

Élaboration de nanoparticules fluorescentes à base de BODIPY par polymérisation RAFT en miniémulsion : synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de surface

Chloé Grazon

▶ **To cite this version:**

Chloé Grazon. Élaboration de nanoparticules fluorescentes à base de BODIPY par polymérisation RAFT en miniémulsion : synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de surface. Autre. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2012. Français. ⟨NNT : 2012DENS0049⟩. ⟨tel-00841491v2⟩

HAL Id: tel-00841491

https://theses.hal.science/tel-00841491v2

Submitted on 17 Jul 2013

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.



HAL Authorization

ENSC - 2012 n°388

Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure de Cachan

présentée par
Chloé Grazon
Ingénieur ESPCI

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Normale Supérieure de Cachan

domaine :
Chimie

spécialité :
Chimie et physico-chimie des polymères

Élaboration de nanoparticules fluorescentes à base de BODIPY par polymérisation RAFT en miniémulsion

synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de surface

Thèse soutenue à Cachan le 1er octobre 2012 devant le jury composé de :

Frédéric Fages	professeur - Univ. Aix-Marseille 2	rapporteur
Sébastien Lecommandoux	professeur - ENSCPB, Univ. Bordeaux 1	rapporteur
Bernadette Charleux	professeur - Univ. C. Bernard Lyon 1	présidente
Christophe Chassenieux	professeur - Univ. du Maine	examinateur
Gilles Clavier	chargé de recherche - CNRS	co-encadrant
Rachel Méallet-Renault	maître de conférences - ENS Cachan	directrice
Keitaro Nakatani	professeur - ENS Cachan	examinateur
Jutta Rieger	chargée de recherche - CNRS	examinatrice

Laboratoire de Photophysique et de Photochimie
Supramoléculaires et Macromoléculaires
ENS CACHAN / CNRS UMR 8531
61, avenue du Président Wilson, 94235 Cachan cedex (France)

Élaboration de nanoparticules fluorescentes à base de BODIPY par polymérisation RAFT en miniémulsion

synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de surface

À Annie, Françoise,
Odette,
et Philippe

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Keitaro Nakatani de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Photophysique et de Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires durant ces trois années qui furent très enrichissantes.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans le talent de toute mon équipe d'encadrant(e)s : Gilles Clavier, Rachel Méallet-Renault, Jutta Rieger et Bernadette Charleux. Merci à vous quatre pour votre soutien et la transmission de vos connaissances, aussi bien d'un point de vue scientifique que humain.

Gilles, tu es la première personne qui a (presque) réussi à me faire aimer la chimie organique. Merci pour ta patience (surtout devant mes plaques CCM et mes spectres RMN) et ta pédagogie. Je te remercie également de m'avoir accordé beaucoup de liberté dans ces travaux, notamment d'avoir donné à cette thèse une tournure beaucoup plus "polymère" que ce que tu n'aurais peut-être pu imaginer. Rachel, merci d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse, de te rendre disponible avec tes étudiants malgré un agenda over-booké, pour ton dynamisme et pour toute la transmission de ton savoir en photophysique ! Bernadette, Jutta, merci à vous de m'avoir choisie il y a cinq ans pour ce petit stage dans le cadre de mes études. C'est vous qui m'avez donné le goût et l'envie de faire de la recherche en chimie et physico-chimie des polymères. J'ai énormément appris à vos côtés durant toutes ces années et c'est grâce à vous que j'ai choisi cette thèse.

Je tiens bien évidemment à remercier les professeurs Frédéric Fages et Sébastien Lecommandoux pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que les professeurs Christophe Chassenieux et Keitaro Nakatani d'avoir assisté à ma soutenance en tant qu'examinateurs. Merci à vous pour vos commentaires et corrections qui m'ont permis d'approfondir un peu plus mes connaissances dans ce domaine et de soulever de nouvelles questions.

Ces travaux de thèse n'auraient pas pu être possibles sans la précieuse aide de Gaëlle Pembouong, chef de la GPC, Arnaud Brosseau, Mister Laser, Jeff Audibert, pro d'Igor, de la fluorescence, des microscopes (en fait qu'est-ce que tu ne sais pas faire ?), Stéphane Maisonneuve, réparateur de la RMN et Patricia Beaunier pour les clichés de MET réalisés durant cinq ans. Merci également à Jacky, notre geek local !

Je tenais également à remercier les biologistes Bianca Sclavi et Gladys Mbemba du LBPA pour leur aide en électrophorèse et en culture cellulaire, ainsi que pour leurs précieux conseils en biologie.

Merci à Christophe Chassenieux, Min-Hui Li et Sabrina Hocine, Nicolas Sanson et

Julien Dupas pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs pour quelques analyses de diffusion de la lumière et de mesures de potentiel ζ.

Merci également à mes stagiaires, Valentin Lasset et Cédric Bonnafé pour leur aide en synthèse de monomères fluorescents. I'd also like to thanks Yang Si to have successfully found a way to get fluorescent bacteria thanks to a fluorescent polymer !

Merci à Rémi et Robert pour leurs précieux conseils en spectroscopie, Jonathan et Thanh pour leur aide sur Igor en urgence, notamment durant la période de rédaction ! Et merci à Olivier pour m'avoir appris à monter une colonne, un Dean-Stark (ha non pardon) et m'avoir montré qu'un homme pouvait être plus bavard qu'une femme.

D'une manière générale, je voudrais remercier tous les membres du PPSM pour leur bonne humeur et leur joie de vivre, notamment Laurent (qui ne râle presque jamais sur la SNCF, rien que pour ça je t'admire !), Karine (mon sac est très bien !), Andrée, Christian, Nicolas, Isabelle, Cécile, Valérie, Clémence, Johanne, Jean-Pierre, Fabien... Merci également aux membres du LCP Sandrine, François, Ben pour leur accueil chaleureux durant ces cinq ans.

Merci aux doctorants du PPSM Thanh, Olivier, Ksenya, Qing (uh ? ? !!), Cassandre (qui amènera aussi des mini Kouign-amann à sa soutenance), Johan, Jonathan, Aurélie, Djibby, Sandrine, Alexis, Paul, Stéphane, Ybing, Jia... Merci à vous pour votre bonne humeur, vos blagues, conseils... Partager le bureau avec vous tous (ou presque) fut vraiment très agréable ! Merci également aux doctorants du LCP, Marion, Antoine et Ben de m'accueillir lors de mes journées GPC. De même, Ségolène, Virginie et Stéphanie (merci pour la poubelle) qui avez en plus connu le "vieux" labo à Jussieu et les bonnes odeurs d'acrylates, le petit bureau, la fenêtre cassée en hiver...

Je n'oublie bien sur pas mes deux collègues blonds de *Gaïf-over-Aïvette* : Jérémy & Jérémy ! Merci pour vos blagues nulles, le soutien mutuel durant la thèse, la rédaction, la soutenance ! Bref, merci à vous deux d'être vous deux ! Par contre (ou en revanche ?) Jérémy, j'attends toujours ton mime, tu m'as déçue...

Merci à mes colocs Philippe, Paul, Berthy, Daminou, Nico Le roux, Martin - futur papa !!! pour ces supers moments passés avec vous rue Plumet, the place to be !!! Merci à Claire, l'autre andouille de la bande des rennais, mon amie de toujours, même là le jour de ma soutenance !

Merci aux coéquipières du RCP 15 pour tous ces moments de défoulement !

Merci à mes amis du bar 124 et aux affiliés, Dr Lili, Sandrine, Popo, Mai, Nico, The son of the death, Selecta, Benoit, Bastou, Alexis, Grégoire, Ulysse, Jimmy, Duduche, Kelu (t'es sur quel continent là ?), Dr Douezan (ça en est où ce battle de *Dance your PhD* ?),

Gros Pierre (il pleut là) et enfin Djé mon p'tit binôme ! Merci également à tous ceux que j'oublie adeptes du vendredi soir à PC !

Merci à Aniss, d'une manière générale !

Enfin, merci à ma mère pour avoir toujours été là à mes côtés, à mon père pour ses blagues nulles : "une thèse en nano-truc fluorescents ? C'est un peu comme N. Srkzy en fait, c'est petit et c'est ultra visible !" Merci à Gilles, mon beau père pour la vie. Merci également à ma grand-mère paternelle et à mes grands-parents maternels pour être des grands-parents parfaits ! Pour finir, je souhaite un bon courage à mes petits frères qui sont encore tous petits et que de bien longues études attendent encore ! Alors bon courage à vous !

Table des matières

Liste des abréviations **xvi**

Introduction générale **1**

1 Introduction bibliographique **3**

1.1 Introduction au principe de la fluorescence moléculaire 3

1.1.1 Absorption de lumière 3

1.1.2 Principe de la fluorescence 4

1.1.3 Grandeurs d'intérêt en spectroscopie de fluorescence 5

1.1.4 Transferts d'énergie 6

1.1.5 Application à l'imagerie en milieux biologiques 9

1.2 Le BODIPY, un fluorophore d'intérêt pour l'imagerie de fluorescence . . . 12

1.2.1 Synthèse 12

1.2.2 Propriétés spectroscopiques 13

1.2.3 Modulation des propriétés spectroscopiques 16

1.2.4 Principaux champs d'applications 19

1.3 Nanoparticules luminescentes 20

1.3.1 Objets nanométriques intrinsèquement luminescents 21

1.3.2 Nanoparticules rendues fluorescentes par dopage 25

1.4 Élaboration de nanoparticules polymères à architecture contrôlée 35

1.4.1 Polymérisation radicalaire contrôlée 35

1.4.2 Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) 37

1.4.3 Synthèse de latex en milieux aqueux dispersés 44

1.4.4 Polymérisation RAFT en miniémulsion 49

1.5 Choix d'un système "idéal" pour notre étude 54

2 Synthèse des nanoparticules fluorescentes **57**

2.1 Synthèse du monomère fluorescent à base de BODIPY : BDPMA 57

2.2 Synthèse de nanoparticules à couronne PEO 58

2.3 Synthèse de nanoparticules à couronne PEO-*b*-PAA 61

2.3.1 Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC en milieu homogène 61

2.3.2 Utilisation des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA en miniémulsion . 64
2.3.3 Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC en milieu homogène . . . 67
2.3.4 Utilisation des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC en miniémulsion . . . 68
2.3.5 Effet du BODIPY . . . 70
2.4 Synthèse de particules à cœur PMMA et à couronne PEO-*b*-PAMA . . . 71
2.5 Mise au point et optimisation d'un procédé "one-pot" . . . 73
2.5.1 Polymérisation en masse du PS en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC . . . 73
2.5.2 Inversion de phase sans ultra-sons . . . 74
2.5.3 Inversion de phase avec ultra-sons . . . 76
2.5.4 Effet de l'hexadécane . . . 79
2.5.5 Optimisation du procédé "one-pot" . . . 80
2.6 Polymérisation contrôlée en procédé "one-pot" optimisé . . . 83
2.6.1 Problème des conversions molaires du styrène déterminées par gravimétrie . . . 84
2.6.2 Synthèse de NPs fluorescentes par une polymérisation RAFT "one-pot" en miniémulsion . . . 86
2.7 Conclusion . . . 89

