (Aldrich) et selon les conditions usuelles, figure 21.

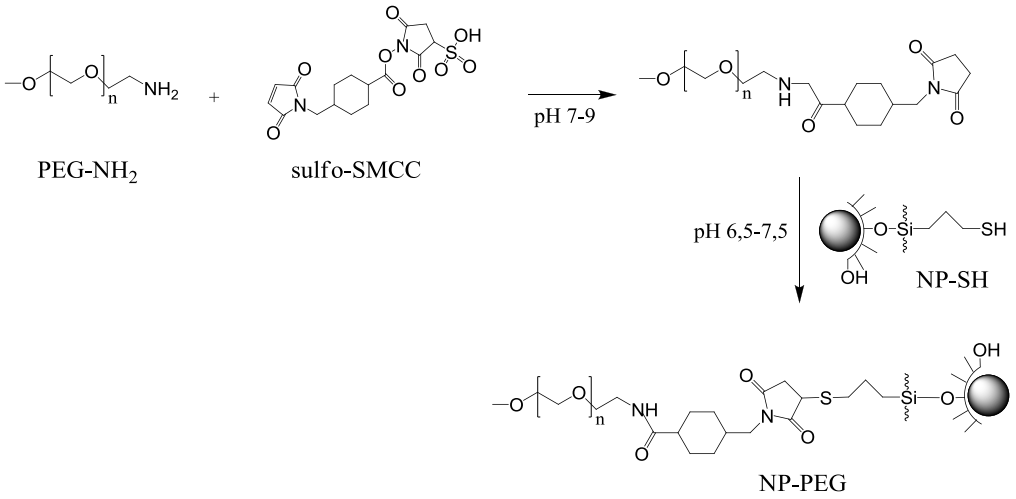


Figure 21 - Schéma de synthèse du couplage du PEG-NH_2 sur NP-SH via le sulfo-SMCC.

Dans un premier temps, le PEG-NH_2 est activé en présence de sulfo-SMCC, dans un tampon TRIS à pH 8.00. Le couplage entre le PEG-NH_2 activé et les NP-SH est alors réalisé dans un tampon PBS, pH = 7.2. Puis, 5 mg de PEG-NH_2 sont dissous dans 300 µl de tampon TRIS, on mélange ensuite cette solution à une solution contenant 5 mg de sulfo–SMCC dissous dans 1 ml de tampon TRIS. La réaction d'activation du PEG s'effectue à température ambiante durant 2 h.

Suite à cette première étape, nous avons additionné la solution de PEG-NH_2 activé dans 5 ml de NP-SH dispersées dans un tampon PBS de concentration inconnue. Nous avons fait varier le volume de solution de PEG activé : 500 µl, 250 µL, 100 µl et 20 µl. Les solutions sont laissées à incuber durant 3 à 4 h, à température ambiante. Les solutions sont ensuite centrifugées (10.000 tours/minute pendant 10 minutes) puis le dépôt est lavé avec de l'eau déionisée au moins 5 fois. Les particules sont ensuite redispersées dans l'eau pour être analysées.

3.3.2. Premières observations

Une première constatation a été faite suite à cette réaction de couplage. Lorsqu'on compare les solutions de départ à celles obtenues, nous avons pu voir une nette diminution de la coloration ainsi que de la fluorescence. Deux hypothèses ont été avancées :

- Une perte partielle de produit durant les lavages, soit dans le surnageant, soit sur les parois des tubes.

- Une extinction partielle de la fluorescence à cause de la mise en solution des particules dans le PBS.

Lors de l'observation des tubes utilisés par les centrifugations, nous n'avons pas constaté de fluorescence résiduelle sur les parois qui pourrait indiquer une perte partielle de produits lors des différentes étapes de lavage. De plus, les surnageants collectés au cours des différents lavages étaient limpides et ne présentaient pas un signal de fluorescence lors qu'on les observait sous lampe UV à 365 nm.

L'observation des nanoparticules au MEB, figure 22-a, a mis en évidence la présence d'une gangue autour des nanoparticules. Après une rapide analyse EDX, nous avons constaté que cette gangue était majoritairement constituée de sodium et de chlore, présent en grande quantité dans le PBS, figure 22-b.

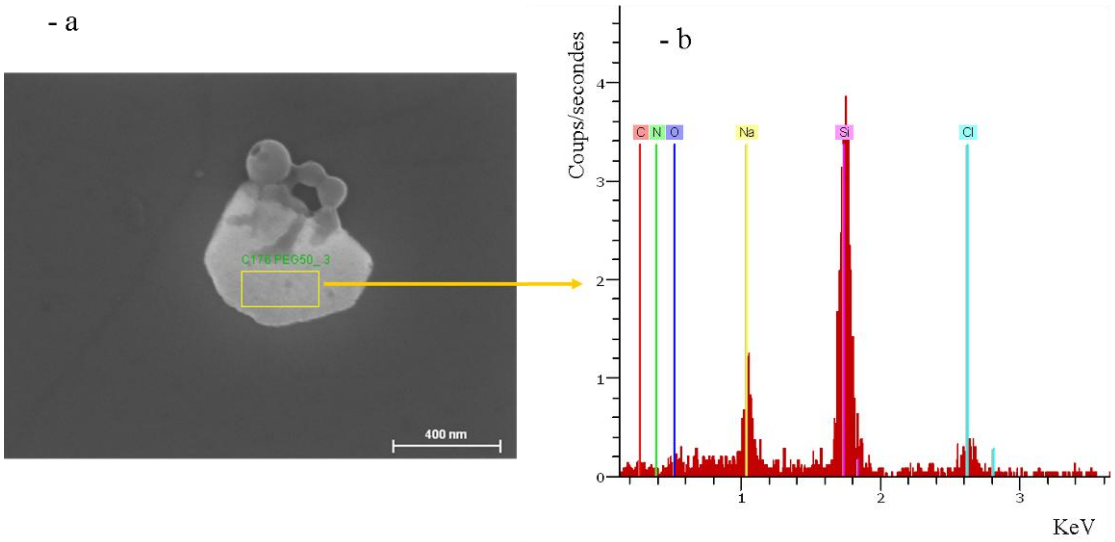


Figure 22 – (a) Cliché MEB de nanoparticules greffées PEG dans une gangue d'ions; (b) analyse EDX de la gangue

L'hypothèse avancée est que lors de la dispersion des nanoparticules dans le PBS, les ions présents dans le tampon viennent se fixer à la surface des particules. Une extinction partielle de la fluorescence des nanoparticules en présence de tampon PBS devra être vérifiée par des mesures d'absorbance et de fluorescence dans les milieux tamponnés. Il est dans ces conditions difficiles de déterminer si la réaction de couplage a effectivement été réalisée.

3.3.3. Perspectives

Pour la suite de cette étude, il serait préférable d'effectuer la réaction de couplage du PEG dans de l'eau au lieu des tampons PBS et TRIS afin d'éviter la présence de cette gangue ionique autour des particules.

Dans un second temps, la réaction de silanisation directe des NP par un alcoxyde de silicium pégylée sera développée. Cette voie de synthèse permettra d'effectuer en une seule étape le greffage d'une chaine PEG à la surface des nanoparticules sans passer par l'étape de fonctionnalisation des nanoparticules par le MPS.

Conclusion

Des tests préliminaires *in-vitro* des nanoparticules nous ont indiqué que les nanoparticules étaient à la fois stables colloïdalement dans le sang et ne semblaient pas affecter le développement cellulaire, puisque leur présence ne modifie pas le taux de mortalité des cellules. Cependant, les tests *in-vivo* ont montré qu'il n'est pas possible pour l'instant d'obtenir une image de micro-vascularisation du cortex cérébral de la souris. Ceci est dû au fait que les nanoparticules ne sont pas furtives dans l'organisme et que, dès leur injection dans le système sanguin, elles sont détectées comme corps étranger et envoyées vers les reins et le foie. La furtivité des nanoparticules devra donc être optimisée grâce au greffage de polyéthylèneglycol à la surface des nanoparticules. Nous avons ensuite démontré la faisabilité d'utiliser ces nanoparticules comme agent de ciblage *in-vitro*. Dans un premiers temps, nous avons greffé de la biotine sur les nanoparticules et démontré la possibilité de réaliser une interaction entre les nanoparticules biotinylées et la streptavidine. Ensuite l'intégrine surexprimée par des cellules a été ciblée à l'aide de nanoparticules couplées à un peptide de type RGD. Enfin, le développement de la chimie de surface des nanoparticules devrait nous permettre d'obtenir des matériaux polyfonctionnels. Nous pouvons par exemple envisager de greffer sur la même nanoparticule des entités augmentant la furtivité (des polyéthylèneglycol, par exemple) et des entités de ciblage (via le greffage de biomolécule par exemple), afin de développer des expériences de ciblage *in-vitro* et *in-vivo* pour imager plus particulièrement la microvascularisation de tumeurs cancéreuse cérébrales.

Bibliographie

1. Maurin, M., Vurth, L., Vial, J. C., Baldeck, P., Marder, S. R., Van der Sanden, B., and Stephan, O., *Fluorescent Pluronic nanodots for in vivo two-photon imaging*. Nanotechnology, 2009. **20**(23).
2. Pons, T., Mertz, J., *Imager dans la profondeur des tissus : les microscopies biphotoniques*. http://www.cnrs.fr/publications/imagesdelaphysique/couv-PDF/IdP2005/25Pons-Mertz.pdf, 2005.
3. Vérant, P., *Imagerie intravitale par microscopie biphotonique : application à l'étude des efftes de la radiothérapie synchrotron par microfaisceaux sur la microvascularisation corticale de la sourie*. Thèse de Doctorat, Université J. Fourier Grenoble, 2006.
4. Bagwe, R. P., Hilliard, L. R., and Tan, W. H., *Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding*. Langmuir, 2006. **22**(9): p. 4357-4362.
5. Dancil, K. P. S., Greiner, D. P., and Sailor, M. J., *A porous silicon optical biosensor: Detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(34): p. 7925-7930.
6. De, M., Ghosh, P. S., and Rotello, V. M., *Applications of Nanoparticles in Biology*. Advanced Materials, 2008. **20**(22): p. 4225-4241.
7. Gao, X. H., Cui, Y. Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K., and Nie, S. M., *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(8): p. 969-976.
8. Gerion, D., Herberg, J., Bok, R., Gjersing, E., Ramon, E., Maxwell, R., Kurhanewicz, J., Budinger, T.F., Gray, J.W., Shuman; M.A., Chen, F.F., *Paramagneic silica-coated nanocrystals as an advanced MRI contrast agent*. J. Phys. Chem. C, 2007. **111**: p. 12542-12551.
9. Islam, M. S., Dutta, A. K., Gao, X. H., and Nie, S. M., *Long-circulating QD probes for in-vivo tumor imaging*, in *Nanosensing: Materials and Devices*. 2004. p. 292-299.
10. Jana, N. R., Earhart, C., and Ying, J. Y., *Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(21): p. 5074-5082.
11. Janshoff, A., Dancil, K. P. S., Steinem, C., Greiner, D. P., Lin, V. S. Y., Gurtner, C., Motesharei, K., Sailor, M. J., and Ghadiri, M. R., *Macroporous p-type silicon Fabry-Perot layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(46): p. 12108-12116.
12. Lin, V. S. Y., Motesharei, K., Dancil, K. P. S., Sailor, M. J., and Ghadiri, M. R., *A porous silicon-based optical interferometric biosensor*. Science, 1997. **278**(5339): p. 840-843.
13. Qian, J., Li, X., Wei, M., Gao, X., Xu, Z., He, S., *Bio-molecule-conjugated fluorescent organically modified silica nanoaprticles as optical probes for cancer cell imaging*. Optics express, 2008. **16**(24): p. 19568-19574.
14. Wolcott, A., Gerion, D., Visconte, M., Sun, J., Schwartzberg, A., Chen, S. W., and Zhang, J. Z., *Silica-coated CdTe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(11): p. 5779-5789.
15. Xia, B., Xiao, S. J., Guo, D. J., Wang, J., Chao, M., Liu, H. B., Pei, J., Chen, Y. Q., Tang, Y. C., and Liu, J. N., *Biofunctionalisation of porous silicon (PS) surfaces by*

using homobifunctional cross-linkers. Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**(6): p. 570-578.

16. Yuan, J. J., Wan, D. C., and Yang, Z. L., *A Facile Method for the Fabrication of Thiol-Functionalized Hollow Silica Spheres.* Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(44): p. 17156-17160.
17. Brooks, P. C., Clark, R. A. F., and Cheresh, D. A., *Requirement of vascular integrin alpha-v-beta-3 for angiogenesis.* Science, 1994. **264**(5158): p. 569-571.
18. Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T. H., Klier, G., and Cheresh, D. A., *Integrin alpa-v-beta-3 antagonists promote tumos-regression by inducing apoptosis of angiogenic blood-vessels* Cell, 1994. **79**(7): p. 1157-1164.
19. Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., and Cheresh, D. A., *Antiintegrin alpha-v-beta-3 blocks human breast-cancer growth and angiogenesis in human skin* Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(4): p. 1815-1822.
20. Murphy, E. A., Majeti, B. K., Barnes, L. A., Makale, M., Weis, S. M., Lutu-Fuga, K., Wrasidlo, W., and Cheresh, D. A., *Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(27): p. 9343-9348.
21. Sipkins, D. A., Cheresh, D. A., Kazemi, M. R., Nevin, L. M., Bednarski, M. D., and Li, K. C. P., *Detection of tumor angiogenesis in vivo by alpha(v)beta(3)-targeted magnetic resonance imaging.* Nature Medicine, 1998. **4**(5): p. 623-626.
22. Sun, C. R., Du, K., Fang, C., Bhattarai, N., Veiseh, O., Kievit, F., Stephen, Z., Lee, D. H., Ellenbogen, R. G., Ratner, B., and Zhang, M. Q., *PEG-Mediated Synthesis of Highly Dispersive Multifunctional Superparamagnetic Nanoparticles: Their Physicochemical Properties and Function In Vivo.* Acs Nano. **4**(4): p. 2402-2410.
23. Winter, P. M., Caruthers, S. D., Kassner, A., Harris, T. D., Chinen, L. K., Allen, J. S., Lacy, E. K., Zhang, H. Y., Robertson, J. D., Wickline, S. A., and Lanza, G. M., *Molecular Imaging of angiogenesis in nascent vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(v)beta(3)-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging.* Cancer Research, 2003. **63**(18): p. 5838-5843.
24. Winter, P. M., Morawski, A. M., Caruthers, S. D., Fuhrhop, R. W., Zhang, H. Y., Williams, T. A., Allen, J. S., Lacy, E. K., Robertson, J. D., Lanza, G. M., and Wickline, S. A., *Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta(3)-Integrin-targeted nanoparticles.* Circulation, 2003. **108**(18): p. 2270-2274.
25. Chaiet L, W. F., *Porperties of streptavidin biotine-binding protein produced by streptomycetes* Archives of biochemistry and biohysics 1964. **106**(1-3): p. 1-&.
26. Gould, E., Buckley, A., Camnak, N., *Use of the biotin streptavidin interaction to improve favivirus detection by immunofluorescence and elisa tests.* Journal of viroligical methods, 1985. **11**(1): p. 41-48.
27. Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P., and Waggoner, A. S., *Noninvasive imaging of quantum dots in mice.* Bioconjugate Chemistry, 2004. **15**(1): p. 79-86.
28. Kumar, R., Roy, I., Ohulchanskky, TY., Vathy, LA., Bergey, EJ., Sajjad, M., Prasad, PN., *In-vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles.* Acs Nano, 2010. **4**(2): p. 699-708.

Chapitre V :

Insertion de complexes de terre rare

Introduction …… **189**

1. Les complexes de Lanthanides …… **189**

2. Insertion des complexes de lanthanides dans les nanoparticules silicatées …… **190**

2.1. Le complexe d'Europium : $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ …… 191

2.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE …… 192

2.1.2. Caractérisations préliminaires des particules dopées …… 195

2.1.3. Optimisation de la coquille silicatée …… 198

2.1.3.1. Effet de la proportion en alcoxyde réticulant TMOS …… 199

2.1.3.2. Stabilité en solutions biologiques …… 202

2.1.4. Conclusion …… 204

2.2. Le complexe d'ytterbium : $[NBu_4]_3Yb(DPA\text{-}NPEG)_3$ …… 205

2.2.1. Matrice 8 TMOS + 1 BTP …… 206

2.2.1.1. Spectroscopie de luminescence sur poudre …… 206

2.2.1.2. Stabilité en solutions biologiques …… 207

2.2.2. Conclusion sur l'insertion du complexe d'ytterbium …… 208

Conclusion sur le chapitre …… **208**

Bibliographie …… **210**

Introduction

Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes penchés sur une autre famille de luminophores: les complexes de terre rare. Ces complexes de coordination possèdent des propriétés remarquables en microscopie biphotonique [1-5]. L'utilisation de tel composés pourrait permettre de synthétiser des nanoparticules multifonctionnelles en ajoutant des propriétés magnétiques (complexe de gadolinium par exemple pour l'imagerie de type IRM) ou de photothérapie des RX. Dans le cas présent, nous souhaitons uniquement doper les nanoparticules en dispersant le complexe au sein de la matrice et non plus obtenir un cœur moléculaire fluorescent cristallisé. Nous avons donc, dans un premier temps, transposé la technique de synthèse pour assurer l'insertion des complexes de terre rare dans la matrice silicatée [3-5]. Puis nous avons étudié la spectroscopie de ces nanoparticules afin de voir si la dispersion des complexes de terre rare dans la matrice silicatée modifie leurs propriétés de luminescence. En effet, le principal objectif de cette étude est d'insérer les complexes de lanthanides dans les nanoparticules silicatées afin de les stabiliser chimiquement et photochimiquement dans un environnement aqueux pour le développement de traceurs biologiques *in-vivo* [3, 6-7].

1. Les complexes de Lanthanides

Les complexes de lanthanides sont des luminophores hybrides appartenant à la famille des complexes de coordination [8-7]. La structure d'un complexe de lanthanide est formée de deux éléments (figure 1): un ligand organique appelé « antenne » collectant l'énergie d'excitation coordiné sur un cation lanthanide (le plus souvent europium ou terbium). Un espaceur fonctionnel permet de greffer via le ligand organique le complexe de lanthanide sur une sonde biologique permettant de cibler certains types de molécules. La séparation des fonctions d'absorption (par le motif chromophore organique) et d'émission (par le cation) induit un important déplacement de Stokes (écart énergétique entre les bandes d'émission et d'absorption) : les chromophores organiques utilisés absorbent généralement dans le proche UV ou dans le bleu, alors que les cations utilisés réémettent dans le vert ($\lambda_{émission}$ = 545 nm) pour le Terbium et le rouge ($\lambda_{émission}$ = 615 nm) pour l'Europium, ou dans le proche infrarouge : pour le Néodyme ($\lambda_{émission}$ = 1300 nm) et l'Ytterbium ($\lambda_{émission}$ = 980 nm) [9-11]. De plus, la durée de vie de l'émission centrée sur le

métal est de l'ordre de la µs-ms, bien plus longue que celle des chromophores organiques (ns). Ainsi, ces complexes sont particulièrement adaptés à des systèmes d'imagerie de luminescence retardée par exemple [8, 12-14]. Leur durée de vie étant très supérieure à celle du milieu biologique, il est ainsi possible d'envoyer le faisceau excitateur et de collecter ensuite, plusieurs centaines de nanoseconde après, uniquement le signal de fluorescence provenant des complexes de terre rare.