3 Propriétés spectroscopiques des nanoparticules 91
3.1 Caractéristiques spectroscopiques du monomère fluorescent BDPMA . . . 91
3.2 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs . . . 92
3.3 Influence de la concentration en BDPMA . . . 95
3.3.1 Rendement quantique de fluorescence, brillance et durée de vie . . . 95
3.3.2 Étude approfondie des déclins de fluorescence . . . 99
3.4 Mesures d'anisotropie de fluorescence . . . 106
3.4.1 Estimation des temps de diffusion des NPFs et des chaînes polymère 108
3.4.2 Effet de la température . . . 109
3.4.3 Effet de la concentration en BDPMA sur l'anisotropie de fluorescence 111
3.5 Conclusion . . . 114

4 Modification du cœur fluorescent 115
4.1 Modification sur les positions 3 et 5 du BODIPY . . . 116
4.1.1 Synthèse des monomères encombrés dérivés de BODIPY . . . 117
4.1.2 Caractéristiques spectroscopiques . . . 119
4.1.3 Synthèse des nanoparticules fluorescentes . . . 121
4.1.4 Propriétés spectroscopiques des NPFs . . . 123
4.1.5 Conclusion . . . 126
4.2 Utilisation d'Aza-BODIPY . . . 127

4.3 Modification de la fonction polymérisable 131
4.3.1 Synthèse de nouveaux dérivés BODIPY à fonctions polymérisables différentes 133
4.3.2 Propriétés spectroscopiques des monomères 135
4.3.3 Synthèse des nanoparticules fluorescentes 136
4.3.4 Détermination de la répartition des monomères BODIPY le long des chaînes polymères 138
4.3.5 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs 144
4.4 Conclusion 146

5 Modification de la couronne hydrophile des NPFs 149
5.1 Couronnes à base de PAA 150
5.1.1 Synthèse des macro-agents RAFT à base de PAA 150
5.1.2 Utilisation des macro-agents RAFT PAA-TTC pour la polymérisation en miniémulsion du styrène 151
5.2 Couronnes à base de PAPEO 158
5.2.1 Utilisation du macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC dans une polymérisation en miniémulsion 159
5.3 Couronnes à base de P(AA-*co*-APEO) 163
5.3.1 Synthèse des macro-agents RAFT P(AA-*co*-APEO)-TTC 163
5.3.2 Utilisation des macro-agents RAFT en miniémulsion 164
5.4 Résumé sur les différentes couronnes hydrophiles 172
5.5 Propriétés de surface des NPFs 174
5.5.1 Sensibilité au pH des NPFs 174
5.5.2 Potentiel ζ 176
5.5.3 Évaluation du nombre d'agrégation par MET et DSL 177
5.6 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différentes couronnes à base de PEO, AA et APEO 179
5.6.1 Spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps . . . 179
5.6.2 Photoblanchiment des NPFs 181
5.7 Tests préliminaires d'incubation de cellules eucaryotes avec les NPFs à différentes couronnes 184
5.8 Conclusion 186

6 Fonctionnalisation de la surface des NPFs 187
6.1 Fonctionnalisation par de petites molécules hydrophiles 187
6.1.1 Conditions expérimentales 187
6.1.2 Caractérisation des greffages 189
6.1.3 Incubation de cellules eucaryotes avec des NPFs fonctionnalisées . . 192
6.1.4 Conclusion 194
6.2 Fonctionnalisation par des molécules sensibles au pH 195

6.2.1 Greffage du Neutral Red . . . 195
6.2.2 Greffage d'un dérivé de la Rhodamine B . . . 201
6.2.3 Greffage de la Fluorescéinamine . . . 203
6.3 Mesure du pH cellulaire à l'aide des nano-senseurs à base de BDPMA et de Fluorescéinamine . . . 218
6.4 Fonctionnalisation par des molécules cibles en biologie : greffage de dérivés de la biotine . . . 220
6.5 Fonctionnalisation par des protéines . . . 224
6.5.1 Greffage d'albumine de sérum bovin . . . 224
6.5.2 Greffage de la protéine anti-IgG marquée par un fluorophore . . . 226
6.6 Conclusion . . . 228

Conclusion générale et perspectives de recherche 229

7 Partie Expérimentale 233
7.1 Techniques de caractérisation . . . 233
7.1.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN) . . . 233
7.1.2 Chromatographie d'exclusion stérique (CES) . . . 233
7.1.3 Détermination de la conversion des monomères . . . 234
7.1.4 Spectrométrie de masse . . . 237
7.1.5 Microanalyse élémentaire . . . 237
7.1.6 Points de fusion . . . 237
7.1.7 Potentiel Hydrogène . . . 237
7.1.8 Microscopie électronique à transmission (MET) . . . 237
7.1.9 Diffusion dynamique de la lumière (DDL) . . . 238
7.1.10 Diffusion statique de la lumière (DSL) . . . 239
7.1.11 Potentiel Zeta . . . 241
7.1.12 Spectroscopie d'absorption UV-visible . . . 241
7.1.13 Spectroscopie d'émission et d'excitation de fluorescence . . . 242
7.1.14 Fluorimétrie impulsionnelle : mesure des déclins de fluorescence . . . 243
7.1.15 Anisotropie de fluorescence . . . 245
7.2 Modes opératoires . . . 247
7.2.1 Réactifs employés . . . 247
7.2.2 Synthèse moléculaire . . . 248
7.2.3 Synthèse macromoléculaire . . . 268
7.2.4 Greffages de molécules à fonction amine sur les unités acide acrylique de la couronne des nanoparticules . . . 275
7.2.5 Culture cellulaire . . . 275

A Publications scientifiques **295**

A.1 One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process 295

A.2 New fluorescent BODIPY monomers for ultra-bright fluorescent polymeric nanoparticles 296

A.3 Biocompatible Ultra-bright Fluorescent Ratiometric pH-Nanosensors . . . 297

A.4 Aggregates of BODIPY monomers in core-shell polymeric micelles 298

B Congrès **299**

B.1 Communications orales 299

B.2 Posters 299

Liste des abréviations

A	absorbance
AA	acide acrylique
ABu	acrylate de butyle
ACPA	acide 4,4'-azobis(4-cyanopentanoïque)
AEtOH	*N*-(2-hydroxyéthyl)acrylamide
AIBN	2,2'-azobis(isobutyronitrile)
AMA	acide méthacrylique
APEO	acrylate de méthoxy poly(oxyde d'éthylène)
ATRP	polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome
B	brillance
BDPMA	monomère dérivé BODIPY **1**
BODIPY	4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène
BSA	albumine de sérum bovin
CES	chromatographie d'exclusion stérique
χ_i	conversion en monomère i
chloranile	tétrachloro-1,4-benzoquinone
CMC	concentration micellaire critique
D_h	diamètre hydrodynamique moyen en intensité donné en DDL par l'appareil Cordouan
D_z	diamètre hydrodynamique moyen en intensité donné en DDL par l'appareil Malvern
DBU	1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène
DCC	*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DDL	diffusion dynamique de la lumière
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIPEA	*N,N*-diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP_n	degré de polymérisation moyen en nombre
DSL	diffusion statique de la lumière
DVB	divinylbenzène
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EP	éther de pétrole
ε	coefficient d'extinction molaire

Et_3N	triéthylamine
$Et(NH_2)_2$	éthylènediamine
$EtOHNH_2$	éthanolamine
FA	fluorescéinamine
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster (Förster Resonance Energy Transfer)
HD	hexadécane
HeLa	cellules adhérentes cancéreuses de la patiente Henrietta Lacks
HLB	balance hydrophile-lipophile (Hydrophile-Lipophile Balance)
HOBt	hydroxybenzotriazole
I_P	indice de polymolécularité d'une distribution de masses molaires
IR	infrarouge
KPS	persulfate de potassium
kryptopyrrole	2,4-diméthyl-3-éthylpyrrole
λ_{abs}	longueur d'onde d'absorption
λ_{exc}	longueur d'onde d'excitation
λ_F	longueur d'onde d'émission de fluorescence
LCST	Lower Critical Solution Temperature (température critique inférieure de solubilité)
M_n	masse molaire moyenne en nombre
$M_{n,\,th}$	masse molaire moyenne en nombre déterminée de manière théorique
$M_{n,\,CES}$	masse molaire moyenne en nombre déterminée par CES
$M_{n,\,CES}^{PS}$	masse molaire moyenne en nombre déterminée par CES en utilisant une calibration conventionnelle PS
M_w	masse molaire moyenne en masse
MET	microscopie électronique à transmission
MMA	méthacrylate de méthyle
mol %	pourcentage molaire
N_{agg}	nombre d'agrégation
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NMP	polymérisation contrôlé par les nitroxydes
NP	nanoparticule
NPF	nanoparticule fluorescente
NR	Neutral Red
PAA	poly(acide acrylique)
PAPEO	poly(acrylate de méthoxy poly(oxyde d'éthylène))
PBS	tampon phosphate salin
PEG	poly(éthylène glycol) (voir PEO)
$PEG_3(NH_2)_2$	4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine
PEO	poly(oxyde d'éthylène) (voir PEG)

Φ_D	rendement de photodestruction
Φ_F	rendement quantique de fluorescence
PMMA	poly(méthacrylate de méthyle)
PRC	polymérisation radicalaire contrôlée
PS	polystyrène
QD	quantum dot
r	rapport de réactivité
R_g	rayon de gyration
R_h	rayon hydrodynamique
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation)
Rh	Rhodamine
ρ	rendement de synthèse
RMN	résonance magnétique nucléaire
RI	indice de réfraction (Refractive Index)
S	styrène
σ	indice de polydispersité d'une distribution de taille de particules en DDL mesurée par l'appareil Malvern
SDS	dodécylsulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	dodécylsulfate de sodium-électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
t	temps
T	température
T_g	température de transition vitreuse
TA	température ambiante
τ	durée de vie de fluorescence
τ_D	constante de temps de photodestruction
τ_{sol}	taux de solide
$\overline{\tau}$	durée de vie moyenne de fluorescence
TEP	transfert d'électrons photo-induit
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TMS	triméthylsilyldiazométhane
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
TTC	trithiocarbonate
UH	agent ultra hydrophobe
US	ultra-sons
UV	ultraviolet
vis.	visible
wt %	pourcentage massique
ζ	potentiel zeta

Introduction générale

L'utilisation de nanoparticules (NPs) dans le domaine de la biologie est en plein essor. Lorsqu'elles sont fluorescentes, ces NPs peuvent, entre autres, permettre le marquage de zones d'intérêt spécifiques comme certains types de cellules, des compartiments cellulaires, la présence de protéines, mesurer des conditions physico-chimiques telles que le pH, la température ou détecter la présence de métaux. L'intérêt de ce type d'objets, comparativement aux fluorophores en solution, est qu'ils ont généralement une meilleure brillance et qu'ils sont plus photostables. Pour que des NPs fluorescentes (NPFs) puissent être utilisées en biologie, il faut qu'elles soient le plus inerte possible pour le milieu d'analyse.

L'élaboration de nanoparticules fluorescentes est un sujet central au Laboratoire de Photophysique et de Photochimie (PPSM UMR 8531) de l'ENS Cachan. La fluorescence de ces objets peut être apportée par des fluorophores organiques tels que le BODIPY. Cette famille de fluorophores présente en effet des caractéristiques spectroscopiques intéressantes comme un bon rendement quantique de fluorescence, un fort coefficient d'extinction molaire et une modularité de l'émission de fluorescence relativement aisée.

Les NPFs peuvent être modifiées en senseurs par l'introduction d'une molécule sensible à des paramètres physico-chimiques comme le pH ou la présence de sels métalliques. Ainsi, des nanoparticules (NPs) de polystyrène dont le cœur est rendu fluorescent par dopage de BODIPY ont été étudiées au PPSM, puis fonctionnalisées en senseurs de Cu^{2+} par greffage d'une molécule sonde à la surface des objets. Les principaux inconvénients de ces NPFs sont le relargage des BODIPY avec le temps et l'utilisation de tensioactifs pour assurer leur stabilité colloïdale, ce qui limite leur utilisation en milieu biologique.

Ces problèmes peuvent être évités en liant le fluorophore de manière covalente à la matrice polymère et en réalisant la synthèse de NPs auto-stabilisées sans ajout de tensioactif. Des méthodes de polymérisations radicalaires contrôlées telles que la méthode de transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT), réalisées en milieux aqueux dispersés, permettent la synthèse *in situ* de NPs cœur-couronne auto-stabilisées.

Le développement d'un tel type de synthèse en présence d'un monomère de BODIPY a été permis dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires de Chimie des Polymères (LCP UMR 7610) de Paris et de Chimie, Catalyse, Polymères et Procédés (C2P2 UMR 5265) de Lyon. L'idée est d'élaborer des NPFs à couronne biocompatible et fonctionnalisable afin de pouvoir greffer une molécule sonde, et à cœur constitué d'un fluorophore copolymérisé à un monomère classique, de type styrène.

Afin de bien définir les enjeux de cette thèse, une introduction bibliographique (**chapitre 1**) présente les grands principes de la fluorescence et compare les principales NPFs (organiques ou inorganiques) utilisées actuellement en imagerie et en biologie. L'élaboration de NPFs polymères est abordée plus en détail, notamment par une technique de polymérisation RAFT en miniémulsion. Le **chapitre 2** présente la mise au point d'une synthèse originale de NPFs cœur-couronne de taille nanométrique composées de chaînes issues d'une polymérisation contrôlée. La mise au point d'un procédé "one-pot" nécessitant un nombre réduit d'étapes est détaillée. Les NPFs obtenues présentent un cœur fluorescent et une couronne hydrophile stabilisatrice biocompatible et fonctionnalisable. Les propriétés spectroscopiques de ces NPFs sont détaillées dans le **chapitre 3**, ainsi que l'influence de la concentration en fluorophores au sein des NPFs sur ces propriétés. Ce chapitre traite également des transferts d'énergie entre BODIPY polymérisés. Afin de moduler les propriétés spectroscopiques du cœur des NPFs (**chapitre 4**), deux nouvelles familles de monomères BODIPY ont été synthétisées et copolymérisées. La première comprend des BODIPY encombrés ayant un système conjugué étendu afin de décaler leur émission de fluorescence vers le rouge ; la seconde présente des monomères fluorescents à différentes fonctions polymérisables afin de varier leur répartition dans la chaîne de copolymère. Dans l'idée de réaliser des NPFs modulables, la nature de la couronne des NPFs a également été changée (**chapitre 5**), tout en conservant les propriétés de biocompatibilité et de fonctionnalisation. Une attention particulière est portée au contrôle de la polymérisation et à l'obtention de particules monodisperses nanométriques. Enfin, le dernier chapitre (**chapitre 6**) présente la fonctionnalisation de la couronne des NPFs par des molécules d'intérêt biologique ou par des molécules sensibles au pH dans le but d'obtenir des nano-senseurs.

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

L'objectif de ce chapitre est de présenter les nanoparticules luminescentes, et plus particulièrement les nanoparticules (NPs) polymères à base de BODIPY, pour des applications en imagerie *in vivo* ou *in vitro*, mais également pour la réalisation de nanosenseurs.

Dans un premier temps, il sera fait un bref rappel du principe de la fluorescence. Puis, le BODIPY sera présenté en tant que fluorophore particulièrement adapté à l'élaboration de NPs fluorescentes.

Les nanoparticules luminescentes peuvent être organiques ou inorganiques et être intrinsèquement luminescentes ou être dopées par des molécules fluorescentes. Ces types de NPs seront comparées, tout en insistant sur les NPs fluorescentes polymères.

Enfin sera abordée l'élaboration de nanoparticules fluorescentes polymères par la méthode de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT en milieux aqueux dispersés.

1.1 Introduction au principe de la fluorescence moléculaire

1.1.1 Absorption de lumière

L'absorption d'un photon à la longueur d'onde λ est caractérisée par l'absorbance $A(\lambda)$.

La quantité de lumière que peut absorber une molécule est caractérisée par son coefficient d'extinction (ou d'absorption) molaire ε. Cette grandeur est reliée à l'absorbance par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) l C \tag{1.1}$$

où :

$A(\lambda)$	absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde λ
$\varepsilon(\lambda)$	coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ ($\mathrm{L.mol^{-1}.cm^{-1}}$)
l	trajet optique (cm)
C	concentration en molécule absorbante ($\mathrm{mol.L^{-1}}$)

Si plusieurs molécules absorbantes sont présentes en solution, l'absorbance totale à une longueur d'onde donnée sera égale à la somme des absorbances à cette longueur d'onde.

Dans ce manuscrit, les valeurs des coefficients d'extinction molaire seront données à la longueur d'onde maximale d'absorption.

1.1.2 Principe de la fluorescence

La fluorescence est un cas particulier de la luminescence dans lequel l'émission de lumière est produite par des molécules dans un état excité singulet. Les niveaux d'énergie accessibles pour une molécule ayant absorbé un photon sont représentés FIGURE 1.1 [1]. Il existe deux types d'états électroniques pour une molécule à l'état excité : les états singulets (S_n) ayant un spin total nul et les états triplets (T_n) ayant un spin total égal à 1. Chaque état possède des sous-niveaux vibrationnels ($v = 0, 1, 2...$). Chaque niveau d'énergie correspond à une configuration électronique, c'est à dire à un remplissage particulier des orbitales moléculaires par les électrons de valence de la molécule. Une transition entre deux niveaux d'énergie correspond au passage d'un électron d'une orbitale à une autre. Pour les transitions correspondant à des longueurs d'onde UV ou visible, les orbitales moléculaires impliquées sont la plupart du temps de type $\pi - \pi^*$ ou $n - \pi^*$. En particulier, la transition de plus basse énergie, qui conduit à la fluorescence, correspond au passage d'un électron de l'orbitale moléculaire occupée d'énergie la plus élevée (HO) à l'orbitale moléculaire vacante d'énergie la plus basse (BV).

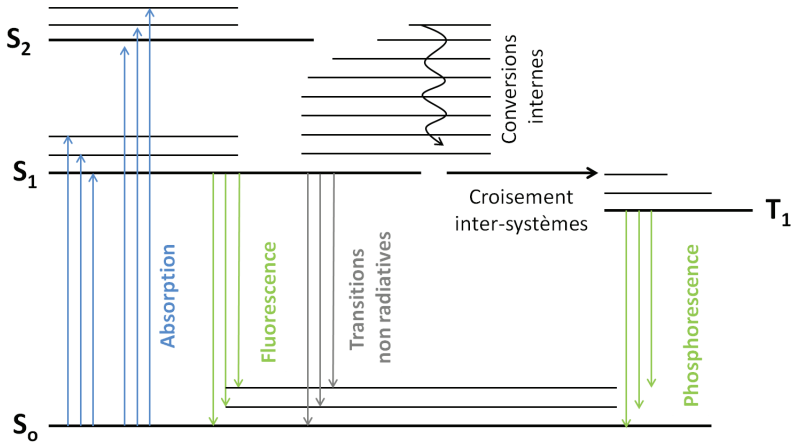


FIGURE 1.1 – Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski.

Le passage de l'état excité S_1 à l'état fondamental S_0 peut avoir lieu de manière radiative ou non radiative dans des laps de temps de 10^{-7} à 10^{-10} s. Chaque processus de retour à l'état fondamental est associé à une constante de vitesse notée k_x.

Le cas d'une transition radiative (r) $S_1 \rightarrow S_0$ correspond à l'émission de fluorescence (F) : l'énergie du photon émis est proportionnelle à l'écart entre les états et est plus faible que celle du photon qui a permis le passage à l'état excité. Le spectre de fluorescence est donc décalé vers les plus grandes longueurs d'onde comparativement au spectre d'absorption. La différence d'énergie entre le maximum des deux spectres est appelée le déplacement de Stokes.

Les transitions non radiatives (nr) peuvent être de nature intra- ou intermoléculaires. Tous ces phénomènes contribuent à la constante de vitesse non radiative (k_{nr}). Les transitions non radiatives intra-moléculaires sont :

- La conversion interne (ci) qui est une transition non radiative entre deux niveaux énergétiques de même multiplicité de spin. Après absorption d'un photon qui a permis de porter la molécule à l'état S_1, le retour au niveau fondamental peut avoir lieu par conversion interne. Dans le cas où des états supérieurs seraient atteints (S_n, v_m), le retour à l'état (S_1, v_0) se fait également par relaxation vibrationnelle intramoléculaire mais dans des temps extrêmement rapides (10^{-13}-10^{-11} s).
- Le croisement inter-système (cis) qui est une transition isoénergétique de l'état S_1 vers un état triplet par couplage spin-orbite avec changement de multiplicité de spin.

Les transitions non radiatives intermoléculaires peuvent venir entre autres de chocs au solvant, de transferts d'énergie vers d'autres molécules.

Le retour radiatif à l'état fondamental S_0 depuis l'état T_1 est appelé phosphorescence. Ce phénomène rare et non favorisé à température ambiante présente une constante de vitesse radiative faible et des durées de vie de l'état excité pouvant aller jusqu'à plusieurs minutes.

À partir de l'état S_1, il y a donc deux processus possibles de retour à l'état fondamental, auxquels les constantes de vitesse suivantes sont associées : k_r et k_{nr}, avec $k_{nr} = k_{\text{nr intramoléculaire}} + k_{\text{nr intermoléculaire}}$ ($k_{\text{nr intramoléculaire}} = k_{ci} + k_{cis}$).