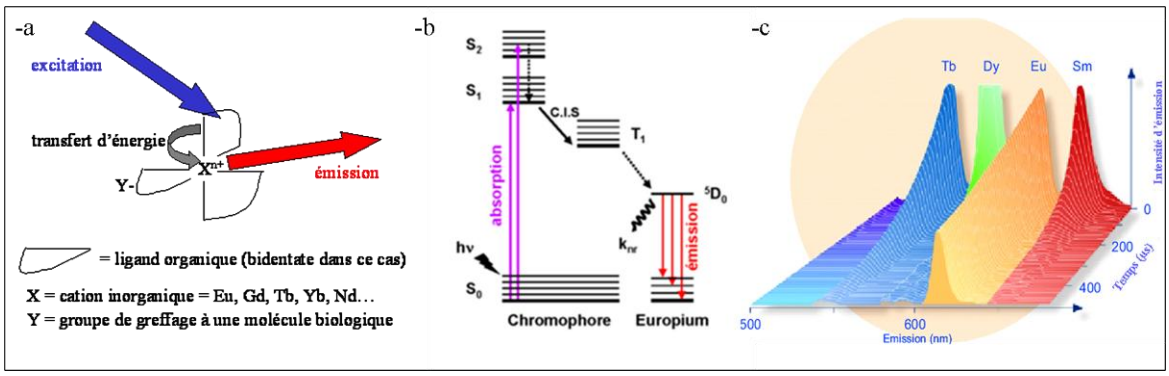


Figure 1 - Structure et propriétés de complexes de lanthanides : (a) Structure générale d'un complexe de lanthanide avec trois ligands organiques bidentates, (b) Schéma du transfert d'énergie entre les ligands et la terre rare, (c) Spectres de luminescence et durées de vie des chélates de lanthanides proposés dans le système DELFIA® par Perkin Elmer.

2. Insertion des complexes de lanthanides dans les nanoparticules silicatées

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé avec C. Andraud, O. Maury et A. Bourdolle de l'équipe CPO de l'ENS-Lyon qui sont spécialisés dans l'ingénierie moléculaire. Ils ont développé des complexes à base d'Europium ou d'Ytterbium (figure 2) [10, 11, 9]. Ces complexes sont solubles dans le méthanol, différents solvants organiques et dans l'eau. Ils ont permis de réaliser les premières expériences d'imagerie de cellule cancéreuses par microscopie biphotoniques. En revanche ces composés présentent un inconvénient majeur pour leur utilisation ultérieure en tant que biosonde : ils ont tendance à se dissocier lorsqu'ils sont dilués en solutions aqueuse :

$$[Eu(L^1)_3]^{3-} \underset{H_2O}{\rightleftharpoons} [Eu(L^1)_{3-x}(H_2O)_x]^{3-} + x(L^1)^{2-} \qquad (1)$$

Ainsi, la décoordination d'un ligand modifie la sphère de coordination de la terre rare et permet l'incorporation de molécules d'eau. Ces dernières vont induire une extinction très

forte de la luminescence centrée sur le métal via les vibrateurs O-H. Cela se traduit par une forte diminution du rendement quantique d'émission de l'europium (ou autre lanthanide) ainsi que par une diminution de la durée de vie de luminescence. L'objectif principal de ce travail est donc de stabiliser les complexes par incorporation au sein de nanoparticules de sol-gel afin de générer des nano-objets stables en solution aqueuse, et qui conservent les caractéristiques spectroscopiques du complexe initial [2-5].

De plus, ces complexes sont très sensibles au pH via notamment le risque de protonation des ligands. Pour ne pas décomposer le complexe, il faut travailler à des pH supérieurs à 6. Au vu de ces contraintes induites par la sensibilité des complexes de lanthanides au pH et à l'eau, il nous a fallu adapter les paramètres chimiques du sol-gel pour les stabiliser au mieux au sein de la matrice silicatée. Dans cette étude, nous avons tout d'abord mis en jeu un complexe d'europium émettant dans le rouge ($\lambda_{émission}$ = 615 nm) qui nous a permis de mettre au point les conditions d'élaboration. Celles-ci ont été ensuite appliquées à un deuxième complexe d'ytterbium qui présente une émission dans le proche IR ($\lambda_{émission}$ = 980 nm).

2.1. Le complexe d'Europium : $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$

Le $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$, figure 2, est un complexe d'Europium, de masse molaire 2597,17 g/mol, utilisé dans cette phase d'ajustement des paramètres d'élaboration mettant en jeu des complexes de lanthanides.

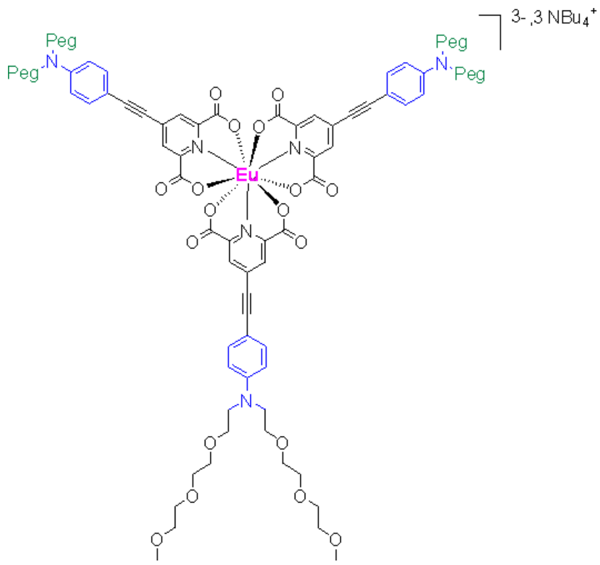


Figure 2 - Complexe d'europium : $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$.

Ce complexe d'europium présente un maximum d'absorption à $\lambda_{absorption\ max}$ = 370 nm et un signal d'émission intense avec une transition principale à $\lambda_{émission\ max}$ = 615 nm dans le dichloromethane. Sa durée de vie est de l'ordre de τ = 0,85 ms et ce composé présente une section efficace à deux photons la plus importante rapportée pour un complexe de lanthanide : 745 GM à 760 nm. Il n'est pas émissif dans l'eau mais des expériences préliminaires ont montré qu'il conservait son émission au sein d'une matrice sol-gel (précurseur $CH_3Si(C_2H_5)_3$). Deux types de matériaux ont été récemment préparés par S. Parola de l'équipe Chimie moléculaire et matériaux hybrides du LMI – Lyon : des sol-gel massifs et des films minces. Ces deux matériaux présentent le spectre d'émission caractéristique de l'europium (figure 3) sous excitation à 400 nm et montrent des durée de vie mono- (τ = 786 µs) et bi-exponentielles (τ^1 = 777 µs et τ^2 = 230 µs) respectivement. L'apparition d'une seconde durée de vie courte dans les matériaux sous forme de films minces s'explique par un rapport surface/volume plus important et par une réaction de surface (hydratation) qui entraîne une décoordination partielle du complexe selon l'équation (1).

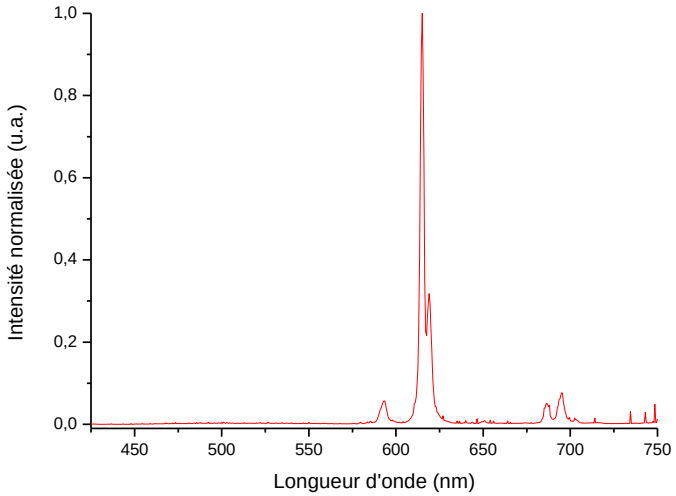


Figure 3 - Spectre normalisé d'émission ($\lambda_{excitation}$ = 375 nm) du massif sol-gel dopé.

Ce complexe présente donc des propriétés spectroscopiques intéressantes ; de plus la présence de deux durées de vie sera une sonde très pratique pour étudier son intégrité en fonction de sa mise en forme. Il est donc un excellent candidat pour une étude d'incorporation dans des nanoparticules sol-gel. Dans cette partie, nous avons mis en jeu

deux types de matrices sol-gel issues de mélanges de précurseurs : 2 TMOS + 1 TMSE et x TMOS + BTP avec x = 4, 8, 12 et 16.

2.1.1. Matrice 2 TMOS + 1 TMSE

Pour préserver le complexe lors de sa dissolution dans le sol juste avant sa nébulisation, il faut que le pH de la solution soit supérieur à 6. Cependant, dans le chapitre I, §1.2.1., il a été souligné l'importance du pH sur la formation du réseau silicaté et qu'en catalyse basique il se forme un gel colloïdal ne permettant pas la formation d'une coquille silicatée. Pour favoriser la formation d'un gel polymérique linéaire requis pour l'élaboration d'une bonne coquille silicatée, l'hydrolyse et la condensation des alcoxydes doivent s'effectuer en catalyse acide à pH < 2. C'est pourquoi, pour préserver le luminophore et obtenir un gel polymérique linéaire, les sols ont été préparés en deux étapes :

- Catalyse acide durant la phase de vieillissement du sol afin de lancer correctement la formation du gel polymérique linéaire, 15 jours à 60°C.
- Remontée du pH de la solution sol-gel à pH = 7 à l'aide d'ammoniaque (NH_4OH) à 2,5 mol/L 1h avant la nébulisation et ensuite dissolution du complexe pour ne pas perturber la formation du gel polymérique et pour ne pas détériorer le complexe.

La matrice silicatée utilisée dans cette étude est celle déjà mise en jeu précédemment lors de l'insertion des petites molécules organiques : 2 TMOS + 1 TMSE et le taux de dilution est identique, s = 500. Une série de tests a tout d'abord été effectuée sans ajouter le complexe d'europium pour observer les nanoparticules résultant de cette préparation du sol en deux étapes avec remontée de pH.

L'observation à l'aide du MEB a mis en évidence la formation de nanoparticules sphériques, parfaitement individualisées, figure 4-a. De plus, l'analyse statistique de la distribution en taille montre que la modification à la fois du solvant et la remontée du pH de la solution, une heure avant la nébulisation, n'induisent pas de modifications, figure 4-b.

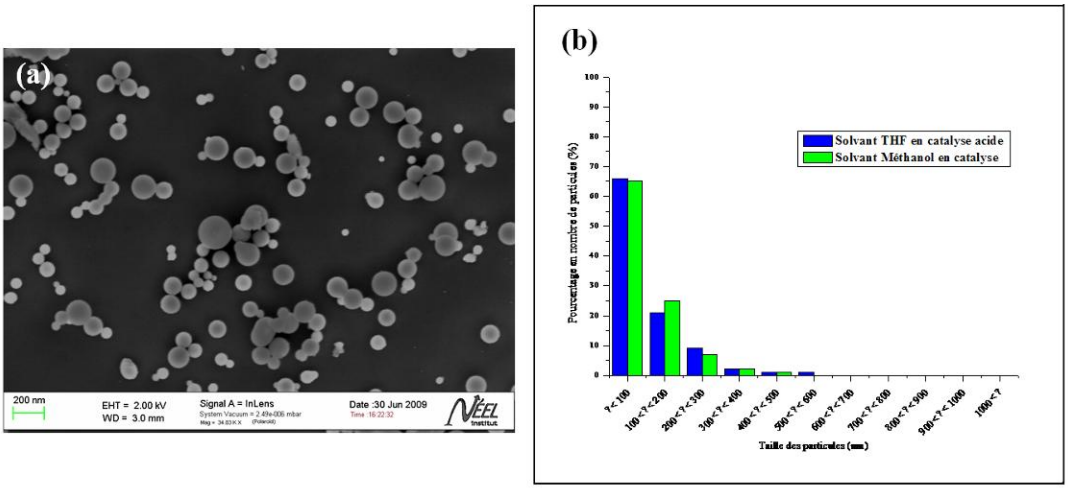


Figure 4 - (a) Nanoparticules obtenues suite à une réaction en catalyse acide suivie d'une remontée à pH ≈ 7 une heure avant la nébulisation avec le méthanol comme solvant; (b) Impact de la nature du solvant (THF ou méthanol) et de la catalyse sur la distribution en taille des particules.

Ces premiers essais, très encourageants, ont été suivis par des tests d'incorporation du complexe d'europium. Le $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ ayant une masse molaire 2597,17 g/mol, le taux de luminophore a été diminué à d = 0,0012 correspondant à un rapport massique avec la matrice sol-gel de 5%. Ainsi, cette limitation de la concentration de complexe inséré dans les nanoparticules permet d'avoir les complexes bien dispersés au sein de la matrice. En effet, si la quantité de complexes dispersés est trop importante, les risques d'extinction de luminescence par transferts d'énergie intermoléculaires et/ou de réabsorption par les ligands de l'émission de l'europium est accru entraînant ainsi une perte du signal de luminescence. C'est ce qui a été observé lors d'un essai où le taux de luminophore était de d = 0,01 correspondant à un rapport massique de 33%. La dispersion du complexe au sein de la matrice silicatée permet l'obtention d'une poudre blanche fortement émissive dans le rouge sous irradiation par une lampe UV, figure 5-b. Les particules observées au MEB sont semblables à celles obtenues lors des premiers tests, figure 5-c. L'ajout du fluorophore ne modifie donc pas le comportement et la formation des nanoparticules. De plus, la figure 5-d montre que la dispersion du complexe d'europium au sein de la matrice silicatée ne modifie pas la distribution en taille des particules.

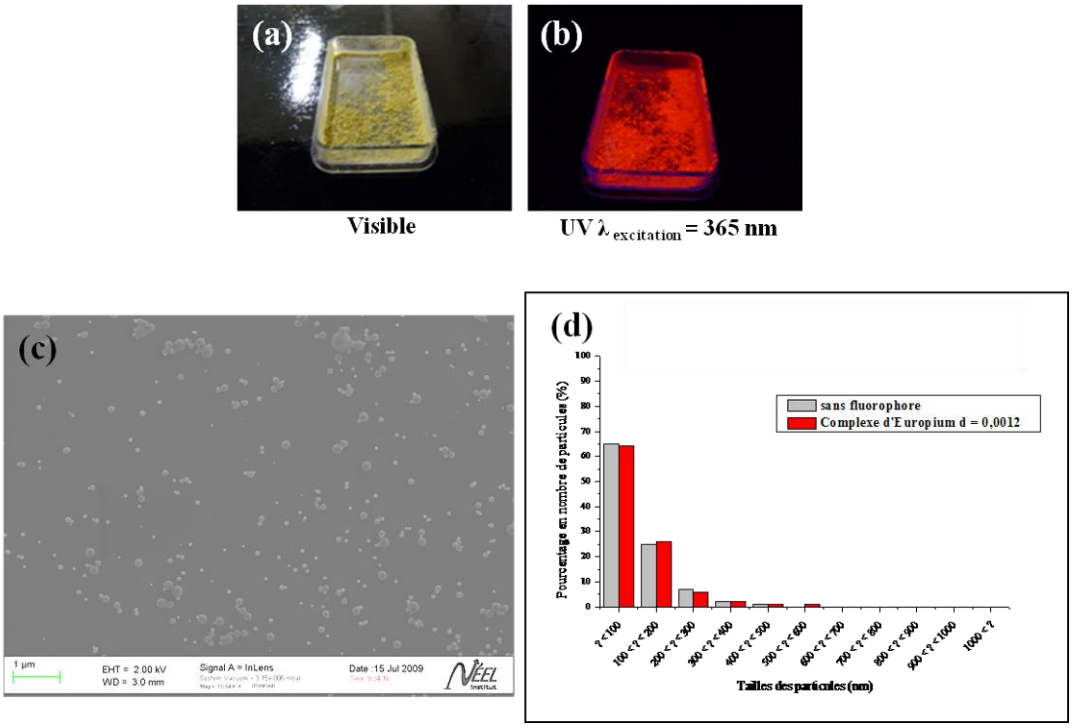


Figure 5 - (a) (b) Photos de la poudre de nanoparticules dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE insérant le complexe de $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ (d = 0,0012) sous lumière visible et sous UV à 365 nm; (c) Cliché MEB de ces nanoparticules; (d) Distribution en taille des particules sans et avec ce complexe.

Ces particules ont ensuite été caractérisées spectroscopiquement à l'état solide pour vérifier si le complexe d'europium n'est pas dégradé lors de l'élaboration des nanoparticules mais aussi lors de leur dispersion en solution aqueuse (milieu biologique).

2.1.2. Caractérisations préliminaires des particules dopées

Dans un premier temps, afin de tester la stabilité du complexe d'Europium dispersé dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE, les nanoparticules ont été mises en suspension dans une solution TRIS, un tampon biologique, à pH = 8 puis filtrées afin de n'avoir que celles de diamètre inférieur à 450 nm. Les caractérisations spectroscopiques ont été effectuées afin de vérifier, si la matrice sol-gel protège l'intégrité structurale du complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ en particulier vis-à-vis de sa dissociation par la dilution dans l'eau. En effet, si la coquille silicatée laisse diffuser l'eau, celle-ci peut venir échanger les ligands organiques, selon l'équation 1, et changer la sphère de coordination de l'europium ce qui devrait entraîner ainsi une détérioration du signal de luminescence.

- Spectre de luminescence et durée de vie

Une première mesure de la luminescence, figure 6, montre que la luminescence de l'europium est bien présente lorsqu'on disperse les particules dans une solution aqueuse. Ce résultat est important lorsque l'on se souvient que le complexe seul n'est pas émissif dans l'eau. La matrice silicatée protège donc le complexe du milieu extérieur.

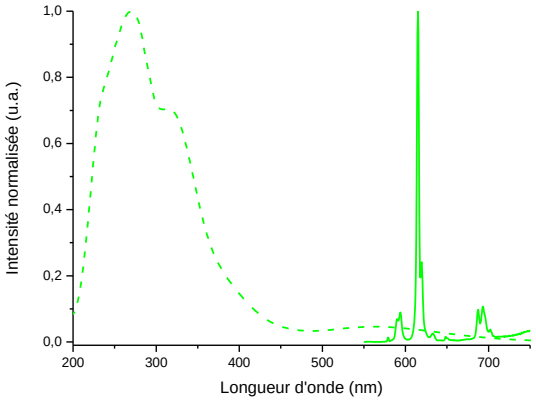


Figure 6 : Spectre d'absorption (pointillé) et d'émission (trait plein, $\lambda_{excitation}$ = 316 nm) de la solution de nanoparticules filtrées à 450 nm.

Le spectre d'émission est caractéristique de l'europium avec sa bande intense à 615 nm. La figure 6 met aussi en évidence le large déplacement de Stokes, 300 nm, entre le spectre d'absorption et celui d'émission caractéristique des complexes de lanthanide. Cette solution initiale de nanoparticules en suspension est ensuite diluée 2, 6, 18 et 54 fois en solution aqueuse afin d'étudier l'impact de la dilution sur le signal de luminescence du complexe d'europium.

Dans un premier temps, nous avons observé les spectres de luminescence des différentes dilutions. En cas de dissociation du complexe d'europium par l'eau, sa sphère de coordination va être modifiée ainsi que sa symétrie. Ceci impacte sur l'allure du spectre de luminescence. Lorsqu'on observe la solution de départ et la plus diluée (figure 7), on ne voit pas de modification profonde de l'allure spectrale.

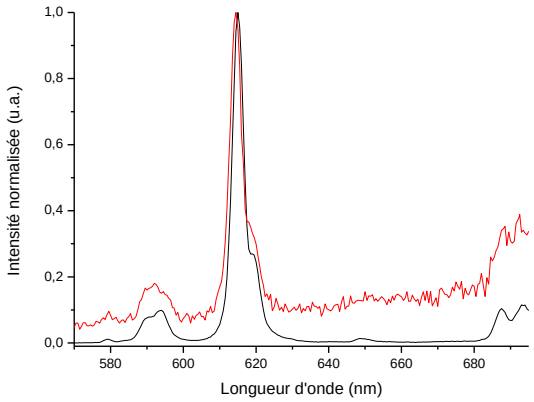


Figure 7 - Spectres normalisés d'émission ($\lambda_{excitation}$ = 316 nm) des solutions filtrées à 450 nm de nanoparticules de complexe d'europium dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE non diluée (noir) et diluée 54 fois (rouge).

Afin de déterminer si le complexe d'europium est stabilisé dans la matrice 2 TMOS + 1 TMSE, nous avons mesuré les durées de vie de luminescence. Dans le cas où le complexe est bien stabilisé par la matrice silicatée, les durées de vie de luminescence ont un comportement mono-exponentiel et restent inchangées au cours des dilutions. Le tableau 1 regroupe les durées de vie de luminescence mesurées pour les différentes dilutions.

	Corrélation bi-exponentielle			
Solution	% de 1	Durée de vie 1 (ms)	% de 2	Durée de vie 2 (ms)
Concentrée	62	1,023	38	0,261
Diluée par 2	58	1,062	42	0,296
Diluée par 6	31	1,046	69	0,272
Diluée par 18	16	1,001	84	0,276
Diluée par 54	5	1,024	95	0,280

Tableau 1 - Durée de vie de fluorescence des solutions en fonction de leur taux de dilution.

Les durées de vie de luminescence de l'europium évoluent au cours des dilutions. Il semblerait qu'il y ait une dissociation partielle du complexe d'europium due à la présence

d'eau, tableau 1. Il semblerait qu'on ait deux durées de vie de luminescence indiquant la présence de deux espèces luminescentes au sein des nanoparticules. Deux durées de vie de fluorescence ont été estimées : une qui se situe aux alentours de 1 ms et la seconde à environ 0,270 ms. L'étude en dilution aqueuse de la durée de vie de luminescence des particules filtrées à 450 nm montre une diminution de la proportion de la durée de vie longue et une augmentation progressive de celle de durée de vie courte. Il semblerait que nous soyons en présence d'un mélange de $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ et de $[NBu_4]_1Eu(DPA\text{-}NPEG)_2(H_2O)$ obtenu par substitution partielle de ligand par l'eau selon l'équation 1.

- Conclusion

L'étude de l'évolution de la durée de vie d'émission en fonction du taux de dilution a mis en évidence la dissociation progressive du complexe d'europium : substitution partielle de ligands par l'eau selon un processus similaire à celui décrit pour les molécules en solution aqueuse (eq. 1). Ceci s'accompagne par une diminution de la symétrie du complexe et d'une détérioration des propriétés de luminescence. La matrice 2 TMOS + 1 TMSE est donc trop perméable à l'eau. C'est pourquoi, nous avons envisagé de modifier la nature de la coquille silicatée lors de la mise en jeu des complexes de lanthanides pour fermer toute porosité de la matrice sol-gel et d'éviter toute diffusion de l'eau à l'intérieur des particules et de préserver ainsi l'intégrité structurale du complexe.

2.1.3. Optimisation de la coquille silicatée

Nous avons utilisé un autre type de précurseur appartenant à la même famille d'organo-polysilsesquioxane que le TMSE : le 1,16-bis(trimethoxysilyl)-4,7,10,13-tétraoxahexadécane ou BTP, tableau 2 [15-18] qui présente, contrairement au TMSE une chaîne longue et souple de poly-ethylèneglycol (PEG).

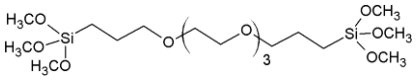
Alcoxyde de silicium	Formule développée	Abréviation	M (g/mol)	Densité (g/cm^3)
1,16-bis(trimethoxysilyl)-4,7,10,13-tétraoxahexadécane		BTP	474,69	1,060

Tableau 2 - Caractéristique nouveau précurseur.

Ainsi, nous espérions à la fois préserver le caractère hydrophile des particules afin de favoriser leur bonne dispersion dans l'eau et d'autre part, fermer la porosité des particules silicatées pour éviter toute diffusion de molécule d'eau dans les particules. Nous avons utilisé comme solvant le méthanol qui permet de dissoudre les complexes de lanthanides avec un taux de solvant élevé (s = 500) pour obtenir comme précédemment des nanoparticules de petites tailles. De plus, nous avons utilisé des proportions molaires d'alcoxydes : x TMOS + BTP où x = 4 ; 8 ; 12 ; 16 pour la formation des nanoparticules silicatées hybrides.

2.1.3.1. Effet de la proportion en alcoxyde réticulant TMOS

Dans un premier temps, nous avons préparé des nanoparticules sans luminophores à partir des solutions suivantes : x TMOS + BTP + MeOH (s = 500) + HCl 1M pour un temps d'hydrolyse en catalyse acide (pH ≈ 1) de 15 jour à 60°C puis une remontée du pH ≈ 7 juste avant la nébulisation à l'aide d'une solution NH_4OH à 2,5 M. La figure 8 présente des clichés MEB des particules issues de la nébulisation des sols avec x = 4, x = 8, x = 12 et x = 16.

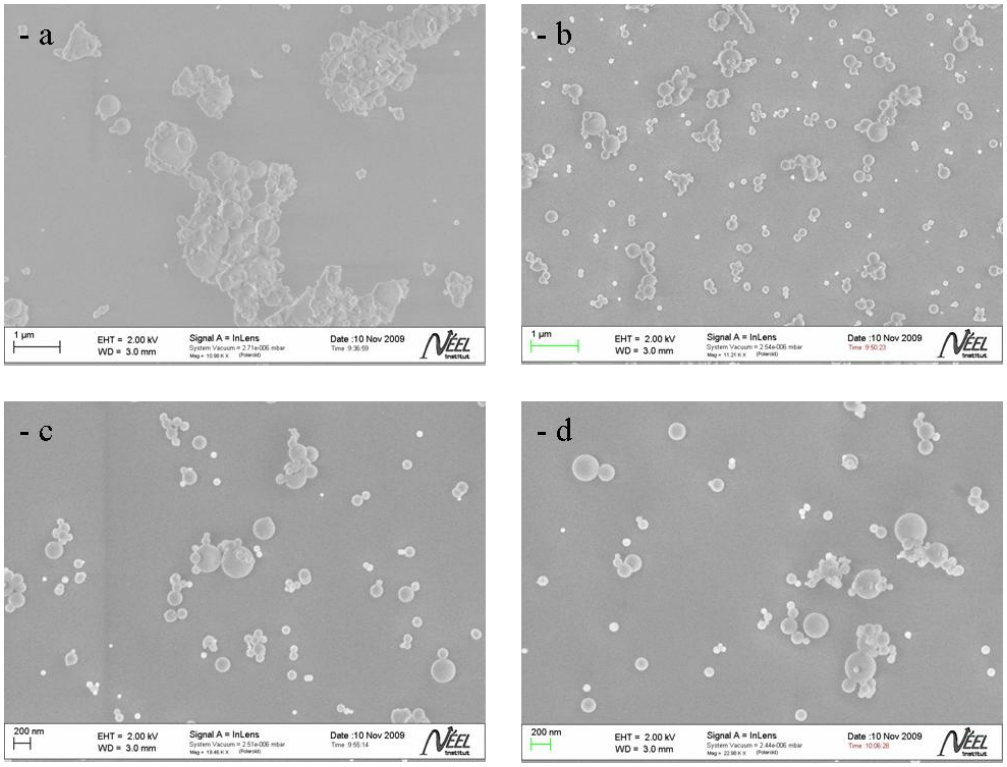


Figure 8 - Observation MEB de la morphologie des nanoparticules en fonction du taux de TMOS : (a) x = 4, (b) x = 8, (c) x = 12 et (d) x = 16.

On constate que pour la concentration la plus faible en alcoxyde TMOS, x = 4 figure 8-a, la formation des particules n'est pas optimale. Les particules sont mal définies et forment de gros amas. Ceci est certainement dû à une trop faible réticulation de la matrice sol-gel qui ne permet pas de former des particules sol-gel de bonne qualité. Pour des taux de TMOS plus élevés x = 8 ; 12 ; 16, nous observons la formation de nanoparticules bien sphériques et individualisées avec des distributions en taille semblables à celles obtenues pour des nanoparticules avec une matrice 2 TMOS + 1 TMSE. Ainsi, pour la suite des tests, la matrice contenant le moins d'agent réticulant (x = 4) ne sera plus utilisée.

Nous avons ensuite enregistré le spectre d'émission et la durée de vie de luminescence du complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ dispersé, d = $1{,}2.10^{-3}$, dans des matrices sol-gel formées à partir de BTP et d'une quantité variable de TMOS, x = 8, 12 et 16 (figure 9). Ces matrices sol-gel ont été préparées de la même manière que précédemment avec un vieillissement des sols à 60 °C en catalyse acide durant 15 j, suivi d'une remonté du pH ≈ 7 une heure avant la nébulisation afin de dissoudre le complexe sans risquer de le détériorer.

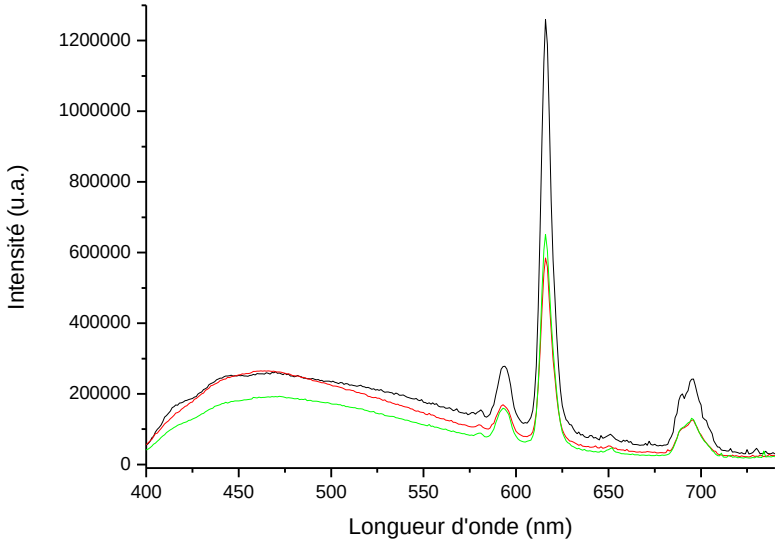


Figure 9 –Emission à l'état solide (λ_{exc} = 380 nm) des particules avec quantité de TMOS variable x = 8 (noir), x = 12 (rouge) et x = 16 (vert).

Le pic d'émission de fluorescence à 615 nm est beaucoup important dans le cas où la matrice est composée de 8 TMOS + BTP. Lorsque le taux de TMOS augmente fortement, x = 12 et 16, ce pic de fluorescence diminue sensiblement (figure 9) ainsi que leur durée de vie apparente (déconvolution mono-exponentielle) qui passent de 800 µs à 500 µs (tableau

3). Afin d'approfondir l'analyse, une déconvolution par une bi-exponentielle a été réalisée. Les déconvolutions montrent une première durée de vie à 800 µs, similaire à celle obtenue pour une matrice 8 TMOS + BTP, et une seconde plus courte (250 ms) (tableau 3) similaire à celles obtenues préalablement dans le film sol-gel par l'équipe lyonnaise du LMI. Ce comportement est caractéristique d'une coexistence entre deux espèces au sein des particules contenant les concentrations en TMOS les plus élevées (x = 12 et 16) favorisant ce comportement de type bi-exponentiel.

	Corrélation mono-exponentielle	Corrélation bi-exponentielle			
Echantillon	Durée de vie (ms)	% de 1	Durée de vie 1 (ms)	% de 2	Durée de vie 2 (ms)
8 TMOS + 1 BTP	0,782				
12 TMOS + 1 BTP		55	0,768	45	0,229
16 TMOS + 1 BTP		50	0,804	50	0,269

Tableau 3 - Corrélation mono et bi-exponentielle des durées de vie de fluorescences des complexes d'Europium dans les matrices silicatées x TMOS + 1 BTP avec x = 8, 12 et 16.

Cette différence de comportement peut provenir des affinités existant entre la coquille silicatée et le complexe notamment avec les silanols de la matrice (Si – OH) qui proviennent du précurseur TMOS. En effet, lorsque la concentration en TMOS augmente, nous observons l'augmentation de la durée de vie de luminescence la plus courte ($\tau \approx 0,2$ ms) qui semble bien correspondre d'après les résultats précédent à un complexe partiellement substitué par des fonctions hydroxydes (équation 1). C'est pourquoi, on ne retrouve qu'une seule durée de vie de luminescence, autour de 0,8 ms, pour la matrice 8 TMOS + 1 BTP qui est la moins concentrée en TMOS. Cette durée de vie de 0,8 – 1 ms semble bien correspondre à la valeur intrinsèque du complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$.

Ces résultats ont été complétés par des mesures de luminescence des nanoparticules suite à leur dispersion dans une solution TRIS, tampon biologique, afin de juger de

l'imperméabilité de la matrice vis-à-vis de l'eau et donc de ses propriétés protectrice du complexe en solution aqueuses.

2.1.3.2. Stabilité en solutions biologiques

Les nanoparticules ont été dispersées comme précédemment dans du tampon TRIS à pH = 8 pour avoir une solution avec une concentration de l'ordre du g/L puis filtrées sur membrane d'acétate de cellulose de porosité 450 nm. La figure 10 présente la luminescence des différents produits.

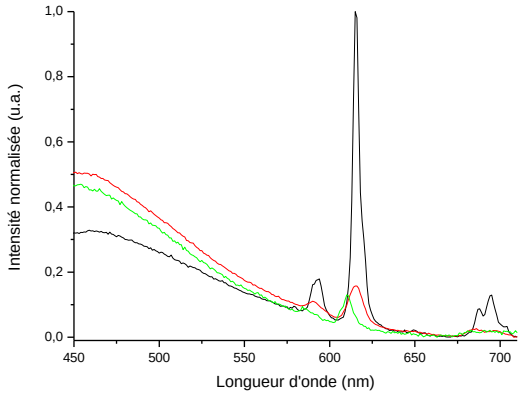


Figure 10 - Spectres normalisés d'émission (λ_{exc} = 375nm) des particules x TMOS + BTP dispersées dans un tampon TRIS pH = 8 et filtrées à 450 nm : x = 8 (noir), x = 12 (rouge) et x = 16 (vert).

En accord avec les résultats obtenus dans l'état solide, on remarque que les particules élaborées avec la matrice 8 TMOS + 1 BTP présentent une émission de l'europium nettement plus importante qui correspond à l'émission intrinsèque du complexe. C'est pour cela que dans la suite de l'étude de stabilité du complexe en solution biologique, nous avons utilisé uniquement cette matrice. Les matrices faiblement chargées en BTP (x = 12 et 16) offrent visiblement une perméabilité beaucoup plus grande à l'eau.

Finalement, afin de vérifier si la nouvelle matrice (8 TMOS + BTP) offre une meilleure protection du complexe en solutions biologiques, nous avons enregistré les spectres de fluorescence des nanoparticules dispersées en solution biologique selon un taux de dilution de plus en plus élevé. Les spectres d'émission de luminescence ainsi que la durée de vie de luminescence ont été mesurés afin de vérifier s'il y a une modification de la signature spectroscopique du complexe au cours de ces dilutions. Une suspension de nanoparticules à une concentration analogue a été faite dans le dichlorométhane (DCM), solvant non

dissociant pour ce complexe d'Europium, pour comparer avec les résultats obtenus suite à la dispersion dans le TRIS.

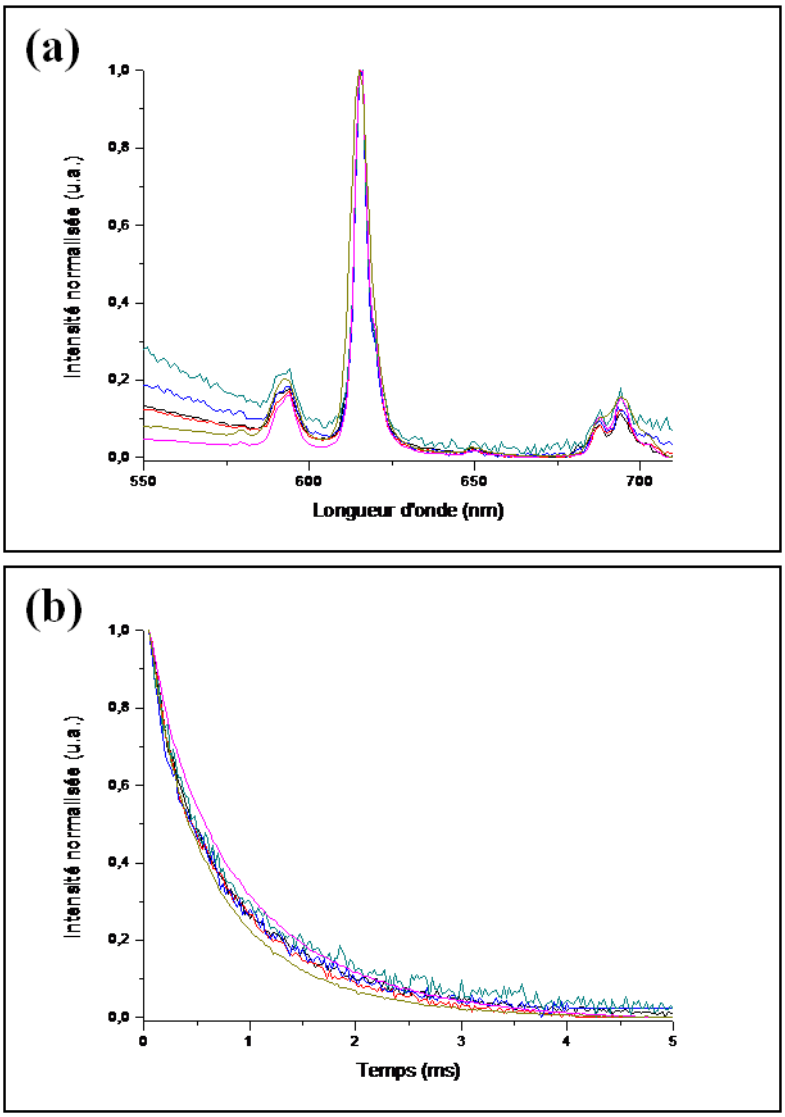


Figure 11 – (a) Spectres normalisés d'émission ($\lambda_{excitation}$ = 375 nm) et (b) Décroissances d'intensité de luminescence normalisées de luminescence au cours du temps (λexc = 380 nm, λem = 615 nm)) des particules 8 TMOS + BTP dispersées dans le DCM non filtrées (ocre), et dans le tampon TRIS pH = 8 non filtrées (magenta) et filtrées à 0,45µm (noir) puis diluées 2 fois (rouge), 4 fois (bleu) et 10 fois (cyan).