1.1.3 Grandeurs d'intérêt en spectroscopie de fluorescence

La durée de vie de fluorescence correspond au temps moyen de séjour des molécules dans l'état excité S_1. Dans la plupart des cas, la relaxation à l'état fondamental suit une cinétique de premier ordre :

$$[A^*] = [A^*]_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \tag{1.2}$$

où :

$[A^*]$	concentration en molécules à l'état excité
$[A^*]_0$	concentration en molécules à l'état excité à l'instant initial
τ	durée de vie de fluorescence

avec :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \tag{1.3}$$

Le rendement quantique de fluorescence définit l'efficacité de fluorescence d'une espèce :

$$\Phi_F = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \tag{1.4}$$

Plus le rendement quantique d'une espèce est proche de l'unité, plus l'efficacité de fluorescence est grande.

La brillance rend compte de l'efficacité totale du phénomène d'absorption et d'émission de fluorescence d'un fluorophore. Elle peut être quantifiée par [2] :

$$B = \varepsilon \Phi_F \tag{1.5}$$

Pour une assemblée de fluorophores (nanoparticules, macromolécules...), elle est alors définie comme :

$$B = N\varepsilon \Phi_F \tag{1.6}$$

où :

N	nombre de fluorophores dans l'objet observé
ε	coefficient d'extinction molaire d'un fluorophore à λ_{exc}
Φ_F	rendement quantique de fluorescence de l'objet

En concentrant les fluorophores sur un même objet, la brillance en est alors augmentée (si Φ_F ne change pas). Ces assemblées de fluorophores seront ainsi plus aisément observables.

La photostabilité correspond au nombre moyen d'excitations que peut subir une molécule avant d'être dégradée. Pour de longs temps d'observation (sous microscope, en cuve...), la photostabilité des fluorophores est un paramètre primordial.

En résumé, le choix de fluorophores pour l'imagerie de fluorescence portera vers des molécules présentant une bonne photostabilité pour de longs temps d'observation ainsi qu'une bonne brillance afin de pouvoir les observer facilement. Il peut être intéressant de concentrer les fluorophores au sein d'un même objet (tel que des nanoparticules polymères) afin d'en augmenter la brillance et la photostabilité. Les nano-objets fluorescents seront étudiés en détail par la suite.

1.1.4 Transferts d'énergie

Un fluorophore dans son état excité peut transférer son énergie à une autre molécule, induisant une extinction de sa fluorescence. Le transfert d'énergie du donneur (D) vers l'accepteur (A) (D et A peuvent être des molécules identiques ou différentes) peut avoir lieu de façon radiative ou non radiative.

Le transfert d'énergie radiatif correspond à l'absorption par une molécule A d'un photon émis par une molécule D :

$D^* \rightarrow D + h\nu$

$h\nu + A \rightarrow A^*$ ou $h\nu + D \rightarrow D^*$

Lorsqu'il y a transfert d'énergie radiatif, le spectre de fluorescence de D est déformé car l'intensité émise diminue dans la zone de recouvrement. L'efficacité de transfert dépend de

l'intégrale de recouvrement des spectres d'émission de fluorescence de D et d'absorption de A ainsi que de la concentration en A et D dans le milieu.

Les transferts d'énergie non radiatifs peuvent être décrits par deux théories.

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) [3] est un processus non radiatif correspondant à une interaction entre les dipôles du donneur et de l'accepteur : la transition isoénergétique a lieu entre les états vibrationnels du donneur excité et de l'accepteur (FIGURE 1.2). La constante de vitesse de transfert (k_T) est donnée par la relation :

$$k_T = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \tag{1.7}$$

où :

k_T	constante de vitesse de transfert (s^{-1})
τ_D	durée de vie de fluorescence du donneur (s)
R_0	rayon de Förster (nm)
r	distance entre D et A (nm)

R_0 correspond à la distance pour laquelle le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur et le retour du donneur vers l'état fondamental par fluorescence sont équiprobables. R_0 (et donc l'efficacité de transfert) dépend principalement de l'orientation entre les dipôles et du recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (FIGURE 1.2). R_0 varie généralement de 1 à 10 nm selon le couple donneur/accepteur.

Le transfert d'énergie de type Dexter [4] est un processus non radiatif mettant en jeu un échange d'électrons entre un donneur à l'état excité et un accepteur (FIGURE 1.3). Ce mécanisme implique que les molécules soient suffisamment proches dans l'espace pour favoriser le recouvrement orbitalaire. Son efficacité est donnée par :

$$k_T \propto \frac{2\pi}{h} S e^{\frac{-2r}{L}} \tag{1.8}$$

où :

k_T	constante de vitesse de transfert (s^{-1})
h	constante de Planck ($4{,}14 \times 10^{-15}$ eV.s)
S	intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission de D et d'absorption de A (eV)
L	somme des rayons de Van der Waals de D et A (nm)
r	distance entre D et A (nm)

Dans la plupart des cas où un transfert d'énergie non radiatif a lieu, il est difficile d'estimer si le système suit un processus de type Förster ou Dexter. Néanmoins, à très courte distance, le transfert de type Dexter prédomine ($r < 1$ nm) alors qu'à plus grande distance ce sera celui de type Förster.

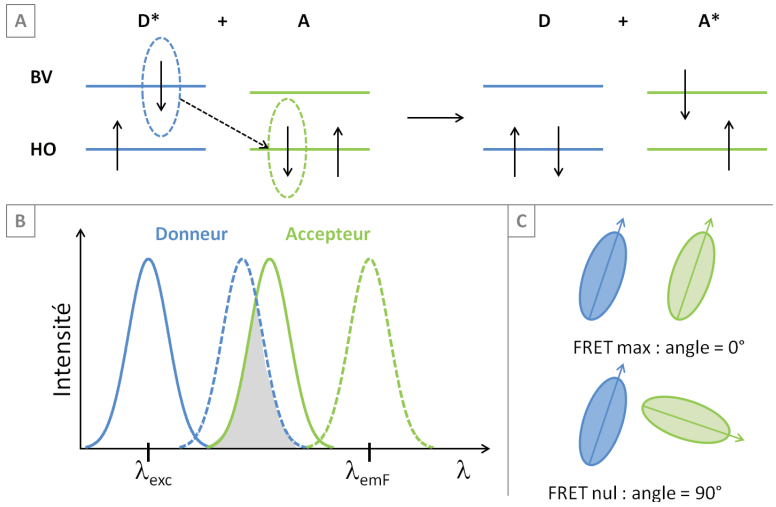


FIGURE 1.2 – Représentation simplifiée du processus de transfert d'énergie de type Förster. A. Transfert d'énergie du donneur excité vers l'accepteur à l'état fondamental (les flèches pleines représentent les spins des électrons). B. Recouvrement spectral (-) entre les spectres d'émission de fluorescence du donneur (· · ·) et d'absorption de l'accepteur (-). C. Cas limites d'interactions entre moments dipolaires (flèches) du donneur et de l'accepteur (ovales) et leur influence sur le transfert d'énergie.

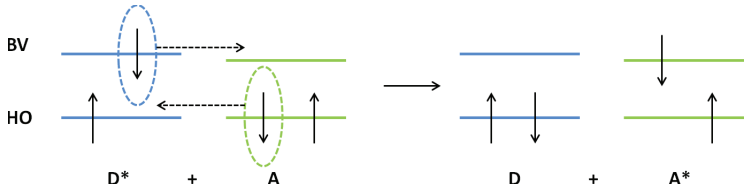


FIGURE 1.3 – Représentation simplifiée du processus de transfert d'énergie de type Dexter (les flèches pleines représentent les spins des électrons).

1.1.5 Application à l'imagerie en milieux biologiques

La fluorescence est une technique simple, rapide et peu coûteuse, comparativement à des méthodes d'imagerie telles que les rayons X ou l'imagerie par résonance magnétique. De plus, elle permet une bonne résolution spatiale et temporelle [5]. Cela en fait donc une technique de choix pour l'imagerie en milieux biologiques lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence des fluorophores sont bien adaptées à l'application désirée (FIGURE 1.4) [6, 7] :

- λ_{exc} = UV ou IR : non adaptées car les longueurs d'onde de travail peuvent créer un endommagement des tissus. De plus, la plupart des molécules d'origine biologique (acides aminés, protéines...) absorbent fortement dans l'UV.
- λ_{exc} ou λ_F= 350-500 nm : non adaptées car l'autofluorescence des structures biologiques est la plus importante dans cette fenêtre [8].
- λ_{exc} ou λ_F= 500-650 nm : adaptées pour l'imagerie de surface ou *in vitro* mais pas pour le *in vivo* car la pénétration des rayons lumineux est limitée à cause des forts coefficients d'absorption des principaux constituants du sang et de la diffusion de la lumière par les petits organismes.
- λ_{exc} ou λ_F= 650-900 nm : fenêtre de travail la plus adaptée pour l'imagerie *in vivo* car les rayons lumineux sont peu diffusés et pénètrent bien.

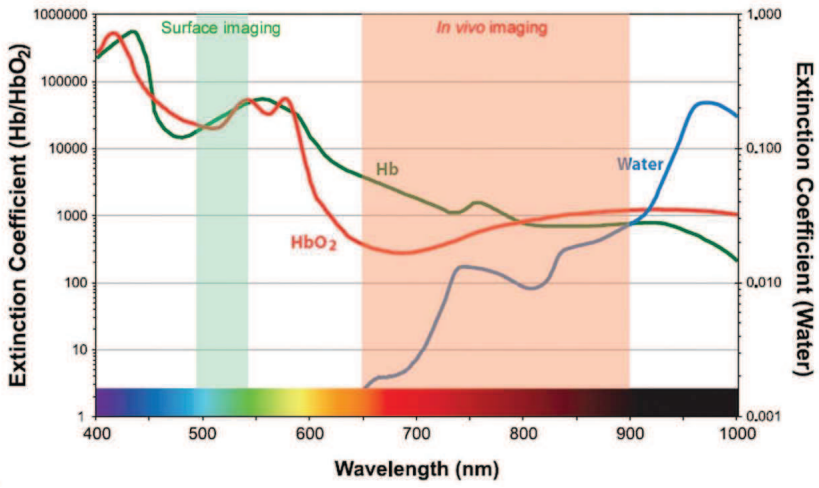


FIGURE 1.4 – Coefficients d'extinction de l'eau, de l'hémoglobine (Hb) et de l'oxyhémoglobine (HbO_2) [7]. *Utilisé avec permission depuis H. Kobayashi et coll., New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging, Chemical Reviews, 110, 2620-2640, 2010. Droits d'auteur 2010 American Chemical Society.*

De nombreux fluorophores ont donc été synthétisés pour répondre à ces besoins [9, 10, 11] (TABLEAU 1.1). Les plus courants pour l'imagerie *in vitro* sont les **rhodamines** et les **fluorescéines**. Ces molécules appartiennent toutes deux à la familles des xanthènes [12]. Elles présentent des brillances intéressantes et sont solubles dans l'eau mais la modulation de leurs longueurs d'onde d'émission de fluorescence au-delà de 600 nm est difficile. Ces molécules sont également solvatochromes et leur fluorescence est dépendante du pH.