La figure 11-a présente les spectres normalisés d'émission du complexe inséré dans des particules 8 TMOS + BTP dispersées dans le DCM et le tampon TRIS. La luminescence est similaire dans les deux cas et reste inchangée pour des taux de dilution en milieu aqueux très élevés (figure 11-a). Avec cette nouvelle matrice, le problème de dissociation du

complexe en présence d'eau semble donc être parfaitement inhibé. Pour confirmer ce point, les durées de vie de luminescence ont été mesurées pour chaque solution et la figure 11-b montre les résultats obtenus.

Les durées de vie de luminescence identiques confirment clairement la bonne protection du complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$ lorsqu'il est inséré dans une matrice sol-gel du type 8 TMOS + 1 BTP. En effet, la dilution des solutions colloïdales de nanoparticules en solutions biologiques ne modifie pas la durée de vie de fluorescence intrinsèque du complexe, voisine de 0,8 ms, tableau 4.

	dilution	Durée de vie Mono-exponentielle (ms)
8 TMOS + 1 BTP	non diluée	0,733
8 TMOS + 1 BTP	2 fois	0,737
8 TMOS + 1 BTP	4 fois	0,750
8 TMOS + 1 BTP	10 fois	0,777

Tableau 4 - Durée de vie de luminescence des particules 8 TMOS + BTP dispersées dans le tampon TRIS pH = 8 filtrées à 450 nm puis diluées 2 fois 4 fois et 10 fois.

2.1.4. Conclusion

Pour insérer ce complexe d'europium dans nos particules silicatées, il a fallu adapter le protocole expérimental en changeant de solvant : méthanol au lieu du THF utilisé pour les molécules de CMONS et de COPVB des chapitres précédents. D'autre part, nous avons modifié la préparation du sol afin d'éviter une dégradation du complexe en milieu acide. Ceci nous a permis d'insérer dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE le complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$. Cependant, la matrice 2 TMOS + 1 TMSE est méso-poreuse [19] ce qui permet la diffusion aisée des molécules d'eau qui viennent progressivement dissocier le complexe et détériorer ainsi ses propriétés de luminescence. Nous avons donc optimisé les propriétés de la matrice sol-gel en utilisant un alcoxyde de silicium qui présente de longues chaînes flexible PEG afin de fermer la porosité des nanoparticules silicatées. Ainsi, nous avons démontré l'insertion du complexe $[NBu_4]_3Eu(DPA\text{-}NPEG)_3$, dans une matrice

8 TMOS + BTP, permet de le stabiliser dans des solutions aqueuse biologique car ses propriétés de fluorescence intrinsèques sont parfaitement préservées. Ces premiers résultats obtenus pour les complexes de lanthanide ouvrent donc des perspectives très prometteuses pour le développement d'un nouveau type de traceurs fluorescents pour l'imagerie *in-vitro* dans le domaine du proche IR où se situe la fenêtre de transparence biologique. C'est pourquoi, nous avons ensuite mis en jeu un complexe d'ytterbium qui présente une émission de luminescence à 980 nm.

2.2. Le complexe d'ytterbium : $[NBu_4]_3Yb(DPA\text{-}NPEG)_3$

Le $[NBu_4]_3Yb(DPA\text{-}NPEG)_3$, figure 12, est un complexe d'ytterbium, de masse molaire 2618,25 g/mol, présentant un intense signal de luminescence à $\lambda_{émission\ max}$ = 980 nm [9-11]. Il présente un maximum d'absorption à $\lambda_{absorption\ max}$ = 370 nm et une durée de vie de luminescence de 37 µs.

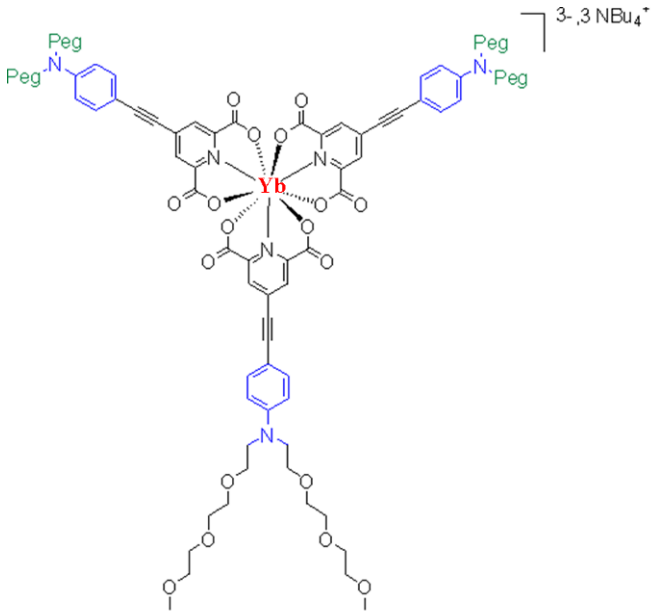


Figure 12 - Complexe d'ytterbium : $[NBu_4]_3Yb(DPA\text{-}NPEG)_3$.

L'équipe de Chimie moléculaire et matériaux hybrides du LMI de Lyon a préparé des massifs sol-gel (précurseur $CH_3Si(C_2H_5)_3$) contenant le complexe d'ytterbium. Ils ont montré que l'émission de luminescence du complexe au sein de la matrice sol-gel était conservée, figure 13.

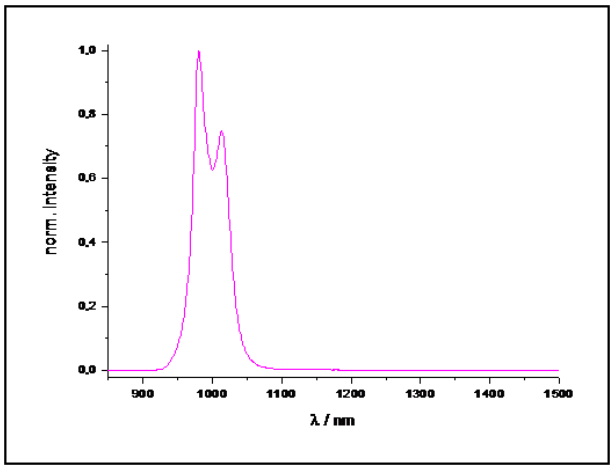


Figure 13 – Spectre d'émission dans le matériau sol-gel massif sol-gel (λ_{ex} = 400 nm).

2.2.1. Matrice 8 TMOS – 1 BTP

Nous nous sommes basés sur les conditions d'élaboration utilisées pour le complexe d'europium pour insérer celui d'ytterbium dans les nanoparticules car les ligands présents dans les deux complexes sont identiques et vont normalement avoir le même comportement chimique. Afin de préserver les propriétés intrinsèques du complexe d'ytterbium, nous avons utilisé la matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP. Les solutions à bases d'un mélange 8 TMOS + BTP + MeOH (s = 500) + HCl 1M sont placées à 60°C durant 15 jours afin d'amorcer l'hydrolyse / condensation des alcoxydes en catalyse acide (pH ≈ 1). Le pH des solutions est remonté une heure avant la nébulisation à pH ≈ 7 à l'aide d'une solution NH_4OH à 2,5 M puis le complexe d'Ytterbium y est dissous, d = $1{,}2.10^{-3}$.

2.2.1.1. Spectroscopie de luminescence sur poudre

Le spectre d'émission de luminescence du complexe d'ytterbium dispersé dans les nanoparticules silicatées 8 TMOS + 1 BTP a été enregistré à $\lambda_{excitation}$ = 375 nm, figure 14. Le spectre d'émission obtenu est caractéristique de l'ytterbium avec sa bande intense à 980 nm. La figure 14 met aussi en évidence le large déplacement de Stokes, 600 nm, entre le spectre d'absorption et celui d'émission caractéristique des complexes de lanthanides.

De plus, lorsqu'on compare les spectres d'émission du complexe d'ytterbium dispersé dans le massif sol-gel (figure 13) et celui dans les nanoparticules (figure 14), ils présentent une allure similaire. Ceci laisse penser que l'intégrité structurale du complexe est restée intacte lors de sa dispersion dans la solution sol-gel avant la nébulisation.

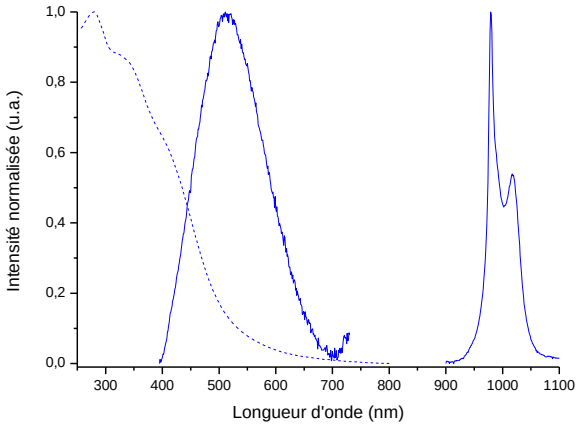


Figure 14 - Spectres normalisés d'absorption (pointillés) et d'émission (trait plein, λ_{exc} = 375 nm) des particules 8 TMOS + BTP à l'état solide.

2.2.1.2. Stabilité en solutions biologiques

Les nanoparticules ont été dispersées dans un tampon TRIS à pH = 8 comme dans le cas des nanoparticules dopées avec le complexe d'europium (§ 2.1.3) pour avoir une solution avec une concentration de l'ordre du g/L avant filtration à 450 nm.

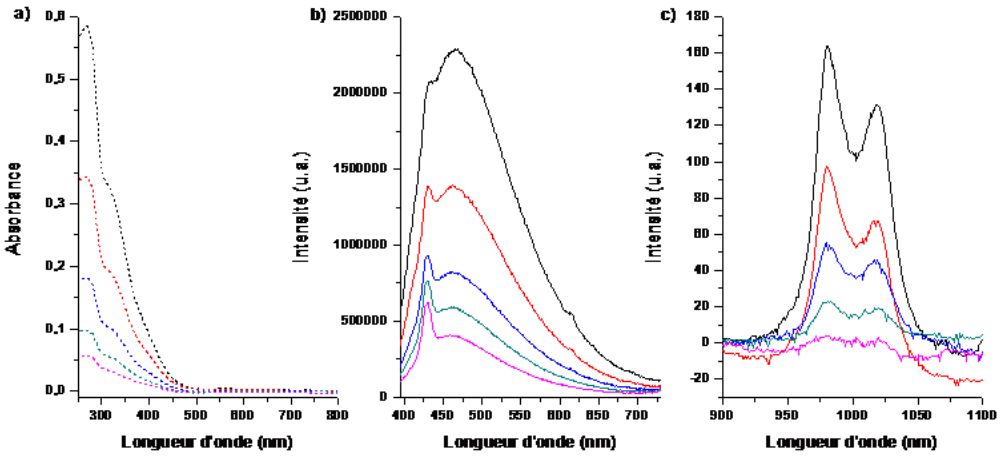


Figure 15: Spectres d'absorption a), d'émission (λ_{exc} = 375 nm) dans le visible b) et dans le proche infra-rouge c) des particules 8 TMOS + 1 BTP en suspension dans le TRIS pH = 8 1M et filtrées à 0.45 µm : solution mère (noir) et solution diluée 2 fois (rouge), 4 fois (bleu), 8 fois (cyan) et 16 fois (magenta).

Ces premières mesures d'émission de luminescence des nanoparticules dispersées dans une solution biologique semblent montrer que la matrice 8 TMOS + 1 BTP offre une bonne

protection au complexe d'ytterbium. Lorsqu'on compare le spectre d'émission sur poudre (figure 14) et celui en solution (noir-figure 15), nous retrouvons le même profil spectral avec le pic d'émission à 980 nm caractéristique de l'ytterbium.

Afin de vérifier la stabilité du complexe d'ytterbium dans la matrice 8 TMOS + 1 BTP, la solution a été diluée 2, 4, 8 et 16. Les spectres d'émission de luminescence des différentes dilutions ont été enregistrés, figure 15. Il semblerait que le complexe d'ytterbium reste intact au cours des différentes dilutions car les profils des spectres d'absorptions (figure 15-a), d'émission dans le visible (figure 15-b) et dans le proche IR (figure 15-c) évoluent en fonction de la dilution sans se déformer. Pour vérifier que le complexe d'ytterbium ne se dissocie pas au cours des dilutions, il faudrait mesurer les durées de vie de luminescence (mesures en cours).

2.2.2. Conclusion sur l'insertion du complexe d'ytterbium

Nous avons ici transposé le procédé d'élaboration testé sur le complexe d'europium pour disperser le complexe d'ytterbium dans les nanoparticules sol-gel en vu de futures applications *in-vitro* dans le proche IR. Les premiers résultats, obtenus en fin de thèse, concernant la dispersion du complexe d'ytterbium dans la matrice silicatée 8 TMOS + 1 BTP semblent prometteurs. Les mesures d'émissions de luminescence laissent penser que le complexe reste intact lorsqu'on disperse les nanoparticules dans un tampon biologique tel que le TRIS. Pour confirmer la bonne stabilité du complexe d'ytterbium, des mesures de durées de vie de luminescence seront prochainement effectuées.

Conclusion sur le chapitre

Dans ce dernier chapitre, nous avons employé un autre type de luminophore, les complexes de lanthanides, pour développer des traceurs dans le proche IR pour l'imagerie *in-vitro* de tissus épais. Dans ce cas là, le complexe est dispersé au sein de la matrice silicatée et non cristallin comme dans le cas des petites molécules organiques telles que le CMONS ou le COPVB par exemple. Pour rendre possible la dispersion des complexes dans les nanoparticules silicatées, le procédé d'élaboration a été modifié en changeant de solvant, méthanol au lieu du THF, et en remontant le pH des solutions à pH = 7 juste avant la mise en solution des complexes. Les premiers tests ont été réalisés avec un complexe

d'europium afin d'éprouver le procédé d'élaboration. Les particules obtenues ont été dispersées en milieu aqueux afin de tester la stabilité du complexe dispersé. Les mesures d'émission et de durée de vie de luminescence ont mises en évidences que lorsque les complexes étaient dispersés dans une matrice 2 TMOS + 1 TMSE, ils se dissociaient. Une deuxième matrice a donc été essayée, 8 TMOS + 1 BTP. Les mesures de luminescences ont mis en évidence que le complexe d'europium restait stable au cours des différentes dilutions en milieu aqueux. La matrice 8 TMOS + 1 BTP présente une porosité fermée qui empêche l'eau de diffuser et préserve ainsi la stabilité du complexe. Ces résultats nous ouvrent donc des perspectives d'utilisations de ces nanoparticules comme agents imageants dans le rouge et le proche IR. Pour cela, nous avons effectué, en fin de thèse, un test de faisabilité en dispersant un complexe d'ytterbium. Les premiers résultats sont encourageants et nous permettent d'envisager des perspectives d'imagerie *in-vitro* dans le proche IR.

Bibliographie

1. D'Aleo, A., Pompidor, G., Elena, B., Vicat, J., Baldeck, P. L., Toupet, L., Kahn, R., Andraud, C., and Maury, O., *Two-photon microscopy and spectroscopy of lanthanide bioprobes.* Chemphyschem, 2007. **8**(14): p. 2125-2132.
2. Escribano, P., Julian-Lopez, B., Planelles-Arago, J., Cordoncillo, E., Viana, B., and Sanchez, C., *Photonic and nanobiophotonic properties of luminescent lanthanide-doped hybrid organic- inorganic materials.* Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(1): p. 23-40.
3. Samuel, J., Tallec, G., Cherns, P., Ling, W. L., Raccurt, O., Poncelet, O., Imbert, D., and Mazzanti, M., *Lanthanide-chelate silica nanospheres as robust multicolor Vis-NIR tags.* Chemical Communications. **46**(15): p. 2647-2649.
4. Wen, X. F., Li, M. Y., Wang, Y., Zhang, J. P., Fu, L. M., Hao, R., Ma, Y., and Ai, X. C., *Colloidal nanoparticles of a europium complex with enhanced luminescent properties.* Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6932-6936.
5. Ye, Z. Q., Tan, M. Q., Wang, G. L., and Yuan, J. L., *Novel fluorescent europium chelate-doped silica nanoparticles: preparation, characterization and time-resolved fluorometric application.* Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(5): p. 851-856.
6. Bunzli, J. C. G., *Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging.* Chemical Reviews. **110**(5): p. 2729-2755.
7. Werts, M. H. V., *Making sense of lanthanide luminescence.* Science progress, 2005. **88**(2): p. 101-131.
8. Faulkner, S., Pope, S. J. A., and Burton-Pye, B. P., *Lanthanide complexes for luminescence imaging applications.* Applied Spectroscopy Reviews, 2005. **40**(1): p. 1-31.
9. Andraud, C. and Maury, O., *Lanthanide Complexes for Nonlinear Optics: From Fundamental Aspects to Applications.* European Journal of Inorganic Chemistry, 2009(29-30): p. 4357-4371.
10. D'Aleo, A., Picot, A., Baldeck, P. L., Andraud, C., and Maury, O., *Design of Dipicolinic Acid Ligands for the Two-Photon Sensitized Luminescence of Europium Complexes with Optimized Cross-Sections.* Inorganic Chemistry, 2008. **47**(22): p. 10269-10279.
11. D'Aleo, A., Picot, A., Beeby, A., Williams, J. A. G., Le Guennic, B., Andraud, C., and Maury, O., *Efficient Sensitization of Europlum, Ytterbium, and Neodymium Functionalized Tris-Dipicolinate Lanthanide Complexes through Tunable Charge-Transfer Excited States.* Inorganic Chemistry, 2008. **47**(22): p. 10258-10268.
12. Marriott, G., Clegg, R. M., Arndtjovin, D. J., and Jovin, T. M., *Time resolved imaging microscopy-phosphorescence and delayed fluorescence imaging* Biophysical Journal, 1991. **60**(6): p. 1374-1387.
13. Marriott, G., Heidecker, M., Diamandis, E. P., and Yanmarriott, Y., *Time-resolved delayed luminescence image microscopy using an europium chelate complex.* Biophysical Journal, 1994. **67**(3): p. 957-965.
14. Beeby, A., Botchway, S. W., Clarkson, I. M., Faulkner, S., Parker, A. W., Parker, D., and Williams, J. A. G., *Luminescence imaging microscopy and lifetime mapping using kinetically stable lanthanide(III) complexes.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2000. **57**(2-3): p. 83-89.
15. Boury, B., Ben, F., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Nobili, M., *Control of the anisotropic organization of nanostructured silica-based hybrid materials.* Chemistry of Materials, 2002. **14**(2): p. 730-738.