Ces propriétés peuvent être un avantage pour l'élaboration de senseurs de pH mais un inconvénient si elles doivent être utilisées comme sondes de référence.

Les **cyanines** sont des fluorophores appartenant à la famille des polyméthines [13]. Les plus courantes sont les triméthine (Cy3) et pentaméthine (Cy5) cyanines. Les Cy3 absorbant et émettant dans le visible sont plus utilisées pour l'imagerie *in vitro*. Les Cy5 ayant des longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le rouge proche infra-rouge sont plus adaptées pour l'imagerie *in vivo*. Ces molécules, bien qu'ayant des coefficients d'extinction molaire très élevés ($\varepsilon > 10^5 \mathrm{M}^{-1}.\mathrm{cm}^{-1}$), ont des rendements quantiques limités ($\Phi_F \approx 0,3$). Les longueurs d'onde d'émission de fluorescence peuvent être modulées en changeant les groupements autour des unités aromatiques [14].

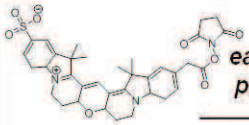
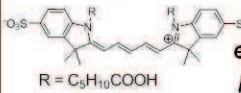
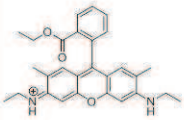
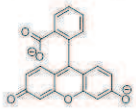
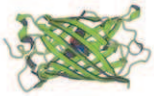
Les **BODIPY** sont des molécules présentant une bonne brillance (Tableau 1.1) et des longueurs d'onde d'émission de fluorescence modulables de 520 à 750 nm. Cette famille de molécules sera abordée plus en détail dans la partie 1.2.

Enfin, bien d'autres molécules comme des dérivés des squaraines ou des porphyrines ont également été développées pour l'imagerie [15, 16, 17].

L'inconvénient des sondes moléculaires pour l'imagerie en milieux biologiques est leur faible solubilité dans l'eau ainsi que leur éventuelle adsorption non spécifique ou agrégation. De plus, ces molécules, non protégées de leur environnement, ont tendance à photoblanchir assez facilement. Afin de contourner ces limitations, diverses options ont été envisagées (Tableau 1.1) : l'encapsulation de fluorophores dans des matrices organiques (polymère) ou inorganiques (silice) ou la synthèse de nanoobjets intrinsèquement fluorescents (quantum dots - QDs, nanodiamants...). Les premiers ont l'avantage de concentrer et protéger les fluorophores dans une matrice rigide. Ils sont facilement fonctionnalisables et peu toxiques mais leur grande taille peut être un inconvénient ($10 < \mathrm{D} < 100$ nm). Les QDs sont des nanoparticules très brillantes (Tableau 1.1) et de petite taille ($5 < \mathrm{D} < 10$ nm), largement utilisées en imagerie [27]. Cependant, la nature de leur cœur (Cd, Se...) présente une certaine toxicité. Enfin, les nanodiamants sont aussi brillants (Tableau 1.1) que les QDs et ont l'avantage d'être beaucoup moins toxiques mais ont également une plus grande taille ($20 < \mathrm{D} < 50$ nm). Toutes ces nanoparticules seront abordées plus en détail dans la section 1.3.

Un autre type d'objet fluorescent fait l'objet de nombreuses recherches : il s'agit de la Green Fluorescent Protein (GFP), une protéine émettant dans le vert, et de ses dérivés pouvant émettre jusque dans le rouge [28, 23, 29, 30]. Ces protéines, parfaitement biocompatibles, sont assez brillantes (Tableau 1.1) et de relativement petite taille ($3 < \mathrm{D} < 5$ nm). Cependant, il peut être difficile de travailler avec de tels objets, en particulier lorsqu'il s'agit de les fonctionnaliser ou de les caractériser.

TABLEAU 1.1 – Comparaison des sondes intrinsèquement fluorescentes utilisées classiquement pour l'imagerie *in vivo* ou *in vitro*.

	Sonde *solvant*	λ_F nm	ε $10^3 xM^{-1}.cm^{-1}$	Φ_F	B $10^3 xM^{-1}.cm^{-1}$
	BODIPY *toluène*	541	86	0,94	81
	Cy3B *eau (tampon phosphate)*	572	130	0,67	87
 R = $C_5H_{10}COOH$	Cy5 *eau (tampon phosphate)*	667	250	0,27	68
	rhodamine 6G *éthanol*	556	116	0,95	110
	fluorescéine *eau basique*	490	88	0,93	82
	GFP *eau*	509 *eau*	54	~0,70	39
	QD / CdSe *méthanol*	470-660	100-700	0,65-0,85	60-600
	nanodiamant *eau*	700	-	~1	comparable aux QDs

Données issues de : BODIPY [18], Rhodamine [10, 19], Fluorescéine [20], Cyanines [21, 22], GFP [23], QD [24], nanodiamant [25, 26].

1.2 Le BODIPY, un fluorophore d'intérêt pour l'imagerie de fluorescence

Le 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène, plus communément appelé BODIPY ("BOronDIPYrromethen") est un fluorophore possédant de très bonnes propriétés photophysiques [31]. La structure du noyau émissif est donnée sur la FIGURE 1.5. Elle est constituée de deux unités pyrroles complexées à un groupe difluoroborane BF_2. Les BODIPY sont des molécules globalement neutres mais possédant une structure zwiterrionique dans laquelle la charge positive généralement portée par un des atomes d'azote peut être délocalisée sur le système π. Le groupement BF_2 joue le rôle de pont liant entre les unités pyrroles et confère sa rigidité à la molécule. Il ne prend pas part à la délocalisation des électrons π entre les unités aromatiques.

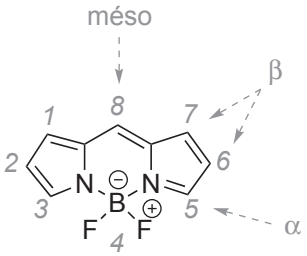


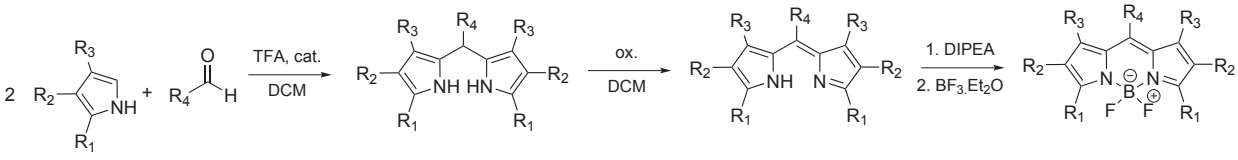
FIGURE 1.5 – Structure et numérotations officielles et triviales du noyau BODIPY.

1.2.1 Synthèse

La première synthèse est rapportée en 1968 par Treibs et Kreuzer [32] par condensation de deux 2,5-diméthylpyrroles sur l'anhydride acétique, puis complexation par le BF_3. Depuis, la synthèse des BODIPY a été améliorée et il est possible de synthétiser des molécules symétriques ou non. Deux grandes voies de synthèse sont employées, l'une à partir d'aldéhydes, l'autre à partir de chlorures ou d'anhydrides d'acide [33]. Dans les deux cas il s'agit de procédés "one-pot" en trois ou quatre étapes successives.

Méthode classique à partir d'aldéhydes

La synthèse de BODIPY à partir d'aldéhydes (SCHÈME 1.1) constitue la voie la plus répandue dans la littérature.

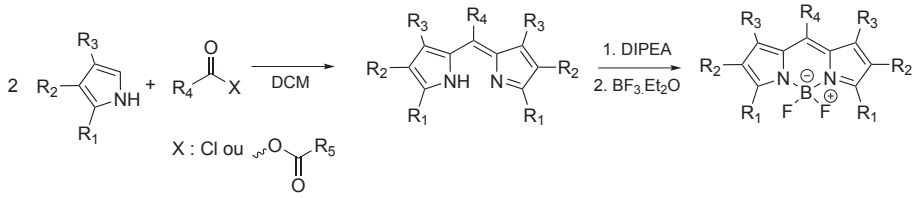


SCHÈME 1.1 – Synthèse de BODIPY à partir d'aldéhydes.

Dans une première étape, la condensation (substitution électrophile aromatique) en milieu acidifié par l'acide trifluoroacétique (TFA) des deux pyrroles sur l'aldéhyde mène à la formation de l'intermédiaire isolable dipyrrométhane. Celui-ci est alors oxydé dans une seconde étape par la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) et/ou la tétrachloro-1,4-benzoquinone (chloranile) pour donner le dipyrrométhène. Enfin, les deux dernières étapes consistent à déprotoner l'un des deux pyrroles par une base (triéthylamine -Et_3N- ou plus communément *N,N*-diisopropyléthylamine -DIPEA) puis aussitôt à complexer les deux unités aromatiques par de l'éthérate de trifluorure de bore (BF_3-OEt_2) pour donner le BODIPY.

Méthode secondaire à partir de dérivés d'acides carboxyliques

Cette voie de synthèse (Schème 1.2), moins répandue que la précédente, présente l'inconvénient d'utiliser des chlorures d'acide ou des anhydrides d'acide, composés peu stables. De plus, l'emploi de ces dérivés acides interdit la présence de groupements nucléophiles sur le pyrrole. Néanmoins, elle a l'avantage de ne pas nécessiter l'étape d'oxydation et ainsi de diminuer les risques de dégradation (principalement en position méso) dus à cette étape.



Schème 1.2 – Synthèse de BODIPY à partir d'anhydrides ou de chlorures d'acide.

Le dipyrrométhène est ici directement obtenu par la condensation des deux pyrroles sur le dérivé d'acide carboxylique, suivie d'une réorganisation des systèmes électroniques π. Les deux dernières étapes sont identiques à celles de la méthode précédente.

1.2.2 Propriétés spectroscopiques

L'intérêt croissant porté à la famille des BODIPY est principalement dû à ses propriétés photophysiques remarquables, à savoir principalement de bons rendements quantiques de fluorescence et une bonne photostabilité. Le département de chimie physique de l'université du Pays Basque de Bilbao et l'Institut des Sciences Polymères et Technologies (C.S.I.C.) de Madrid ont largement étudié des composés BODIPY commerciaux, tel que le PM567 (Figure 1.6) [18, 31]. Ce BODIPY appartient à la famille des krypto-BODIPY car il est constitué de deux sous unités kryptopyrrole (2,4-diméthyl-3-éthyl-1*H*-pyrrole).

Absorption et émission de fluorescence

Le spectre d'absorption du composé PM567 (Figure 1.7) est composé de deux bandes. La principale, autour de 520 nm, correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Elle présente un

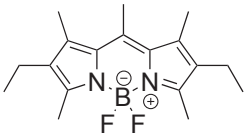


FIGURE 1.6 – Structure du BODIPY commercial PM567.

coefficient d'extinction molaire de 86×10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1} dans le toluène [18]. Le moment de transition pour la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est orienté selon l'axe C_2-C_6 (FIGURE 1.5). Pour cette bande, un épaulement vibrationnel décalé du maximum d'environ 1100 cm^{-1} vers les plus fortes énergies est observé. Celui-ci est attribué aux vibrations C-H hors du plan des noyaux aromatiques constituant le cœur BODIPY. La seconde bande, d'intensité plus faible, centrée vers 370 nm correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Le moment de transition de cette bande est quant à lui perpendiculaire à celui de la $S_0 \rightarrow S_1$ [34].

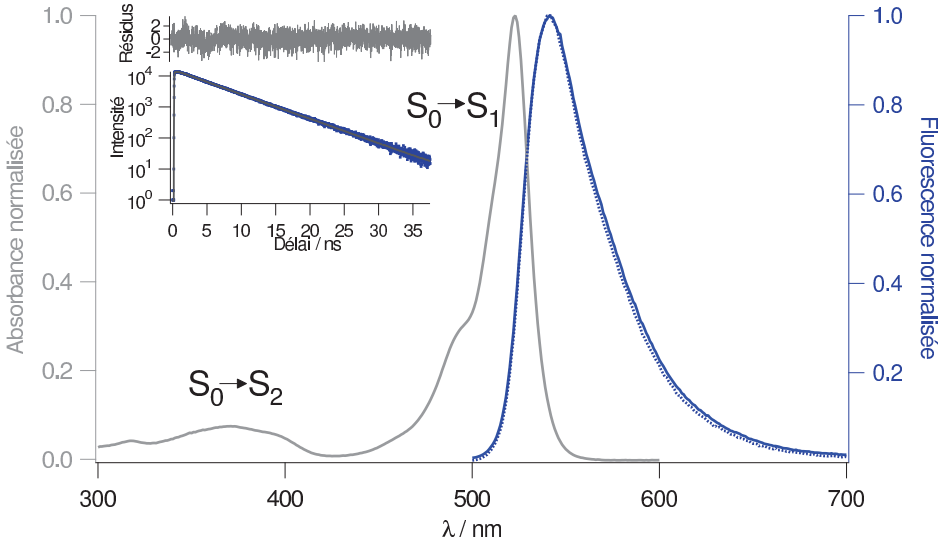


FIGURE 1.7 – Spectres du BODIPY PM567 enregistrés dans le toluène à 20°C ([PM567] $\approx 10^{-6}$ M). Spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (- : $\lambda_{exc} = 495$ nm et $\cdots$: $\lambda_{exc} = 370$ nm). Insert : déclin de fluorescence ($\lambda_{exc} = 495$ nm, $\lambda_{emF} = 540$ nm) (-), ajustement du déclin et résidus (-).

Le spectre d'émission de fluorescence (FIGURE 1.7) est quasiment le symétrique du spectre d'absorption avec un déplacement de Stokes d'environ 500 cm^{-1}. Ces résultats suggèrent que le BODIPY présente sensiblement la même géométrie à l'état fondamental (S_0) et à l'état excité (S_1). Le même spectre d'émission de fluorescence est enregistré si la molécule est excitée dans la bande $S_0 \rightarrow S_2$, confirmant que l'émission de fluorescence est due à la relaxation $S_1 \rightarrow S_0$. Le rendement quantique de fluorescence du PM567 dans le toluène est de 0,94, ce qui est classique pour les BODIPY (généralement, $0{,}5 < \Phi_F < 0{,}99$).

Enfin, le déclin de fluorescence du composé PM567 (FIGURE 1.7, insert) en solution

peut être ajusté par une fonction monoexponentielle décroissante, suggérant une relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ suivant une cinétique de premier ordre. La durée de vie de fluorescence trouvée est de 5,42 ns dans le toluène, ce qui est classique pour le BODIPY en solution (généralement $5 < \tau < 6$ ns). Les constantes de vitesses radiatives (k_r) et non radiatives (k_{nr}) sont respectivement de 1,7 $\times$ 10^8 s^{-1} et de 1,1 $\times$ 10^7 s^{-1}.

Solvatochromisme

Les BODIPY sont des molécules dont les propriétés spectroscopiques sont très faiblement dépendantes de l'environnement, contrairement aux rhodamines ou fluorescéines par exemple. Dans le Tableau 1.2 sont présentées les propriétés spectroscopiques du BODIPY PM567 dans différents solvants.

Tableau 1.2 – Propriétés photophysiques du PM567 dans différents solvants à 20°C [18].

Solvant	λ_{abs}	λ_{emF}	ε	Φ_F	τ
	nm	nm	$10^3 M^{-1}.cm^{-1}$		ns
cyclohexane	523	537	93	0,70	5,60
toluène	523*	541*	86	0,94*	5,42*
acétone	516	532	80	0,85	5,92
méthanol	516	532	79	0,91	6,10

* valeurs mesurées au PPSM.

Les maxima d'absorption et d'émission de fluorescence varient de quelques nanomètres seulement en passant du méthanol au cyclohexane. Un décalage hypsochrome des bandes d'absorption et d'émission de fluorescence est généralement observé dans les solvants polaires. À l'inverse, un décalage bathochrome est observé dans les solvants apolaires. Ce solvatochromisme négatif est couramment observé pour les BODIPY [35].

Cette faible sensibilité de la fluorescence du BODIPY à son environnement en fait un bon candidat pour l'élaboration de sondes fluorescentes pour le marquage biologique ou pour leur incorporation dans des matrices polymères.

Photostabilité

Les BODIPY sont des molécules également connues pour leur bonne photostabilité comparativement à d'autres fluorophores tels que ceux de la famille des fluorescéines [36]. La majeure partie des photodégradations du BODIPY est attribuée à l'oxydation du fluorophore par l'oxygène singulet : le BODIPY excité transfère son énergie à l'oxygène triplet, ce dernier devenant alors oxygène singulet, forme très oxydante. Des expériences en milieux saturés en azote ont pu montrer une nette amélioration de la stabilité du BODIPY, que ce soit en solution ou en matrice polymère (PMMA) [37]. Le rôle de l'oxygène a par

ailleurs été confirmé par des études du photoblanchiment de BODIPY dispersés dans des matrices polymères en présence d'inhibiteurs de l'état triplet du BODIPY. Une nette amélioration de la photostabilité du BODIPY est observée, le BODIPY ne pouvant alors plus transférer son énergie à l'oxygène pour le faire passer dans un état singulet [38].

Enfin, il a été observé à plusieurs reprises une amélioration de la stabilité des BODIPY lorsque ceux-ci sont incorporés ou copolymérisés à des matrices polymère, comparé au cas des fluorophores en solution. La photostabilité est d'autant plus marquée lorsque le fluorophore est lié de manière covalente à la matrice polymère plutôt que simplement dispersé dans celle-ci [39, 40]. Cela est attribué au fait que le lien covalent reliant le BODIPY à la matrice polymère permet au fluorophore dans son état excité de dissiper l'énergie non radiative à travers la chaîne polymère, plutôt qu'au BODIPY lui-même.

1.2.3 Modulation des propriétés spectroscopiques

Influence des groupements en position méso

L'ajout de groupements aromatiques ou aliphatiques en position méso du BODIPY n'a pas de grandes conséquences sur la position des maxima d'absorption et d'émission de fluorescence du BODIPY. Cet effet est principalement dû au fait que l'angle formé entre le groupement de la position méso et le noyau BODIPY est beaucoup plus fermé (70-80° pour un phényle) que celui sur les autres positions. Les groupements introduits auront donc une orientation restreinte et la conjugaison mésomère avec le noyau BODIPY sera presque impossible.

Si la substitution en position méso n'entraîne pas de changement des états énergétiques du BODIPY, elle peut fortement affecter la constante de vitesse non radiative. En effet, la présence d'un groupement phényle présentant une rotation peu contrainte entraîne une perte de rendement quantique de fluorescence et une diminution de la durée de vie de fluorescence par dissipation d'énergie non radiative. Holten et coll. ont montré que la restitution des processus radiatifs était possible : le procédé envisagé consiste à empêcher la libre rotation du phényle en le substituant par des groupements méthyles (Figure 1.8) [34]. Des expériences au PPSM ont montré que le même effet est observé en plaçant des méthyles en positions 1 et 7 des pyrroles. Les meilleures propriétés spectroscopiques sont obtenues lorsque toutes les positions au voisinage de la méso sont encombrées.

Un BODIPY présentant un phényle en position méso à rotation libre peut retrouver des propriétés de fluorescence intéressantes lorsqu'il est introduit dans un solvant visqueux ou dans une matrice polymère, l'environnement empêchant tout mouvement du cycle aromatique [41]. La substitution en méta ou en para du phényle introduit en position méso du BODIPY n'a alors plus d'influence sur les propriétés spectroscopiques du BODIPY [39] : en travaillant avec des BODIPY possédant un groupement aromatique réactif tel qu'un phénol il est alors possible d'envisager l'introduction facile de groupements fonctionnels tels que des fonctions vinyliques sans pour autant affecter les propriétés spectroscopiques

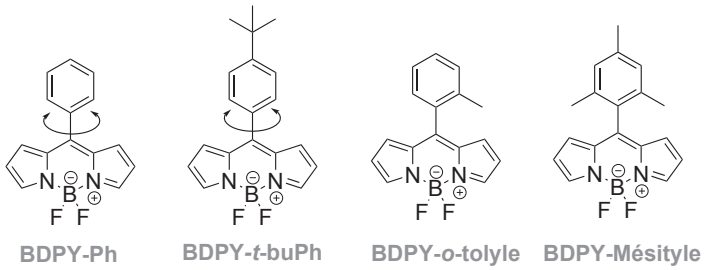


FIGURE 1.8 – Influence de l'encombrement du phényle en position méso sur les propriétés spectroscopiques du BODIPY (adapté de [34]).

du BODIPY.

Stratégies pour décaler l'émission de fluorescence des BODIPY vers le rouge

Comme évoqué précédemment, il peut être intéressant d'élaborer des sondes fluorescentes émettant vers le rouge, proche infra-rouge. À ces fins, différentes stratégies ont été développées sur le BODIPY (FIGURE 1.9) [42] :

- extension du système π
- rigidification de la structure
- remplacement du carbone en position méso du BODIPY par un azote (Aza-BODIPY)

L'extension du système conjugué π est principalement réalisée par substitution en positions 3 et 5 du pyrrole. Des substitutions en positions 1 et 7 auraient les mêmes conséquences sur les propriétés spectroscopiques mais sont plus difficiles à réaliser en raison des conditions de synthèse des pyrroles.

Dans le cas du composé **a** [43], l'insertion d'un groupement aromatique peut être réalisée par une synthèse du pyrrole correspondant *via* une réaction de Trofimov [44]. Au PPSM, différents substituants aromatiques ont ainsi été introduits sur le BODIPY, modulant l'émission de fluorescence de 601 à 626 nm [45].