16. Boury, B., Chevalier, P., Corriu, R. J. P., Delord, P., Moreau, J. J. E., and Chiman, M. W., *Hybrid organic-inorganic xerogel access to meso- and microporous silica by thermal and chemical treatment.* Chemistry of Materials, 1999. **11**(2): p. 281-291.
17. Boury, B. and Corriu, R. J. P., *Auto-organisation of hybrid organic-inorganic materials prepared by sol-gel process.* Chemical Communications, 2002(8): p. 795-802.
18. Boury, B., Corriu, R. J. P., Delord, P., and Le Strat, V., *Structure of silica-based organic-inorganic hybrid xerogel.* Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. **265**(1-2): p. 41-50.
19. Monnier, V., Dubuisson, E., Sanz-Menez, N., Boury, B., Rouessac, V., Ayral, A., Pansu, RB., Ibanez, A., *Selective sensors based on fluorescent organic nanocrystals confined in sol-gel coatings of controlled porosity.* Microporous and mesoporous materials, 2010. **132**(3): p. 531-537.

Conclusion Générale

Ce travail de thèse a consisté à élaborer des nanocristaux organiques encapsulés dans une coquille silicatée afin de concevoir un nouveau type de traceur pour l'imagerie médicale. Les matériaux synthétisés sont des nanocomposites hybrides organo-minéraux qui permettent de combiner à la fois les propriétés des cristaux fluorescents (intensité de fluorescence élevée et photostabilité) et les avantages d'une matrice sol-gel minérale (stabilité, mise en forme, biocompatibilité). Lors de cette étude, nous avons utilisé plusieurs fluorophores organiques. Dans un premier temps, nous avons mis en jeu le rubrène pour les études préliminaires de synthèse de nanoparticules par nébulisation et séchage car il présente de bonnes propriétés de fluorescence, une stabilité thermique élevée, très soluble dans le THF et ne réagit pas avec les matrices sol-gel. Ce fluorophore a permis de démontrer qu'il était possible de générer en une étape de grandes quantités de nanoparticules hybrides organo-minérale sphériques et fluorescentes sans qu'il y ait de démixtion de phase entre le fluorophore et la matrice silicatée.

Dans un second temps, nous avons utilisé comme fluorophore le CMONS, bien connu de l'équipe MatONLP, qui présente des propriétés intéressantes de fluorescence : il possède une bonne stabilité chimique, une température de fusion élevée et il est fluorescent uniquement dans l'état cristallin. Cette molécule nous a permis de déterminer les conditions d'élaboration et de confirmer la présence de nanocristaux dans les nanoparticules hybrides en utilisant différentes techniques de caractérisation (microscopie optique confocale, microscopie électronique à balayage). Ceci a conduit à une réduction de la polydispersité en taille des particules en favorisant les diamètres inférieurs à 100 nm. Nous avons également défini le taux maximum de fluorophore que l'on pouvait insérer dans les coquilles silicatées tout en préservant un bon enrobage de la phase organique par la matrice sol-gel. Nous avons précisé par la mesure d'angle de contact, sur couches minces silicatées de même composition des nanoparticules, le caractère hydrophile des coquilles sol-gel en vu d'applications comme agents imageants injectés dans la circulation sanguine du petit animal. Nous avons ainsi arrêté notre choix sur deux matrices sol-gel: 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP. Enfin, le procédé a été utilisé pour encapsuler différents fluorophores tel que le COPVB ou le DCM et les di- et tri-cyanoisophorones qui ont ainsi montré le caractère générique de la méthode d'élaboration par séchage contrôlé d'aérosols.

Nous avons ensuite réalisé une étude structurale des nanocristaux de CMONS afin de caractériser les formes cristallines présentes dans les particules. En effet, le CMONS possède trois polymorphes qui présentent des caractéristiques spectroscopiques (absorption,

fluorescence) différentes. Deux des trois polymorphes ont une structure non-centrosymétrique ce qui leur confèrent des propriétés en optique non-linéaire quadratique intéressantes avec la possibilité de générer un signal de seconde harmonique sous une excitation à deux-photons. Il était donc intéressant de voir quel impact pouvait avoir la matrice silicatée sur la cristallinité du CMONS. Comme le CMONS est encapsulé au sein d'une coquille amorphe de silice, il est très délicat d'étudier la cristallinité du CMONS en diffraction des rayons X. La silice amorphe parasite le diagramme de diffraction en masquant les raies de diffraction du CMONS. La technique qui a été la plus adaptée est la microscopie électronique en transmission à condition de travailler à froid (-171°C) afin de limiter la dégradation des nanocristaux organiques sous le faisceau d'électron. La diffraction électronique a montré que les cristaux présentent une très bonne monocristallinité. Cependant, elle a mis en évidence la coexistence des trois polymorphes dans un même échantillon rendant difficile le dépouillement des clichés de diffractions.

L'objectif étant de développer avec ces nanoparticules hybrides des traceurs biologiques, nous avons mis en place un protocole de mise en suspension des particules en milieu aqueux. Nous avons ainsi pu voir que lorsqu'on disperse simplement les particules dans de l'eau, les nanoparticules ne sont pas stables car elles s'agglomèrent et sédimentent rapidement. Afin d'obtenir des suspensions colloïdales stables durant plusieurs mois, il faut dans un premier temps éliminer les particules ayant des diamètres supérieurs à 200 nm car elles sédiment rapidement sous l'effet de la force gravitationnelle mais également générer des forces répulsives : soit coulombiennes soit par encombrement stérique. Dans cette étude, nous avons favorisé la formation de charges de surface des nanoparticules afin de créer des forces de répulsions coulombiennes. Pour cela, les nanoparticules ont été dispersées dans une solution de soude à pH = 12 durant 24h. Cette étape permet d'une part de dissoudre partiellement les coquilles silicatées des nanoparticules ce qui favorise leur désagrégation et amincit l'épaisseur de la coquille silicatée et, d'autre part, de créer des charges négatives en surface grâce à la déprotonation des fonctions silanols. Les solutions sont ensuite centrifugées puis filtrées afin de ne garder en suspension que les particules de plus petit diamètres. Les solutions sont ensuite neutralisées à l'aide d'acide chlorhydrique pour stopper l'attaque de la silice par la soude et éviter de mettre à nu les nanocristaux organiques ce qui permet de générer parallèlement du sel NaCl présent dans les solutions biologiques.

Les solutions stables de nanoparticules ont été ensuite caractérisées au niveau des propriétés de fluorescence afin de tester les potentialités de ces nouveaux types de traceurs. Ces tests ont été effectués sur les deux molécules organiques les plus étudiés : le CMONS et le COPVB. Elles émettent toutes deux dans la gamme jaune-orange du spectre visible de la lumière. Ces deux fluorophores ont été encapsulés dans les deux matrices définies précédemment et ont subit les mêmes traitements. L'analyse spectroscopique du CMONS nanocristallisé est venue corroborer les observations faites lors de l'étude structurale des nanocristaux par diffractions électronique. En effet, il est apparu que la nature de la matrice silicatée influence fortement son comportement spectroscopique en déplaçant la longueur d'onde d'émission de fluorescence, mais également les durées de vie de fluorescence. Quant au COPVB, il semble être moins sensible à son environnement chimique car il ne présente qu'une seule forme cristalline et possède ainsi des propriétés de luminescence semblable d'une matrice à l'autre. Ces deux premiers fluorophores présentent malheureusement de faibles efficacités moléculaires de fluorescence excitée à deux-photons (σ_{TPA}). Il apparait donc clairement qu'il est nécessaire de chercher de nouveaux fluorophores cristallins plus performants et dont la fluorescence se positionne dans le rouge afin de se situer d'avantage dans la fenêtre biologique où l'absorption et l'autofluorescence des tissus sont faibles.

Avant de tester les traceurs *in-vivo*, une série de tests *in-vitro* ont démontré la non-toxicité des nanoparticules dans une culture cellulaire. La bonne stabilité colloïdale des nanoparticules a été également testée dans le sang. En effet, le sang est un milieu très particulier et il est nécessaire de tester si les particules ne s'agglomèrent pas dès l'injection. Cette série de tests étant très concluante, nous avons ensuite injecté dans le système sanguin du petit animal les solutions de nanoparticules de COPVB cristallin enrobé dans deux types de matrices silicatées. Malheureusement, dans les deux cas, nous n'avons pas obtenu d'image correcte de la microvascularisation du cortex cérébrale de la souris. Après autopsie de l'animal, nous avons pu observer en effet que les nanoparticules étaient stockées dans les organes filtrant tels que les reins et le foie. Logiquement les nanoparticules brutes ne sont donc pas furtives *in-vivo*, il est donc nécessaire de fonctionnaliser la surface des particules pour obtenir une bonne furtivité. Cependant, malgré les faibles σ_{TPA} moléculaire du COPVB dans l'état cristallin, nous avons observé lors de ces autopsies de fortes intensités de fluorescence à deux-photons dues au nombre important de molécules de

COPVB dans les nanocristaux ce qui est très prometteur pour notre approche et le développement futur de ce nouveau type de traceurs *in-vivo*.

Les premiers essais de fonctionnalisation de la surface des nanoparticules ont été entrepris lors des dernières semaines de cette thèse. Nous avons commencé par développer un protocole expérimental de fonctionnalisation en milieu aqueux et à température ambiante pour ne pas dissoudre ou détériorer le cœur organique cristallin. La fonctionnalisation s'effectue en deux temps, avec une première étape consistant à remplacer les fonctions silanols par des fonctions amines ou thiols. Cette étape est d'emblée maitrisée et reproductible. Suite à cela, nous avons fait réagir différents composés, tels que des chaines PEG pour augmenter la furtivité, ou des biomolécules pour ajouter une action de ciblage aux nanoparticules. Les premiers résultats sont prometteurs cependant, nous avons observé une forte diminution de la fluorescence des solutions soit due à des pertes de nanoparticules au cours des lavages successifs, soit à cause du protocole chimique expérimental. En effet, cette étape a été faite dans des tampons biologiques tels que le TRIS ou le PBS dont les ions peuvent venir parasiter la surface des particules et inhiber la fluorescence. Il faudrait donc pour la suite effectuer cette deuxième étape dans l'eau uniquement pour contourner le risque de contamination de la surface par des ions. Une autre solution est à présent envisagée afin d'éviter les pertes: effectuer en une seule étape la fonctionnalisation des particules en greffant un alcoxyde de silicium portant une chaîne PEG directement sur les particules.

Le développement de nanoparticules hybrides très fluorescentes comme agent imageant *in-vivo* semble prometteur. En effet, le cœur cristallin organique est composé d'une grande quantité de molécules ce qui lui confère des sections efficaces d'absorption et d'émission de fluorescence importantes et une bonne photostabilité. De plus, la coquille silicatée amorphe semble être facilement fonctionnalisable pour augmenter significativement la furtivité des particules et ainsi permettre d'imager la microvascularisation du cortex cérébral de la souris. La technique de synthèse étant générique, il faut donc dorénavant tester de nouveaux fluorophores cristallins très efficaces en fluorescence excitée à deux-photon et qui émettent dans le rouge. D'autre part, il faudra optimiser la fonctionnalisation afin d'obtenir des nanoparticules furtives et photostables présentant de bonnes propriétés de ciblage de tumeurs cancéreuses. Ceci devrait permettre d'envisager un suivi thérapeutique par l'évolution de la microvascularisation de ces tumeurs par angiographie de fluorescence d'absorption à deux-photons.

Durant ce travail de thèse, nous avons également inséré dans les matrices silicatées des complexes de lanthanides à l'état dispersé cette fois-ci. Dans ce cas, nous ne jouons pas sur le nombre de molécules incérées dans la matrice silicatée mais sur les sections efficaces d'absorption et d'émission très élevées des complexes de lanthanides pour obtenir des traceurs très luminescents *in-vitro*. Ces composés ont des propriétés de luminescence très intéressantes, un déplacement de Stokes important et une émission dans le rouge (complexe d'europium) et dans le proche infrarouge (complexe d'ytterbium). De plus, ces composés ont des durées de vie de luminescence longues ce qui permet de les utiliser pour imager en luminescence retardée afin de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus. Cependant, ils sont très sensibles à l'eau par dissociation partielle des ligands, ce qui détériore leurs propriétés de luminescence. Nous avons pu tester les deux matrices sol-gel 2 TMOS + 1 TMSE et 8 TMOS + 1 BTP pour stabiliser les complexes de lanthanides lors de la mise en solution des nanoparticules. Dans un premier temps, nous avons dispersé un complexe d'europium dans la matrice sol-gel 2 TMOS + 1 TMSE. Une fois les nanoparticules mises en solution la luminescence diminue fortement signifiant que le complexe se détériore au contact de l'eau. Cette matrice n'assure donc pas sa stabilité. Nous avons ensuite utilisé la deuxième matrice 8 TMOS + 1 BTP. Cette fois-ci les particules dispersées en milieux aqueux présentent une luminescence parfaitement constante. Cette matrice garantit donc la stabilité du complexe d'europium en milieu aqueux ce qui nous ouvre des perspectives d'utilisations comme agent imageant *in-vitro* dans le rouge mais également dans le proche IR. En effet, nous avons transposé le procédé d'élaboration pour disperser un complexe d'ytterbium émettant dans le proche IR. Les résultats obtenus en toute fin de thèse montrent également une très bonne stabilité en milieu aqueux pour ce complexe inséré en nanoparticules silicatées à porosité fermée. Ceci permet d'envisager à présent des perspectives d'imagerie *in-vitro* dans le proche IR.

Annexes

SOMMAIRE DES ANNEXES

Annexe I :

Exemples de calculs pour préparer les solutions sol-gel à nébuliser ……..…. V

Annexe II :

RMN liquide du proton du CMONS ……..……..…VIII

Annexe III :

MET à froid ……...…….....IX

Annexe IV :

Indexation d hkl des polymorphes du CMONS ……..……..…. XIII

Annexe V :

RMN liquide du proton du COPVM ……...…….…… XVIII

Annexe VI :

Zêtamétrie ……...……..... XIX

Annexe VII :

Spectroscopie de corrélation de photons ……..…..... XXI

Annexe VIII :

Spectroscopie de fluorescence à 1 photon : théorie et dispositifs..... XXII

Annexe IX :

Spectroscopie de fluorescence à 2 photons : théorie et dispositifs …….…. XXXII

Exemples de calculs pour préparer des solutions sol-gel nébulisées

Solution sol-gel 2 TMOS + 1 TMSE avec du CMONS

- Paramètres chimiques fixes

Solvant : THF

Fluorophore : CMONS

Taux de solvant : s = 500

Taux de fluorophore : d = 0,1

Matrice : 2 TMOS + 1 TMSE

Catalyse acide à 60°C

Taux d'hydrolyse : $h^+ = 1$

- Mode opératoire pour un volume de solution de 60 ml

d= 0,1

catalyse acide - matrice TMSE/TMOS - CMONS

Données sur les produits :

	CMONS	TMSE	TMOS	THF	HCl
M (g/mol)	280	270,1	152,22	72,11	18
d (g/cm3)		1,06	1,032	0,88	1
volume fixé (cm3)		0,222			

	CMONS	TMSE	TMOS	THF	HCl
nbre moles		1	2		
h					1
s				500	
d	1,00E-01				
masse à peser (mg)	**73,2**				
volume à prélever (cm3)		**0,222**	**0,257**	**107,087**	**0,220**

Vtotal (cm3)= 107,786 pH= 1,61

On veut un Vtot de 60 cm3

	0,124	**0,143**	**59,611**	**0,122**

Vtot(verif) cm3 = 60,000

masse de CMONS pour 60 cm3

40,74 mg

On fixe le volume de TMSE à V_{TMSE} = 0,222 ml car on le considère comme le réactif limitant de l'hydrolyse/condensation du réseau silicaté.

Calcul de la masse de CMONS : $d = \frac{[CMONS]}{[Si]}$

soit [Si] la concentration molaire en alcoxyde de silicium

$$[CMONS] = d \cdot [Si] \quad \leftrightarrow \quad \frac{m_{CMONS}}{M_{CMONS} \cdot V_{TOT}} = d \cdot \frac{n_{Si}}{V_{TOT}}$$

$n_{Si} = n_{TMOS} + n_{TMSE}$ et $n_{TMOS} = 2.n_{TMSE}$ donc $n_{Si} = 3.n_{TMSE}$

$$m_{CMONS} = d \cdot 3 \cdot n_{TMSE} \cdot M_{CMONS} \quad \leftrightarrow \quad \boxed{m_{CMONS} = d \cdot 3 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}} \cdot M_{CMONS}}$$

Calcul du volume de TMOS : on a vu que $n_{TMOS} = 2*n_{TMSE}$

$$\frac{V_{TMOS} \cdot \rho_{TMOS}}{M_{TMOS}} = 2 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}} \quad \leftrightarrow \quad \boxed{V_{TMOS} = 2 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}} \cdot \frac{M_{TMOS}}{\rho_{TMOS}}}$$

Calcul du volume de solvant THF : $s = \frac{[THF]}{[Si]}$

$$[THF] = s \cdot [Si] \quad \leftrightarrow \quad \frac{n_{THF}}{V_{TOT}} = s \cdot \frac{n_{Si}}{V_{TOT}}$$

$n_{Si} = n_{TMOS} + n_{TMSE}$ et $n_{TMOS} = 2.n_{TMSE}$ donc $n_{Si} = 3.n_{TMSE}$

$$n_{THF} = s \cdot 3 \cdot n_{TMSE} \quad \leftrightarrow \quad \frac{V_{THF} \cdot \rho_{THF}}{M_{THF}} = s \cdot 3 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}}$$

$$\boxed{V_{THF} = s \cdot 3 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}} \cdot \frac{M_{THF}}{\rho_{THF}}}$$

Calcul du volume d'eau (on assimile ici l'HCl à l'eau): $h = \frac{[H_2O]}{[-OR]}$

-OR correspond aux groupements hydrolysables des alcoxydes de silicium, il y en a 6 pour le TMSE et 4 pour le TMOS.

$$[H_2O] = h \cdot [-OR] \quad \leftrightarrow \quad \frac{n_{H_2O}}{V_{TOT}} = h \cdot \frac{n_{-OR}}{V_{TOT}}$$

$n_{-OR} = 4*n_{TMOS} + 6*n_{TMSE}$ et $n_{TMOS} = 2.n_{TMSE}$ donc $n_{-OR} = 14*n_{TMSE}$

$$n_{H_2O} = h \cdot 14 \cdot n_{TMSE} \quad \leftrightarrow \quad \frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} = h \cdot 14 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}}$$

$$V_{H_2O} = h \cdot 14 \cdot \frac{V_{TMSE} \cdot \rho_{TMSE}}{M_{TMSE}} \cdot \frac{M_{H_2O}}{\rho_{H_2O}}$$

Au final, la solution a un volume total de 107,8 ml, on ramène donc les valeurs pour avoir un volume final de 60 ml.