Une extension de conjugaison peut également être apportée par la présence de groupements styryles ou alcynes. Les BODIPY **b** et **c** peuvent ainsi être obtenus par une post-fonctionnalisation *via* un couplage catalysé au palladium (type Heck, Sonogashira) [46, 47]. Le composé **c** peut également être obtenu par substitution nucléophile aromatique des protons en positions 3 et 5 des pyrroles [48] et par condensation de type Knoevenagel [49]. Cette dernière approche a été développée au PPSM sur des BODIPY ayant un groupement pentafluorobenzène en position méso et une série de BODIPY, émettant de 620 à 740 nm selon la nature de l'aromatique introduit, a été synthétisée [50, 51].

Le composé **d** est rendu émissif vers le rouge par rigidification du lien BODIPY-substituant [52]. Par cette planéarité, la conjugaison entre le cœur BODIPY et les aromatiques est favorisée. La synthèse du composé **d** est réalisée par une réaction de Trofimov du pyrrole de départ. Le composé **e** est lui aussi rendu rigide en créant des liens entre

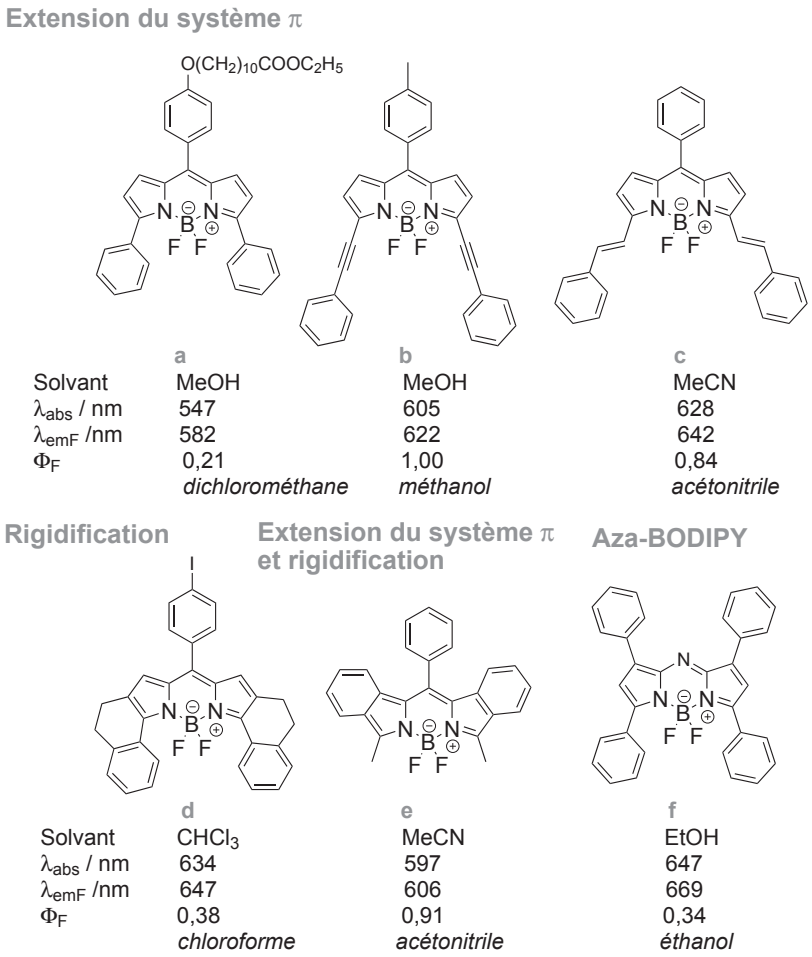


FIGURE 1.9 – Stratégies pour décaler l'émission de fluorescence des BODIPY vers le rouge (adapté de [42]).

les positions (1 et 2) et (6 et 7) des pyrroles, tout en présentant également un système π étendu [53]. Cette structure est obtenue par une réaction de rétro Diels-Alder.

Enfin, la famille des Aza-BODIPY (**f**), notamment étudiée par l'équipe de O'Shea en Irlande, émet dans le proche infra-rouge [54, 55]. Le remplacement du carbone en position méso par un azote stabilise l'orbitale moléculaire basse vacante et réduit ainsi l'écart énergétique entre l'état fondamental et l'état excité.

Influence des positions 2 et 6

Les positions 2 et 6 ont peu d'influence sur les propriétés spectroscopiques du BODIPY. Elles n'en sont pas moins utilisées car elles peuvent permettre de réaliser la polymérisation du BODIPY *via* son cœur [56, 57, 58]. Les polymères alors obtenus sont π-conjugués et peuvent être utilisés pour l'élaboration de dispositifs photovoltaïques. Li et coll. ont ainsi pu copolymériser des BODIPY à fonction di-iodo avec des BODIPY à fonction di-éthynyle par un couplage de type Sonogashira [59]. L'extension de conjugaison permet d'obtenir des matériaux émissifs dans le rouge, proche infra-rouge. Il est, bien sûr, possible de coupler cet effet avec l'ajout de substituants π-conjugués en positions 3 et (5 ou 8) afin de décaler encore plus l'émission de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde [60]. Bard et coll. se sont quant à eux intéressés à la polymérisation par voie oxydante de BODIPY ou Aza-BODIPY présentant des positions 2 et 6 libres (Figure 1.10) [61]. La longueur d'onde d'émission de fluorescence du matériau formé dépend du nombre d'unités de monomères dans la chaîne polymère.

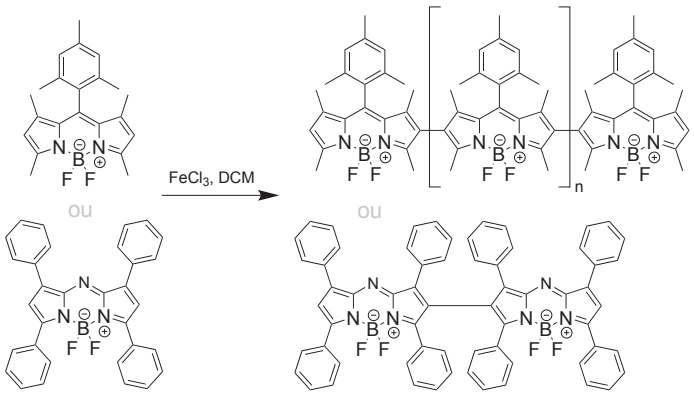


Figure 1.10 – Polymères à base BODIPY ou Aza-BODIPY développés par Bard et coll. (adapté de [61]).

L'inconvénient de ces méthodes de polymérisation est qu'elles ne permettent pas un bon contrôle de la masse molaire des chaînes macromoléculaires.

1.2.4 Principaux champs d'applications

Les BODIPY peuvent être utilisés pour l'élaboration de matériaux photovoltaïques comme cela vient d'être évoqué. Ils peuvent également être employés comme colorants

laser car leur bande d'émission de fluorescence est assez étroite [37, 62, 38, 40]. Leurs propriétés d'émission au-delà de 600 nm peuvent être mises à profit pour la biologie, ils peuvent notamment servir de marqueurs de protéines [63], de membranes cellulaires (BODIPY modifiés par une chaîne lipidique) [64] ou d'ADN [65]. La société Molecular Probes (Invitrogen) développe et vend des BODIPY à ces fins. Enfin, les BODIPY sont utilisés comme senseurs de pH [66, 67], de cations, d'anions [68]. La détection repose le plus souvent sur une modulation de l'émission de fluorescence par transfert d'électron photo-induit (TEP) [1].

1.3 Nanoparticules luminescentes

D'une manière générale, les nanoparticules sont des assemblages de plusieurs milliers d'atomes formant un objet de 1 à 1000 nm, leur conférant un rapport surface sur volume très important. À titre comparatif, les nanoparticules ont des dimensions de l'ordre des protéines ou des virus (Figure 1.11). Pour que la circulation dans les vaisseaux sanguins et l'internalisation par les cellules eucaryotes par endocytose [69] soient les plus efficaces, il faut que leur diamètre hydrodynamique soit inférieur à 150 nm [70, 71].

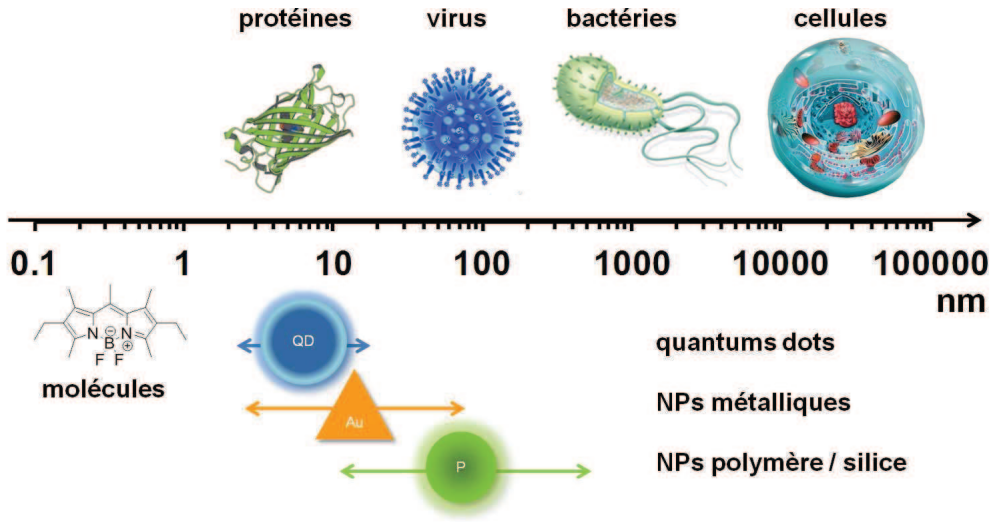


Figure 1.11 – Ordre de grandeur des tailles des nanoparticules les plus courantes comparé à celui des principales structures biologiques.

La première génération de nanoparticules rassemblait les colloïdes stables en milieux aqueux. Ces objets étaient généralement stabilisés par des tensioactifs mais étaient rapidement éliminés par les macrophages par phagocytose.

La seconde génération de nanoparticules est rendue furtive afin d'augmenter leur durée de vie dans la circulation sanguine [72, 73]. Pour cela, les nanoparticules sont le plus souvent couvertes de polymères hydrophiles comme des polysaccharides (type dextran) ou le poly(ethylène glycol) (PEG ou PEO pour poly(oxyde d'éthylène)). Ce dernier, certainement le plus utilisé, empêche l'adsorption non spécifique de protéines sur des surfaces par

répulsion stérique [74]. Plus la densité de greffage et la masse molaire des chaînes ($M_w > 2$ kg.mol^{-1}) seront importantes, meilleure sera son efficacité [75, 76, 77, 78, 79]. Le PEO est commercialement disponible avec une grande variété de fonctions d'extrémités de chaînes (identiques ou différentes), permettant son greffage à la surface des nanoparticules ou bien la préparation de copolymères à blocs (FIGURE 1.12).



FIGURE 1.12 – Structure du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) ou poly(éthylène glycol) (PEG).