Solution sol-gel 8 TMOS + 1 BTP avec du COPVB

- Paramètres chimiques

Solvant : THF

Fluorophore : COPVB

Taux de solvant : s = 500

Taux de fluorophore : d = 0,025

Matrice : 8 TMOS + 1 BTP

Catalyse acide à 60°C

Taux d'hydrolyse : $h^+ = 1$

- Mode opératoire pour un volume de solution de 60 ml

d= 0,025

catalyse acide - matrice PEG/TMOS - fluo

Données sur les produits :

	COPVB	PEG	TMOS	THF	HCl
M (g/mol)	666	474	152,22	72,11	18
d (g/cm3)		1,06	1,032	0,88	1
volume fixé (cm3)		0,222			

	CMONS	PEG	TMOS	THF	HCl
nbre moles		1	8		
h					1
s				500	
d	2,50E-02				
masse à peser (mg)	**74,4**				
volume à prélever (cm3)		**0,222**	**0,586**	**183,065**	**0,340**

Vtotal (cm3)= 184,213 pH= 1,66

On veut un Vtot de 60 cm3

0,072	**0,191**	**59,626**	**0,111**

Vtot(verif) cm3 = 60,000

masse de CMONS pour 60 cm3

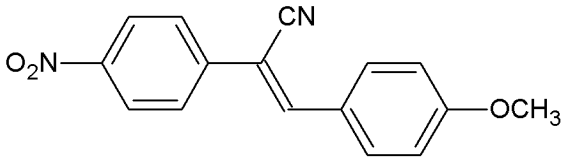
24,23 mg 0,27355909

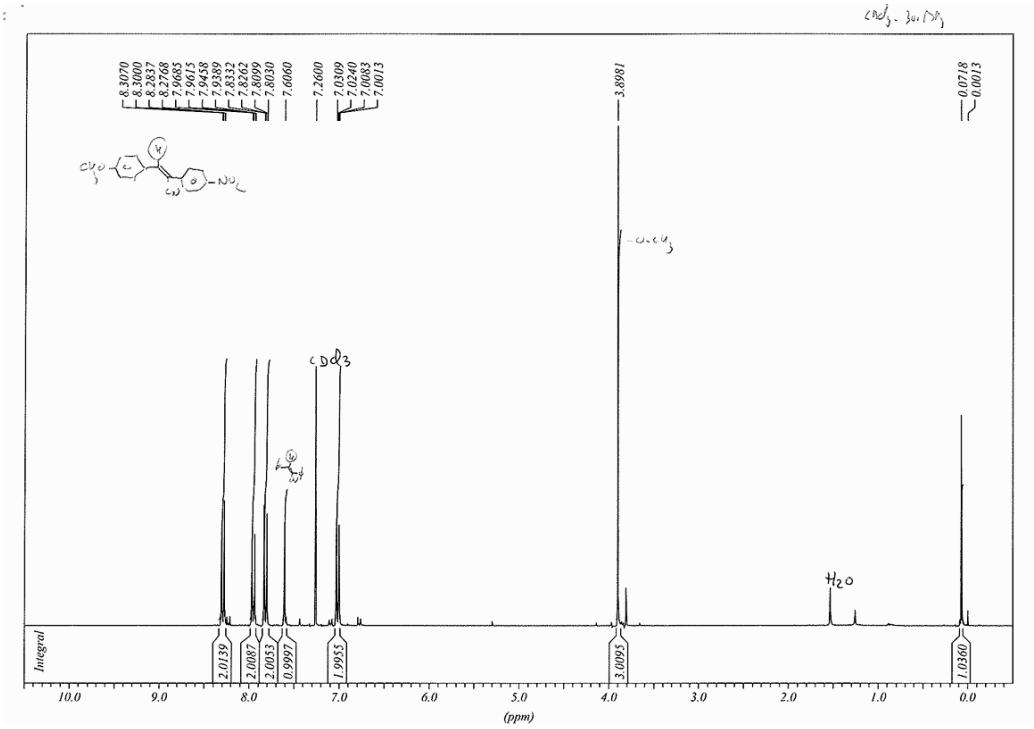
Les mêmes calculs sont appliqués en tenant compte de la modification de la contribution moléculaire des deux alcoxydes. Le BTP joue ici le rôle d'alcoxyde limitant, donc son volume est fixé pour les calculs.

RMN liquide du proton du CMONS

^{1}H RMN (350 MHz, $CDCl_3$)

δ 3,898 (0-**CH_3**, s, 3H) ; 7,001 (**Ar**, d, 2H) ; 7,606 (Ar-**CH**=C(CN), s, 1H); 7,803 (**Ar**, d, 2H); 7,945 (**Ar**, d, 2H); 8,300 (**Ar**, d, 2H).





Microscopie électronique à transmission à froid et diffraction électronique

- Principe et figure de diffraction

La diffraction électronique est une technique utilisée pour l'étude de la matière qui consiste à bombarder d'électrons un échantillon et à observer la figure de diffraction résultante. Les électrons sont accélérés par un potentiel électrostatique afin d'atteindre l'énergie désirée et donc la longueur d'onde requise avant qu'ils interagissent avec l'échantillon à étudier. La structure périodique d'un solide cristallin agit comme un réseau de diffraction optique, diffusant les électrons de manière prédictive. En travaillant à partir du schéma de diffraction observé, il peut être possible de déduire la structure du cristal à l'origine de cette diffraction. Dans ce cas, on s'intéresse uniquement à la diffraction des électrons. Pour cela, on se place dans le plan focal de la lentille objectif et non plus dans le plan image, simplement en changeant le courant dans la lentille intermédiaire (figure 1).

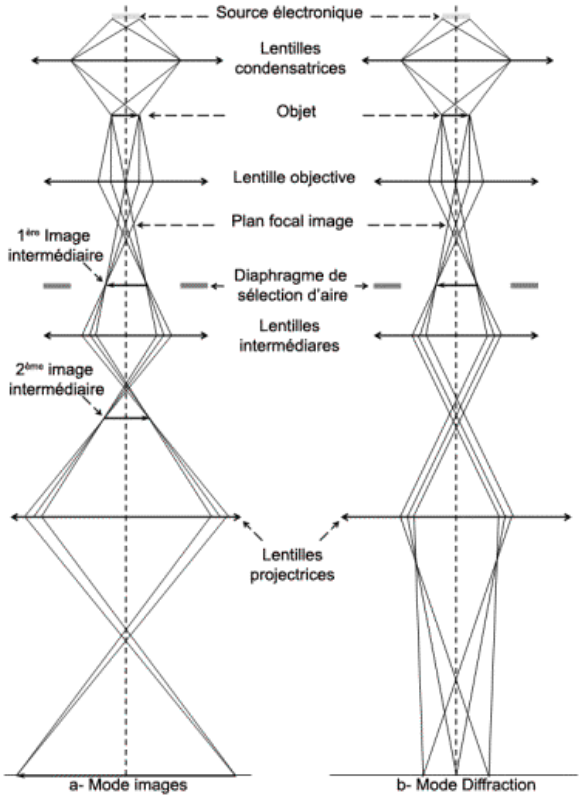


Figure 1 - Schéma de fonctionnement du MET en mode image (a) ou diffraction (b)

Le diaphragme de sélection d'air, situé dans le plan image de la lentille objectif, permet de sélectionner la partie de l'objet qui participe au diffractogramme. Cette sélection s'effectuant en mode image, on peut choisir la zone à étudier. Il est alors possible d'observer la diffraction provenant de zones différentes de l'échantillon. De plus, dans un MET, un grain cristallin ou une particule cristalline peut être sélectionné spatialement pour l'expérience de diffraction. Les expériences de diffraction peuvent donc être menées sur des cristaux de taille nanométrique alors que d'autres techniques de diffraction (comme les rayons X) se limitent à l'étude de la diffraction produite à partir d'un échantillon macroscopique : poudre ou monocristal.

La diffraction électronique correspond à la diffusion élastique des électrons par un ensemble périodique d'atomes. Soit le vecteur d'onde $\vec{k}_0$ tel que $\left|\vec{k}_0\right| = 1/\lambda$, il y aura diffraction dans les directions données par l'intersection d'une sphère de rayon 1/λ, appelée sphère d'Ewald, avec les sphères de rayon $\left|\vec{k}_{hkl}\right| = 1/d_{hkl}$ définissant les nœuds du réseau réciproque, l'origine du réseau réciproque étant placé à l'extrémité du vecteur d'onde incident $\vec{k}_0$ (figure 2).

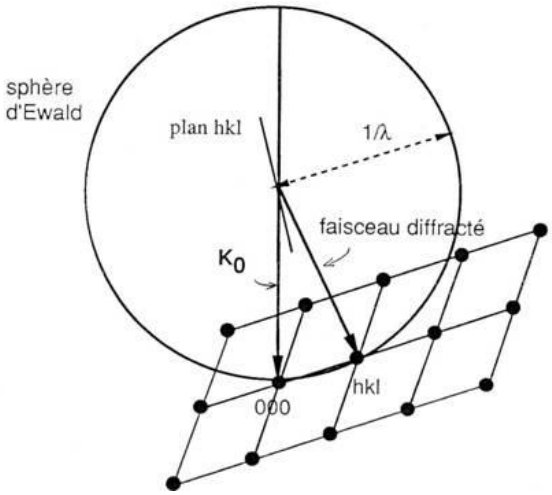


Figure 2 - Schéma de la sphèred'Ewald et du réseau réciproque

Dans le cas de la diffraction électronique, les longueurs d'onde utilisées sont très petites par rapport aux paramètres cristallins usuels : $1 >> \lambda/d_{hkl}$. Pour une tension

d'accélération de 300 kV, la longueur d'onde est de 0,00196 nm. Le rayon de la sphère d'Ewald est donc très grand devant les paramètres du réseau réciproque (de l'ordre de 100 fois plus grand). On peut considérer que, dans le domaine où les réflexions ont une intensité appréciable, la sphère d'Ewald peut être assimilée à son plan tangent (figure 3).

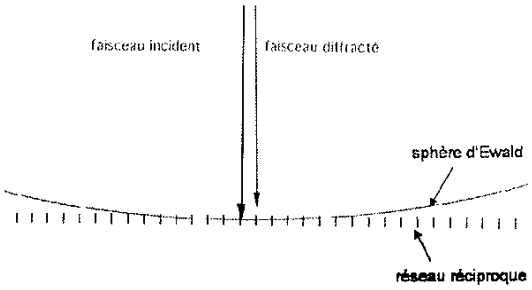


Figure 3 - Sphère d'Ewald assimilée à son plan tangent en diffraction électronique

De plus, comme le rayon de la sphère d'Ewald est grand devant la distance séparant les plans du réseau réciproque, celle-ci peut couper plusieurs plans parallèles du réseau réciproque. Ils apparaîtront sous formes de zones circulaires concentriques appelées zones de Laue (figure 4). Les zones de Laue sont nommées suivant leur rayon par rapport à la tâche centrale : ainsi, la zone centrale est appelée zone de Laue d'ordre 0, la première couronne de tâches zone de Laue d'ordre 1… etc.

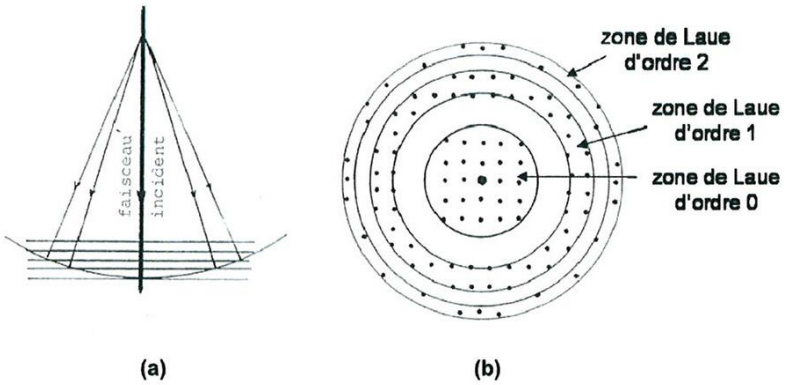


Figure 4 - Sphère d'Ewald coupant plusieurs plans du réseau réciproque (a) et figure de diffraction correspondante (b)

L'observation des zones de Laue sur les figures de diffraction nous permet de savoir si la direction du faisceau incident est perpendiculaire à une famille de plans réticulaires du réseau réciproque. Si tel est le cas, les zones de Laue sont centrées sur la tâche centrale, correspondant au faisceau incident et la figure de diffraction est parfaitement symétrique (figure 4-a) : on dit alors que le faisceau incident est orienté suivant l'axe de zone. Si par contre, le cristal est légèrement désorienté par rapport à un axe de zone, la figure de diffraction ne sera plus symétrique et les zones de Laue ne seront plus centrées sur le faisceau incident.

Indexation d hkl des polymorphes du CMONS

Le CMONS a trois polymorphes cristallins tous monocliniques, tableau 1.

	Forme a	Forme b	Forme c
Structure	monoclinique	monoclinique	monoclinique
Groupe d'espace	CC	CC	$P2_1/n$
a (Å)	3,859(1)	4,6002(7)	3,814(1)
b (Å)	30,971(5)	31,947(4)	12,371(3)
c (Å)	11,346(2)	9,511(1)	28,132(5)
β (°)	91,17(2)	92,81(1)	91,50(2)
Volume de la maille ($Å^3$)	1355,7(4)	1396,1(3)	1327,1(6)
références	[32]	[32]	[22, 23, 32]

Tableau 1 - Paramètres de maille des polymorphes du CMONS

Les indexations d hkl corespondantes sont listées ci-après.

Forme a Groupe d'espace: CC

GSH fort **jaune citron**

a	b	c	**h+k=2n**
3.859	30.971	11.346	**k=0, l=2n**

alpha	beta	gamma
90.00	91.17	90.00

h	k	l	dhkl
0	2	0	15.486
0	2	1	9.151
0	4	0	7.743
0	4	1	6.395
0	0	2	5.672
0	2	2	5.326
0	6	0	5.162
0	6	1	4.698
0	4	2	4.576
0	8	0	3.871
1	1	0	3.829
0	6	2	3.818
0	2	3	3.673
0	8	1	3.664
1	1	-1	3.650
1	3	0	3.614
1	1	1	3.605
1	3	-1	3.463
1	3	1	3.425
0	4	3	3.398
1	5	0	3.275
1	1	-2	3.204
0	8	2	3.198
1	5	-1	3.161
1	1	2	3.144
1	5	1	3.132
0	10	0	3.097
1	3	-2	3.075
0	6	3	3.050
1	3	2	3.022
0	10	1	2.988
1	7	0	2.908
1	5	-2	2.858
0	0	4	2.836
1	7	-1	2.827
1	5	2	2.815

Forme b Groupe d'espace: CC

GSH faible **orange**

a	b	c	**h+k=2n**
4.600	31.947	9.511	**k=0, l=2n**

alpha	beta	gamma
90.00	92.81	90.00

h	k	l	dhkl
0	2	0	15.974
0	2	1	8.165
0	4	0	7.987
0	4	1	6.113
0	6	0	5.325
0	0	2	4.750
0	6	1	4.645
0	2	2	4.553
1	1	0	4.548
1	3	0	4.219
1	1	-1	4.182
0	4	2	4.082
1	1	1	4.027
0	8	0	3.993
1	3	-1	3.922
1	3	1	3.793
1	5	0	3.730
0	8	1	3.681
0	6	2	3.544
1	5	-1	3.520
1	5	1	3.426
1	1	-2	3.368
1	7	0	3.238
1	3	-2	3.227
1	1	2	3.208
0	10	0	3.195
0	2	3	3.106
1	7	-1	3.098
1	3	2	3.086
0	8	2	3.057
1	7	1	3.033
0	10	1	3.028
1	5	-2	2.992
0	4	3	2.944
1	5	2	2.879
1	9	0	2.809

Forme c Groupe d'esapce: P21/N

Pas GSH **jaune foncé**

a	b	c	**k=0, h+l=2n**
3.814	12.371	28.132	**h=0, l=0, k=2n**

alpha	beta	gamma
90.00	91.50	90.00

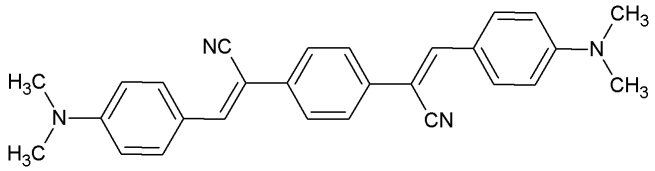
h	k	l	dhkl
0	0	2	14.061
0	1	1	11.324
0	1	2	9.288
0	1	3	7.471
0	0	4	7.031
0	2	0	6.186
0	1	4	6.112
0	2	1	6.041
0	2	2	5.662
0	2	3	5.163
0	1	5	5.120
0	0	6	4.687
0	2	4	4.644
0	1	6	4.383
0	2	5	4.161
0	3	1	4.080
0	3	2	3.957
0	1	7	3.821
1	0	-1	3.791
0	3	3	3.775
1	0	1	3.765
0	2	6	3.736
1	1	0	3.644
1	1	-1	3.625
1	1	1	3.602
1	0	-3	3.564
0	3	4	3.557
1	1	-2	3.549
0	0	8	3.515
1	1	2	3.506
1	0	3	3.500
1	1	-3	3.425
0	1	8	3.381
0	2	7	3.369
1	1	3	3.368
0	3	5	3.326
1	1	-4	3.269

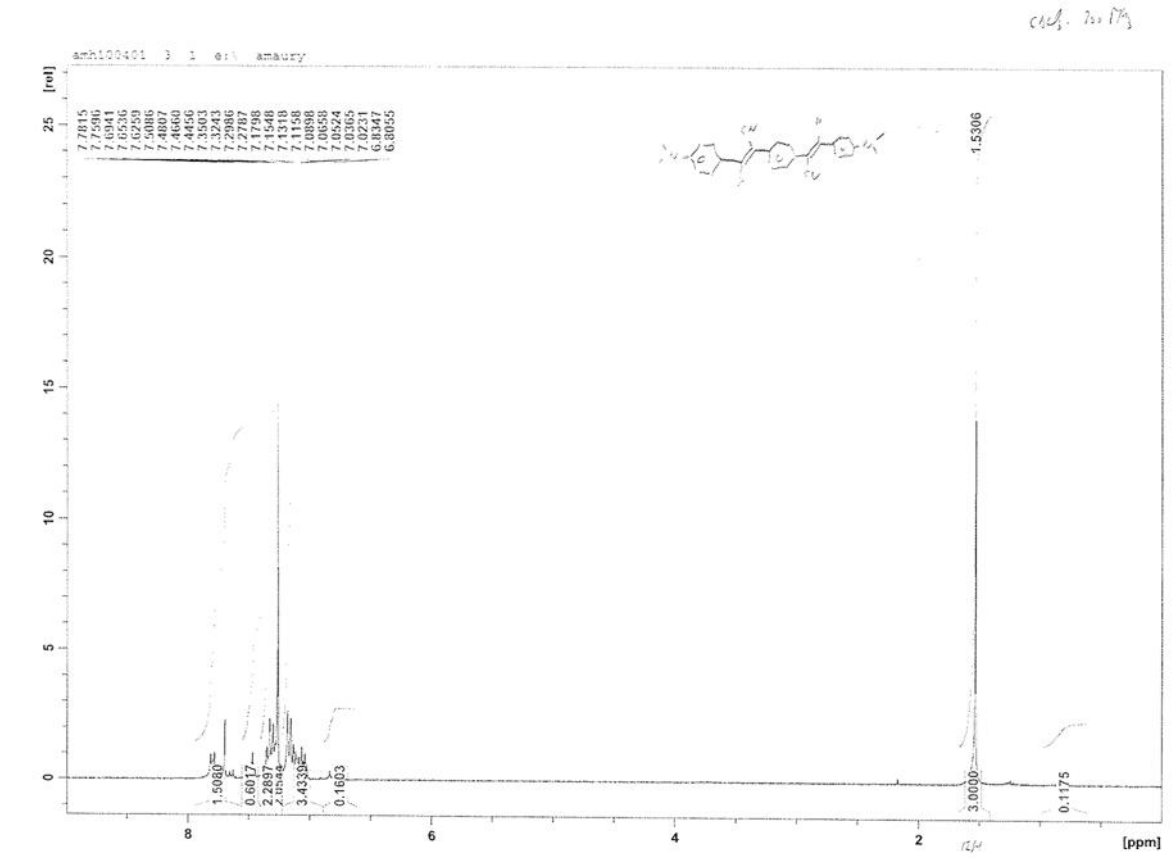
1	2	0	3.246
1	2	-1	3.232
1	2	1	3.216
1	1	4	3.202
1	0	-5	3.195
1	2	-2	3.178
1	2	2	3.147
1	0	5	3.118
0	3	6	3.096
1	1	-5	3.094
0	4	0	3.093
1	2	-3	3.088
0	4	1	3.074
0	2	8	3.056
1	2	3	3.046
0	1	9	3.030
1	1	5	3.024
0	4	2	3.021
1	2	-4	2.972
0	4	3	2.937
1	2	4	2.922
1	1	-6	2.912
0	3	7	2.878
1	1	6	2.842
1	2	-5	2.839
0	4	4	2.831
0	0	10	2.812

RMN liquide du proton du COPVM

^{1}H RMN (350 MHz, $CDCl_3$)

δ 1,531 (N-**CH_3**, s, 12H); 7,023-7,350 (**Ar**, m, 8H); 7,694 (Ar-**CH**=C(CN)-Ar, s, 2H), 7,811 (**Ar**, d, 4H)





Zêtamétrie

Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique existant au niveau de la surface des particules en suspension au sein d'un milieu liquide. Il permet de caractériser la charge électrique au voisinage de la surface de la particule en fonction de son environnement. En milieu liquide, les charges de surfaces sont essentiellement liées à la présence de groupements chimiques ioniques ou de tensioactifs ioniques adsorbés à la surface des particules. Les charges de surface affectent la distribution ionique au niveau de l'interface particule-liquide. Une augmentation de la concentration en contre-ions est observée et conduit à la formation d'une double couche électrique autour de chaque particule (figure 1). La première couche directement liée à la surface des nanoparticules est formée de groupements silanols ionisés, tandis que la seconde couche externe constituée de contre-ions (cations Na^+, H^+) compensant partiellement les charges de surfaces, elle présente une distribution ionique déterminée par les forces électriques et par les mouvements Brownien.

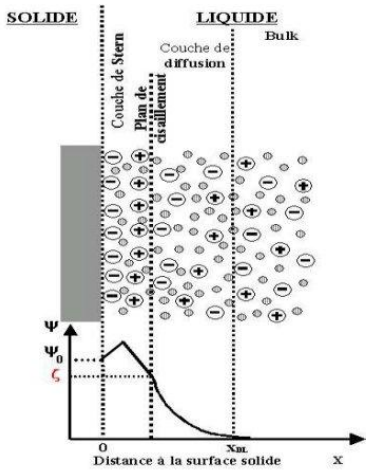


Figure 1 - Représentation schématique de la double couche électrique autour de la particule et de l'évolution du potentiel électrique en fonction de la distance à la particule

L'interface entre la première et seconde couche est nommée plan interne d'Helmoltz (IHP) tandis que l'interface entre la seconde couche et la solution est appelée couche externe d'Helmoltz (OHP). C'est au niveau de cette dernière interface que le potentiel zêta ξ sera mesuré, cette interface constitue un plan glissant. La structure des deux premières couches reste stable par rapport à la nanoparticule.

D'un point de vu expérimental, il existe plusieurs façons de déterminer le potentiel zêta. Les méthodes les plus courantes sont les techniques électrocinétiques qui provoquent le déplacement tangentiel relatif d'une phase solide par rapport à une phase liquide. La zêtamétrie est une technique électrocinétique qui permet de déterminer le potentiel zêta des particules en suspension en appliquant un champ électrique. Pour la suite, nous supposerons que la symétrie de la double couche électrochimique est conservée lors du mouvement des particules. Ces dernières sont considérées comme sphériques et suffisamment éloignées les unes des autres afin de pouvoir négliger les interactions entre les doubles couches. Il a été montré que la vitesse v des particules est proportionnelle au champ électrique appliqué E :

$$\vec{v} = \mu_e \vec{E} \qquad (1)$$

où μ_e représente la mobilité électrophorétique des particules. L'équation 3 permet de relier la mobilité électrophorétique μ_e au potentiel zêta [ref] :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta} \cdot f_1(\kappa_a) \qquad (3)$$

où $f_1(Ka)$ est une fonction qui dépend de la taille a de la particule et de la longueur de Debye, $K.f_1(Ka)$ qui est comprise entre 1 et 3/2. ε_0 représente la permittivité du vide, ε_r la permittivité du fluide et η sa viscosité.

Lorsque le rayon de la particule est grand devant l'épaisseur de la double couche (Ka >> 1), les lignes de champ électrique sont suposées parallèles à la surface de la particule. La fonction $f_1(Ka)$ vaut alors 3/2 et la mobilité électrophorétique se réduit à:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta} \qquad (3)$$

Lorsque Ka est très inférieur à 1 (Ka << 1), l'étendue de la double couche est grande devant le rayon de la particule, les lignes de champs électriques sont faiblement perturbées par la présence de la particule. Dans ce cas, $f_1(Ka)$ vaut 1 et la mobilité électrophorétique s'exprime selon l'équation suivante :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta} \qquad (4)$$

Spectrométrie de corrélation de photons (PCS)

Le principe de la spectroscopie de corrélation de photons est de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en suspensions en mesurant les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par les particules agitées par le mouvement brownien. Pour cela, un échantillon est illuminé par un faisceau de lumière cohérent et monochromatique (laser). Le signal enregistré est ensuite traité par le corrélateur. La fonction d'auto-corrélation obtenue représente la probabilité de retrouver une particule à un instant t + τ au même point de l'espace où elle se trouvait à l'instant t. Compte tenu de l'effet du mouvement brownien, cette probabilité diminue avec la taille de la particule. C'est pourquoi, l'incrément de temps τ utilisé diminue avec la taille des particules. La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion translationnel D qui, d'après l'équation de Stokes-Einstein, éq. 1, est lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule sphérique.

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \qquad (1)$$

Avec : d_h : diamètre hydrodynamique (nm), k : constante de Boltzmann, T : température absolue, η : viscosité du solvant (cP) et D : coefficient de diffusion

La diffusion de la lumière du faisceau incident est caractérisée par le vecteur q, défini comme le vecteur différence entre les vecteurs d'onde incident et diffusé, et de module:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0}\sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \qquad (2)$$

Avec : n : indice de réfraction du milieu de dispersion, λ_0 : longueur d'onde du laser et θ : angle d'observation

Le coefficient de diffusion est obtenu grâce à la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée G(τ):

$$G(\tau) = \langle I(t) \bullet I(t+\tau) \rangle = A[1 + B \bullet \exp(-2Dq^2\tau)] \qquad (3)$$

Avec : A : constante indépendante du temps, proportionnelle à l'intensité, B : coefficient lié à l'appareillage (≤ 1), D : coefficient de diffusion, q : module du vecteur d'onde diffusée et τ : incrément de temps.

Spectroscopie de fluorescence à un photon : théorie et dispositifs expérimentaux

1. Emission de fluorescence à un photon

1.1. Processus de photoluminescence moléculaire

La photoluminescence est un phénomène qui se traduit par l'émission de photons par une molécule, ou un ensemble de molécules (cristaux), qui ont été irradiés par un faisceau lumineux. La photoluminescence englobe deux processus : la fluorescence et la phosphorescence. C'est Francis Perrin qui présenta la première distinction théorique entre fluorescence et phosphorescence : dans le cas de la phosphorescence les molécules excitées passent par un état intermédiaire, appelé état triplet, avant d'émettre des photons, contrairement à la fluorescence qui ne passe pas par cet état intermédiaire. Le diagramme de Jablonski représenté sur la figure 1 permet d'illustrer les différents modes de désexcitation d'une molécule. Chaque niveau d'énergie (en gras sur la figure 1) correspond à une configuration électronique, c'est-à-dire au remplissage des orbitales moléculaires par les électrons de valence de la molécule. Les traits fins correspondent à des niveaux vibrationnels. Une transition entre deux niveaux d'énergie correspond au passage d'un électron d'une orbitale à une autre. La transition de plus basse énergie qui conduit à la formation d'un état excité de la molécule, correspond au passage d'un électron de l'orbitale moléculaire occupée d'énergie la plus élevée (HOMO) à l'orbitale moléculaire vacante d'énergie la plus basse (LUMO).

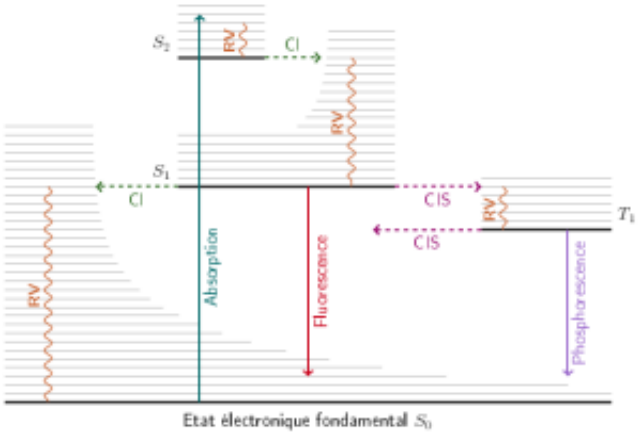


Figure 1 - Diagramme de Perrin-Jablonski.

Le processus d'absorption d'un photon par une molécule transfère un électron du niveau fondamental (S_0) sur un niveau excité singulet S_n. La molécule se désexcite rapidement vers l'état de vibration le plus bas du premier niveau excité S_1 : ce processus associe conversion interne (C.I.) et relaxation vibrationnelle. A partir du niveau S_1, plusieurs évolutions sont alors possibles :

- La molécule retourne vers l'état fondamental S_0 et émet un photon de **fluorescence**. La durée de vie de l'état excité S_1 d'une molécule fluorescence, appelée également fluorophore, varie typiquement de 10^{-10}s à 10^{-7}s.
- La molécule transite vers l'état triplet T_1 par une transition non radiative appelée croisement inter-système (C.I.S.). Le retour de T_1 à S_0 peut alors s'accompagner de l'émission d'un photon de **phosphorescence**. Signalons que la probabilité de passage de S_1 vers T_1 est nettement plus faible que la désexcitation radiative S_1 vers S_0. Les durées de vie de la phosphorescence s'échelonnent typiquement de 10^{-6}s à 1s.
- La molécule revient dans son état fondamental **sans émission de photons**. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule.

La grande sensibilité des molécules fluorescentes à leur environnement (pH, viscosité de la solution, température, interaction avec d'autres molécules…) explique leurs nombreuses applications au niveau de la détection et des dosages à l'aide de sondes fluorescentes : dosage d'anticorps, puces à ADN, mais aussi pour l'exploration de la matière inanimées ou vivantes à l'aide de sondes fluorescentes : visualisation de cellules ou de membranes biologiques. Cette propriété est aussi utilisée pour les marquages de sécurité de documents, comme dans le cas des billets de banque, et en criminologie.

1.2. Spectres de fluorescence et d'absorption

Les conversions internes et la dispersion d'énergie vibrationnelle qui se produisent lors de la désexcitation d'une molécule sont à l'origine de pertes d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. C'est pour cela que le spectre

de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus grandes que le spectre d'absorption. Ce phénomène est appelé déplacement de Stokes.

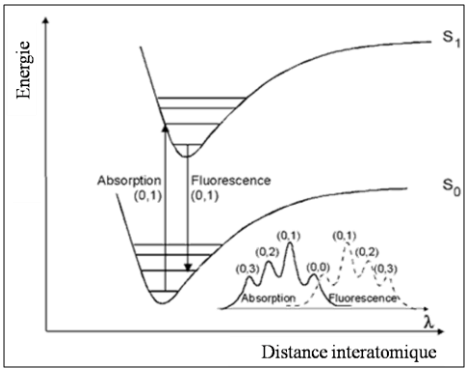


Figure 2 - Transitions électroniques et spectres d'absorption et d'émission

Selon la règle de Kasha, la fluorescence se produit toujours à partir de l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité S_1 (Figure 2). Selon le principe de Franck-Condon, les noyaux restent immobiles pendant la transition électronique. La molécule va donc suivre sur le graphique un chemin vertical sans variation de distance interatomique (figure 2). Il est à noter que la transition 0 → 0, c'est-à-dire entre niveaux vibrationnels les plus bas, est souvent la plus intense car il y a un bon recouvrement des fonctions d'onde vibrationnelles 0 et 0. Généralement, le spectre d'émission de fluorescence sera donc une image inversée du spectre d'absorption car les écarts d'énergie entre les niveaux vibrationnels sont du même ordre de grandeur dans S_0 et S_1 (figure 2). Les spectres d'absorption et d'émission sont donc caractéristiques d'une molécule.

1.3. Durée de vie de fluorescence

L'émission et l'absorption d'un photon sont aussi rapides l'une que l'autre : de l'ordre de 10^{-15} s. Cependant, les molécules excitées restent un certain temps dans l'état S_1, 10^{-11} à 10^{-7} s, avant d'émettre un photon et/ou de se désexciter. Ainsi, après l'excitation d'une population de molécules par une impulsion de lumière très brève, l'intensité de fluorescence décroît exponentiellement avec un temps caractéristique qui reflète la durée de vie moyenne des molécules à l'état excité S_1. Deux vitesses de désexcitation des molécules à l'état S_1 peuvent être définies : une radiative k_r, associée à la fluorescence, et une non radiative k_{nr}. Par la suite, nous considérerons que k_{nr} englobe les probabilités de tous les processus non radiatifs en prenant en compte

également les processus de conversion interne et de passage vers l'état triplet (croisement inter-système).

Soit un échantillon constitué de molécules fluorescentes de concentration [M] (en mol/L). Si on excite cet échantillon, au temps t = 0, par une impulsion très brève, idéalement un pic de Dirac, un certain nombre de molécule M vont passer dans l'état S_1 par absorption de photons. Les molécules dans l'état S_1 sont notées M*. Ces molécules vont ensuite retourner dans l'état S_0 par un processus radiatif ou non radiatif. La vitesse de disparition des molécules excitées s'exprime par l'équation différentielle (2) :

$$-\frac{d[M*]}{dt} = (k_r + k_{nr}) \cdot [M*] \qquad (2)$$

Soit $[M^*]_0$ la concentration en molécules excitées à l'instant t = 0 résultant de l'excitation impulsionnelle. L'intégration de l'équation (2) conduit à l'évolution temporelle de la concentration en molécules excitées :

$$[M^*] = [M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \text{ avec } \tau_S = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \qquad (3)$$

Il y a donc une décroissance exponentielle de M* et par conséquent une décroissance exponentielle du nombre de photons émis (figure 3-a). L'intensité de fluorescence varie donc selon la loi:

$$i_F(t) = i_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \qquad (4)$$

Avec i_F (t) l'intensité de fluorescence à l'instant t et i_0 l'intensité de fluorescence après l'excitation.

Généralement, on représente plutôt le logarithme de l'intensité en fonction du temps (figure 3-b). Un déclin monoexponentiel apparaitra donc comme une droite dont la pente $1/\tau_S$ est l'inverse de la durée de vie du niveau excité. Par abus de langage, τ_S est appelé durée de vie de fluorescence, même s'il comprend aussi les processus de désexcitation non radiatif.

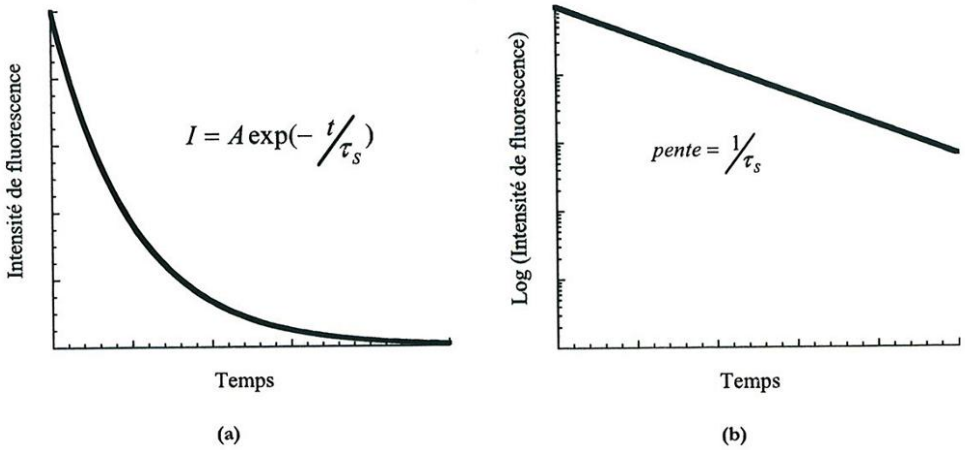


Figure 3 - Représentation en échelle linéaire (a) et logarithmique (b) d'un déclin de fluorescence

1.4. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence moléculaire Θ_F, compris entre 0 et 1, est le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excitées. Il s'exprime à l'aide des constantes de vitesse de la façon suivante :

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau_S \qquad (5)$$

En d'autres termes, c'est le rapport entre le nombre de photons émis (sur toute la durée du déclin de l'émission) et le nombre de photons absorbés. Il peut être estimé pour une espèce inconnue en utilisant une molécule fluorescente de référence :

$$\frac{\phi_F}{\phi_{FR}} = \frac{n_F^2}{n_{FR}^2} \cdot \frac{\int_0^\infty F_F(\lambda_F)d\lambda_F}{\int_0^\infty F_{FR}(\lambda_{FR})d\lambda_{FR}} \qquad (6)$$

Avec : $Ø_F$ le rendement quantique du fluorophore, n_F l'indice du solvant utilisé pour le fluorophore, $\int_0^\infty F_F(\lambda_F)d\lambda_F$ l'intégrale du spectre d'émission en énergie (cm^{-1}), $Ø_{FR}$ le rendement quantique de la référence, n_{FR} l'indice du solvant utilisé pour la référence et $\int_0^\infty F_{FR}(\lambda_F R)d\lambda_{FR}$ l'intégrale du spectre d'émission en énergie (cm^{-1}).

Dans le cas où les solvants utilisés pour le fluorophore inconnu et les références sont identiques, l'équation est simplifiée :

$$\frac{\phi_F}{\phi_{FR}} = \frac{\int_0^\infty F_F(\lambda_F)d\lambda_F}{\int_0^\infty F_{FR}(\lambda_{FR})d\lambda_{FR}} \qquad (7)$$

Afin de limiter les incertitudes, les estimations des rendements quantiques ont été faites non pas sur un point unique mais sur une série de solution de différentes concentrations et les spectres d'émissions de fluorescence ont été mesurés en fonction de l'absorbance de la solution correspondante. Les solutions ont été ajustées pour avoir une absorbance comprise entre 0 et 0,1 car au-delà l'incertitude sur les mesures dépasse les 10%. Les rendements quantiques de cette fluorescence sont alors estimés à l'aide de :

$$\frac{\phi_F}{\phi_{FR}} = \frac{pente_F}{pente_{FR}} \Leftrightarrow \phi_F = \phi_{FR} \cdot \frac{pente_F}{pente_{FR}} \qquad (8)$$

Avec : $Ø_F$ le rendement quantique du fluorophore, $pente_F$: coefficient de la droite passant par l'origine de l'intégrale de l'aire inversée de l'émission en fonction de l'absorbance pour le fluorophore, $Ø_{FR}$ le rendement quantique de la référence et $pente_F$: coefficient de la droite passant par l'origine de l'intégrale de l'aire inversée de l'émission en fonction de l'absorbance pour la référence

1.5. Propriétés spectroscopiques dans le cas des nanocristaux

Dans un nanocristal, les molécules sont proches les unes des autres. Dans le cas des cristaux moléculaires, les interactions entre molécules sont des interactions faibles : forces de Van der Waals, liaisons hydrogène ou interaction entre nuages électroniques π (π-stacking). Pour un ensemble de N molécules identiques, la présence d'interactions, même faibles, fait que l'énergie d'excitation ne peut pas être localisée sur une seule molécule et induit une réponse collective à l'excitation : on parle d'exciton. Cet exciton peut se déplacer dans le cristal avant d'être dissipé de manière radiative ou non radiative.

Quand une molécule est fluorescente à l'état solide, le spectre de fluorescence est soit similaire à celui de la molécule en solution, on parle alors de fluorescence du monomère, soit différente. Il s'agit, dans ce cas là, d'un couplage fort intermoléculaire dans le solide qui est aussi qualifié de fluorescence « d'agrégat », comportant au moins deux molécules. On distingue deux types d'agrégats :

- Les agrégats J produisent généralement des solides fluorescents, figure 4. Un déplacement vers le rouge est observé par rapport aux spectres d'absorption et de fluorescence des fluorophores en solution, on parle aussi de déplacement bathochrome.
- Les agrégats H qui ne sont pas ou peu fluorescent, car ils favorisent une désactivation non radiative de l'état excité, figure 4. Le spectre d'absorption est déplacé vers le bleu et un déplacement vers le rouge du spectre de fluorescence est en général observé, on parle de déplacement hypsochrome de l'absorption.

Certaines molécules qui ne sont pas ou peu fluorescentes en solution, deviennent fluorescentes voire très fluorescentes à l'état solide. C'est un phénomène rare que l'on rencontre pour le CMONS par exemple. Dans ce cas, les molécules peuvent changer de conformation en devenant, par exemple, plus planes qu'en solution, ce qui diminue la probabilité de transitions non radiatives.

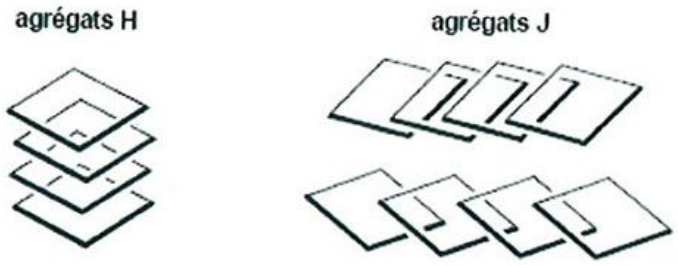


Figure 4 - Représentation schématique d'agrégats moléculaires de types H ou J

2. Dispositif et méthodologie

2.1. Mesure des spectres d'absorption

Les spectres d'absorption des solutions ont été mesurés avec un spectrophotomètre Perkin Elmer λ 9 permettant de réaliser des mesures sur une large gamme spectrale de 250 à 800 nm: ultra-violet, visible et proche infra-rouge, figure 5.

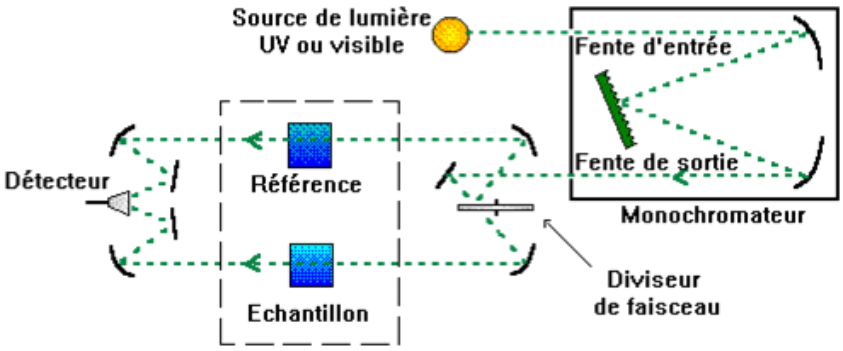


Figure 5 - Représentation schématique d'un spectrophotométre d'absorption à double faisceau

Les spectrophotomètres double faisceau sont plus précis car ils permettent de mesurer en parallèle l'absorbance de l'échantillon et celle du solvant. Ils sont composés d'une source lumineuse qui varie en fonction du domaine spectrales : dans l'UV, $\lambda < 380$ nm, il est utilisé une lampe au deutérium, et dans le visible jusqu'au proche IR, $380 < \lambda < 800$ nm, une lampe au tungstène. La source lumineuse passe au travers d'un monochromateur puis est partagée en deux faisceaux : l'un dirigé vers le « blanc », la cuve contenant le solvant, et le second vers l'échantillon à analyser. Par un jeu de miroir, les faisceaux sont ensuite envoyés vers un détecteur qui soustrait directement l'absorbance du solvant à celle de l'échantillon. Nous obtenons l'absorbance du composé en fonction de la longueur d'onde, A (λ). Grâce à la loi Beer-Lambert et au coefficient d'extinction molaire du composé, les concentrations molaires en fluorophore des solutions peuvent être estimées :

$$A(\lambda) = -\log\frac{I_t}{I_0} = \varepsilon.l.c \qquad (9)$$

Avec : A(λ) : l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, sans unité, I_0 : Intensité lumineuse du faisceau incident, I_t : Intensité lumineuse du faisceau transmis, ε : coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, l : épaisseur du milieu absorbant en cm et c : concentration molaire de substance absorbante en $mol.L^{-1}$.

2.2. Mesure des spectres d'émission et d'excitation de fluorescence

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence des solutions ont été mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax@4 Horiba de chez Jobbin-Yvon, figure 6.

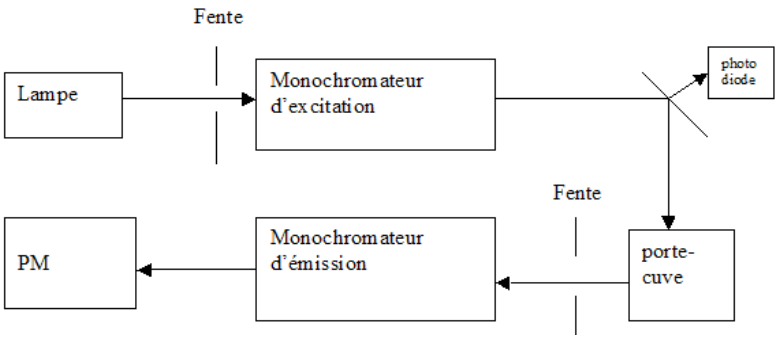


Figure 6 - Représentation schématique du spectrofluorimètre

La source de lumière est une lampe à Xenon ayant une puissance de 400 W: elle délivre une large plage de longueur d'onde, de l'UV jusqu'au proche IR : 200 - 950 nm. A l'inverse d'un spectrophotomètre, il y a deux monochromateurs : un pour l'excitation et un pour l'émission. Les fentes au niveau de l'excitation et de l'émission peuvent quant à elles être réglées afin de contrôler l'intensité lumineuse envoyée sur l'échantillon et celle émise par le composé.

2.3. Mesure des durées de vie

Pour les molécules organiques, les durées de vie de fluorescence sont généralement très courtes, typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes. Pour mesurer les durées de vie de fluorescence, on utilise majoritairement des fluorimètres impulsionnels s'appuyant sur la technique du comptage de photons uniques corrélés en temps. Cette technique indirecte consiste à exciter un échantillon par une impulsion lumineuse très courte par rapport à la durée de vie de fluorescence des molécules ou des nanocristaux étudiés. En général, la durée d'impulsion est inférieure à la picoseconde et la relaxation du fluorophore a ainsi lieu entre deux impulsions. Les photons de fluorescence émis par l'échantillon suite à l'excitation arrivent sur le détecteur. Le temps de retard d'émission du photon par rapport à l'impulsion d'excitation est mesuré. En répétant l'opération plusieurs fois, on obtient ainsi une courbe donnant la décroissance de l'intensité de fluorescence en fonction du temps, après l'excitation au temps t = 0 (figure 7). Le repérage du temps d'arrivée d'un photon peut se faire avec une précision de 30 ps.

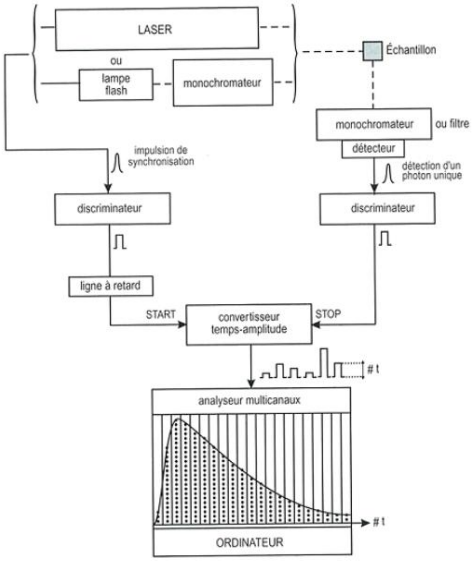


Figure 7 - Schéma de principe de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps pour mesurer une courbe de déclin de fluorescence

Les mesures de durée de vie de fluorescence ont été effectuées avec une longueur d'onde d'excitation de λ = 440 nm et avec un taux de répétition de 400 kHz en utilisant de la seconde harmonique d'un laser Saphir :Ti picoseconde de chez Tsunami. Pour acquérir les déclins de fluorescence et obtenir ainsi les durées de vie de fluorescence, nous avons utilisé un Fluotime 200 de chez AMS technologie, équipé d'un photomultiplicateur à galettes de microcanaux (Hamamatsu model R3809U-50) couplé à un système de comptage de photon unique corrélé en temps (PicoHarp 300). Nous avons utilisé le programme Fluofit de chez Picoquant pour analyser les déclins de fluorescence.

Spectroscopie de fluorescence à deux photons : théorie et dispositifs expérimentaux

1. Emission de fluorescence sous excitation à deux photons

1.1. Historique de l'excitation à deux photons

La théorie du processus non linéaire d'absorption à deux photons a été démontrée en 1931 par M. Göppert-Mayer puis vérifiée expérimentalement pour la première fois en 1961 après l'apparition des premières sources de laser impulsionnelles par W. Kaiser. L'excitation à deux photons de la fluorescence d'un cristal de $CaF_2:Eu^{3+}$ confirma alors le fait que différentes règle de sélection pour l'absorption à deux photons permettait d'accéder à des transitions électroniques interdites lors des processus monophotoniques. Cette découverte suscita alors de nouveaux intérêts en spectroscopie notamment pour l'étude de la structure électronique des états excités des molécules et en microscopie de fluorescence.

1.2. Fluorescence à deux photons

La fluorescence à deux photons correspond à l'émission d'un photon de fluorescence, après l'absorption résonnante et simultanée de deux photons, figure 1. L'énergie des photons incidents hυ doit par conséquent être bien adaptée à la transition mise enjeu. C'est typiquement le cas avec une source d'excitation infrarouge et des molécules fluorescentes absorbant autour de 500 nm. L'efficacité de fluorescence à deux photons est étroitement liée à la section efficace d'absorption à deux photons σ_{abs-2p}, qui se trouve être particulièrement importante dans les systèmes fortement conjugués, caractérisés par de forts moments dipolaires de transition.

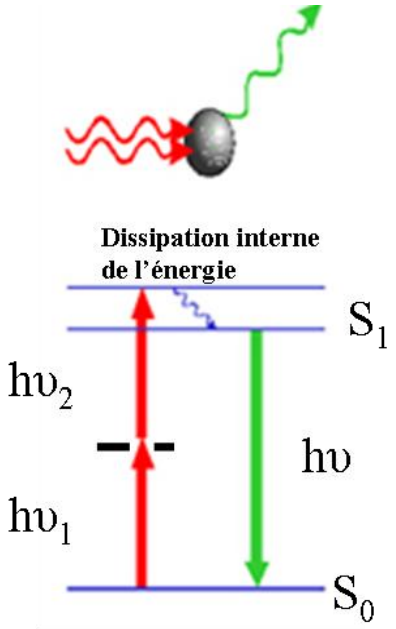


Figure 1 - Illustration du processus d'émission de fluorescence après absorption simultanée de deux photons. Les états S_0 et S_1 sont les états fondamental et excité de la molécule. Le niveau représenté en pointillé noir est un état virtuel.

L'étude théorique des possibilités de transitions vers l'état excité par absorption à deux photons est cependant délicate. Dans le cas d'atomes isolés, une transition autorisée pour un processus à un photon sera strictement interdite dans le cas de l'absorption à deux photons et vice versa. Néanmoins, cette propriété ne s'applique pas aux molécules dont la géométrie est plus complexe. La possibilité d'absorption à deux photons a pu être constatée pour des molécules avec ou sans symétrie. Ainsi, aucune prédiction ne peut être effectuée à partir des spectres d'absorption monophotonique. Il est donc nécessaire de passer par l'étape expérimentale pour savoir si la molécule est fluorescente suite à une absorption biphotonique.

1.3. Section efficace de fluorescence à deux photons

La probabilité d'excitation par absorption de deux photons est quantifiée par la section efficace d'absorption à deux photons σ_{abs-2p} qui a pour unité le cm^4s et s'exprime en Göppert – Mayer ou « GM » avec l'équivalence 1 GM = 10^{-50} cm^4s. Ainsi, le nombre de photons absorbés par molécule par unité de temps est proportionnel au carré de l'intensité instantanée et est donné par :

$$N_{abs-2p}(t) = \sigma_{abs-2p} I^2(t) \qquad (1)$$

avec I(t) l'intensité instantanée d'excitation. La fluorescence émise par molécule et par unité de temps est alors :

$$F(t) = \frac{1}{2}\eta N_{abs-2p}(t) = \frac{1}{2}\sigma_{TPEF} I^2(t) \qquad (2)$$

avec : η le rendement quantique de fluorescence de l'état excité

$\sigma_{TPEF} = \eta.\sigma_{abs-2p}$

Le facteur ½ traduit le fait que deux photons sont absorbés pour chaque photon émis. Plus généralement, en notant I($\vec{x}$, t) l'intensité d'excitation et C($\vec{x}$, t) la concentration de fluorophores, la fluorescence émise à l'instant t est :

$$F(t) = \frac{1}{2}\sigma_{TPEF} \int I^2(\vec{x},t) C(\vec{x},t) d\vec{x} \qquad (3)$$

2. Banc de mesure des sections efficaces d'absorption biphotonique

Pour effectuer les mesures, nous avons utilisé un laser accordable Sa:Ti femtosecondes permettant d'exciter les fluorophores à des longueurs d'onde allant de 700 nm à 950 nm. Le faisceau sortant du laser est d'abord expansé puis focalisé dans une cuve de 1 cm de large contenant la solution fluorescente pour exciter les transitions à deux photons. Les photons de fluorescence sont collectés à 90° de l'excitation par une fibre optique de 600 µm de diamètre de cœur reliée à un spectromètre réseau, figure 2.

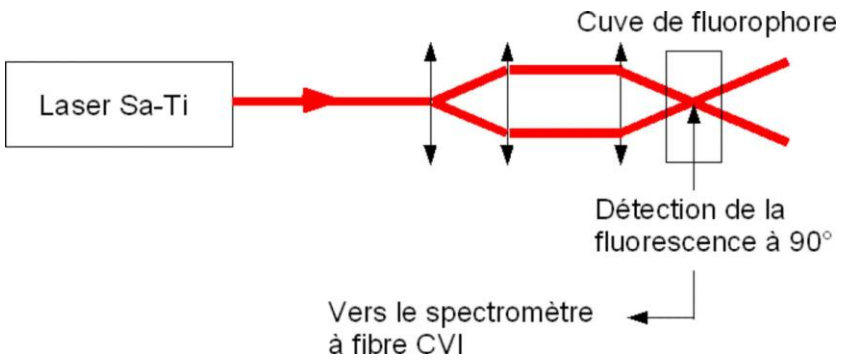


Figure 2 - Schéma du banc de caractérisation des sections efficaces d'absorption à deux photons

Nous avons fait varier la longueur d'onde d'excitation entre 700 et 950 nm par pas de 10 nm en maintenant la puissance laser constante à 50 mW. Les spectres des solutions sont mesurés à chaque fois et nous avons relevé à la fois la valeur de l'intensité maximale de luminescence et la longueur d'onde correspondante. De cette manière nous avons pu reconstruire le spectre d'excitation du fluorophore à deux-photons pour remonter aux sections efficaces d'absorption à deux photons.

Elaboration et caractérisations de nanocristaux organiques fluorescents insérés en coquille sol-gel : vers le développement d'un nouveau type d'agent imageant biologique

Résumé :
Nous avons démontré la faisabilité et la reproductibilité de notre méthode d'élaboration en une étape de nanocristaux organiques en coquilles sol-gel obtenues par nébulisation, en utilisant différents types de molécules organiques, de solvant et matrices sol-gel. L'utilisation de différentes techniques de caractérisation (microscopie électronique à balayage, spectroscopies de luminescence à un et deux photons) a permis d'optimiser les conditions d'élaboration afin d'obtenir des nanoparticules hybrides de petites tailles, encapsulant un maximum de fluorophore, très luminescentes et biocompatibles. La microscopie électronique à balayage et la diffraction électronique nous ont permis de prouver la présence d'un cœur monocristallin au sein des nanoparticules et de définir les structures cristallines présentes. Les propriétés des nanocristaux comme agent imageant de la micro-vascularisation du cortex cérébral chez le petit animal en deux-photons ont ensuite été analysées par spectroscopie de fluorescence à deux-photons ainsi que la non-toxicité des particules vis – à – vis du vivant. Enfin, les premiers tests in-vivo des nanoparticules comme agents imageant, nous ont poussé à les fonctionnaliser afin d'augmenter leur furtivité et d'y ajouter une nouvelle fonction de ciblage.

Mots clés :
Nébulisation, nanocristaux organiques, sol-gel, nanoparticules hybrides, fluorescence, agent imageant, fonctionnalisation

Elaboration and characterizations of fluorescent organic nanocrystals confined in sol-gel shell: towards the development of a new kind of biological label

Abstract:
We demonstrated the feasibility and the reproducibility of our method of one-step elaboration of organic nanocrystals in sol-gel shell obtained by atomization, by using various sort of organic molecules, solvent and sol-gel matrices. The use of different techniques of characterization (scanning electronic microscopy, one and two photons luminescence spectroscopy) allowed to optimized the conditions of elaboration to obtain hybrid nanoparticles of small sizes, with a maximum of fluorophore, highly luminescent and biocompatible. The scanning electronic microscopy and the electronic diffraction allowed us to prove the presence of a single-crystal heart within nanoparticles and to define the crystalline structures. The properties of nanocrystals as labels for imaging the micro-vascularization of the small animal brain in two photons were then analyzed by two photons fluorescence spectroscopy as well as the non-toxicity of nanoparticles. Finally, the first in-vivo tests of nanoparticles as labels grew to us to functionalize to increase their stealth and add it a new function of targeting.

Keywords:
Atomization, organic nanocrystals, sol-gel, hybrids nanoparticles, fluorescence, label, functionalization