La troisième génération de nanoparticules va encore plus loin car elle permet la fonctionnalisation de la surface par des molécules d'intérêt biologique reconnues par des cellules/tissus cibles [80, 81]. Ainsi des protéines, des anticorps, des aptamères peuvent être greffés en surface [82, 83, 84].

Les nanoparticules luminescentes peuvent être inorganiques (semi-conducteurs, silice, or, diamant, ...) ou organiques (polymère, ...), intrinsèquement luminescentes ou rendues luminescentes par dopage. Elles peuvent être classées par la nature chimique de leur cœur, porteur dans la plupart des cas de la luminescence, mais la nature de leur surface est tout aussi importante comme cela vient d'être abordé. Ces nanoparticules fluorescentes "multifonctionnelles" sont largement utilisées en milieux biologiques comme marqueurs ou comme nanosenseurs, mais aussi comme nouvelles nanoplateformes d'analyse [85, 86, 87, 88, 89, 90]. Cette section tentera de comparer les sondes les plus couramment utilisées en différenciant les nanoparticules intrinsèquement luminescentes des nanoparticules rendues fluorescentes par dopage, en insistant sur les particules polymères (FIGURE 1.11).

1.3.1 Objets nanométriques intrinsèquement luminescents

Quantums Dots (QDs)

Les quantums dots ou "boîtes quantiques" en français sont des nanocristaux semi-conducteurs d'un diamètre variant de 2 à 10 nm. Ils sont constitués d'atomes des groupes II et VI (CdSe ou CdTe) ou III et V (InP ou InAs). La luminescence de ces objets est due à la relaxation radiative des électrons depuis la bande de conduction vers la bande de valence (cette différence énergétique correspond à la bande interdite). En faisant varier la nature des atomes de cœur et/ou de surface et la taille des cristaux, il est possible de moduler l'émission de luminescence des QDs de 400 à 1400 nm (FIGURE 1.13) [91]. Les QDs peuvent être jusqu'à 10 fois plus brillants que les fluorophores classiques mais surtout ont des bandes d'émission fines, des durées de vie de luminescence très longues (10-100 ns) et sont très photostables [24]. Ces nanocristaux sont généralement synthétisés par dissolution des précurseurs dans un solvant organique de type octadécène en présence

de ligands (généralement l'oxyde de trioctylphosphine - TOPO) puis chauffage à très haute température ($\approx 300^{\circ}C$) [92, 93]. Le choix des ligands est capital car les défauts de surface dans la structure cristalline vont jouer le rôle de "trous", empêchant les relaxations radiatives. L'alternance des phénomènes de piègeage/dépiégeage mène à des phénomènes de clignotement des QDs et diminue leur rendement quantique de luminescence. Étant donné que les QDs sont très petits, leur rapport surface/volume est grand et donc ces phénomènes peuvent être très importants.

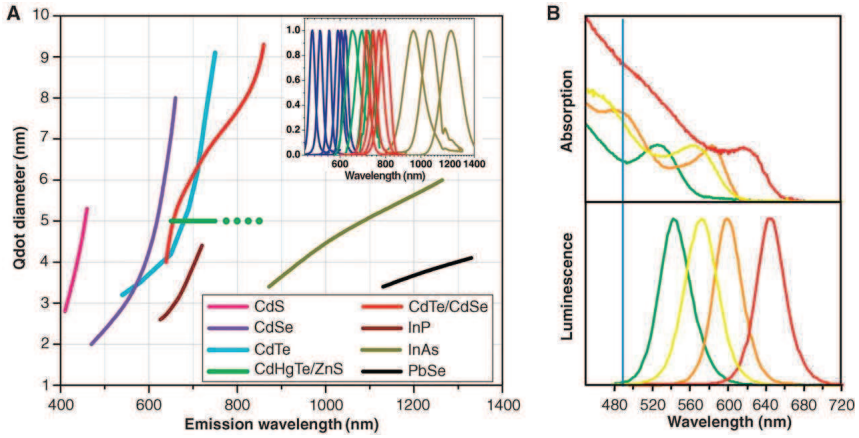


FIGURE 1.13 – A. Longueurs d'ondes maximales d'émission de luminescence corrélées à la taille et à la nature de cœur de différents QDs. Insert : spectres d'émission de luminescence pour certaines natures de cœur. B. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de QDs CdSe/ZnS. Le trait plein correspond à la longueur d'onde d'un laser à argon (λ_{exc} = 488 nm) pouvant être utilisé pour exciter les QDs (issu de [91])

Afin d'améliorer les propriétés spectroscopiques des QDs, il a été envisagé de fabriquer des QDs cœur/couronne. Pour cela, les QDs sont couverts d'une couche de matériaux semi-conducteurs ayant une bande interdite plus large, par exemple CdSe/ZnS [94]. La fabrication de la couronne est faite dans un second temps, après création du cœur. Plus celle-ci est épaisse, plus le QD est protégé de l'environnement extérieur [95] mais alors le QD devient plus gros (jusqu'à 15 nm).

Enfin, les QDs restent malgré cela des objets hydrophobes à cause des ligands de surface utilisés dans leur synthèse. À des fins d'application en biologie, il est alors indispensable de pouvoir les post-fonctionnaliser. Différentes stratégies ont été développées comme la substitution du ligand originel TOPO par des ligands amphiphiles à fonction thiol, acide carboxylique, amine, PEO [27, 96, 97]... Malheureusement, dans la plupart des cas ce changement de ligand conduit à une agrégation des QDs entre-eux et/ou à une perte de luminescence. Une autre stratégie consiste à encapsuler les QDs dans des matrices organiques. Dubertret et coll. ont ainsi couvert des QDs par des phospholipides mais l'ancrage des phospholipides n'était pas bien assuré [98]. Des copolymères (à bloc ou statistiques) amphiphiles ont alors été utilisés, type PEO, PAA ou polycyanoacrylate

modifié [99, 100, 101, 102]. Les polymères ont un double rôle : stabiliser les QDs dans l'eau par répulsion stérique et/ou électrostatique et les rendre biocompatibles. Les nanoparticules ainsi obtenues sont en général beaucoup plus grosses que les QDs de départ, avec des diamètres variant entre 20 et 200 nm.

Ainsi, Snee et coll. ont encapsulé des QDs de CdSe dans des polymères amphiphiles de poly(acide acrylique-*co*-octylamide) [103]. L'homopolymère de PAA est obtenu par une polymérisation RAFT (§1.4.2) en milieu homogène. Puis, par couplage peptidique entre les fonctions acide carboxylique du polymère et l'octylamine, un copolymère amphiphile statistique est obtenu. La fonction RAFT dithiobenzoate du polymère peut être réduite en thiol [104] afin d'obtenir une fonction réactive supplémentaire sur le polymère. Les QDs ont alors été recouverts de ce copolymère amphiphile et la réactivité de la fonction thiol a été testée en faisant réagir un BODIPY ou une fluorescéine à fonction maléimide. Le BODIPY s'avère trop hydrophobe pour pouvoir conclure que sa présence est liée à un couplage covalent ou à une adsorption non spécifique. Avec la fluorescéine, un fluorophore plus polaire, le greffage covalent est prouvé. De plus, cette molécule sensible au pH permet de réaliser un senseur pH ratiométrique.

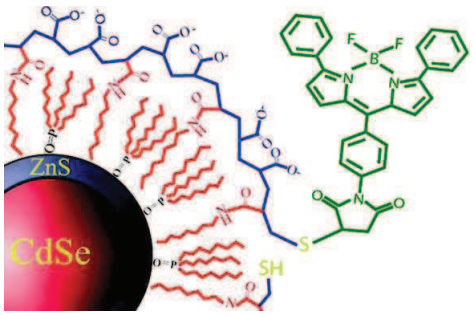


FIGURE 1.14 – Encapsulation de quantums dots CdSe/ZnS par un copolymère amphiphile synthétisé par RAFT puis fonctionnalisé par un BODIPY *via* une chimie click [103]. *Utilisé avec permission depuis Yingchuan Chen et coll., Imparting Nanoparticle Function with Size-Controlled Amphiphilic Polymers, Journal of the American Chemical Society, 130, 3744-3745, 2008. Droits d'auteur 2008 American Chemical Society.*

Des QDs ont également été couverts par une première couche de silice puis par une seconde couche de polymère [105]. La couche protectrice organique peut aussi être fonctionnalisée par des molécules d'intérêt biologique ou par d'autres fluorophores.

Les QDs sont donc des nanoparticules aux propriétés spectroscopiques intéressantes mais, à des fins d'application en biologie, il est nécessaire de les fonctionnaliser. Leur fonctionnalisation nécessite souvent plusieurs étapes et modifie fortement leurs propriétés spectroscopiques. Cela en fait tout de même certainement les nanoobjets luminescents les plus utilisés à ce jour en imagerie biologique ou médicale mais leur toxicité reste un de leurs principaux inconvénients [106, 107, 108] à cause du relargage de leurs atomes de cœur [91, 109].

Autres nanoparticules intrinsèquement luminescentes

L'utilisation de QDs pour le vivant étant très controversée, d'autres nanoparticules inorganiques *a priori* plus biocompatibles ont été développées [110, 111].

Les **Carbons Dots**, encore peu étudiés, sont présentés comme étant une alternative moins toxique aux QDs [112, 113]. Ils sont constitués d'une nanoparticule de carbone passivée en surface par des polymères comme des PEO diamines [114]. Le diamètre de l'objet final est compris entre 5 et 20 nm. L'émission de luminescence varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation choisie et peut aller de 450 à 650 nm. Les durées de vie sont d'environ 5 ns et les rendements quantiques varient de 0,10 à 0,04 lorsque la longueur d'onde d'émission de luminescence passe de 450 à 650 nm.

Les nanodiamants luminescents (NDs) sont également présentés comme étant une nouvelle alternative moins toxique aux QDs [26]. En effet, ces nanoparticules sont exclusivement constituées de carbone et d'azote, leur luminescence étant due aux centres colorés azote-lacune $(N\text{-}V)^-$. Ces centres absorbent vers 560 nm et émettent vers 700 nm avec un rendement quantique de fluorescence proche de 1 [25]. Les brillances, photostabilités et durées de vie des NDs sont similaires à celles des QDs mais les longueurs d'onde d'émission de luminescence des NDs ne sont pas modulables contrairement aux QDs. De plus, les diamètres des NDs sont légèrement supérieurs à ceux des QDs (20 - 100 nm).

Les nanophosphores (NPhs) sont des cristaux inorganiques luminescents de fluor (LaF_3, YF_3, $NaYF_4$), d'oxyde (Y_2O_3) ou de phosphate ($LaPO_4$) dopés de terres rares (Tm^{3+}, Er^{3+} ou Yb^{3+}). Leur synthèse est faite dans des conditions similaires à celle des QDs. Le diamètre des NPhs ainsi obtenus varie de 50 à 200 nm. Ces nanocristaux émettent sous forme de raies pouvant aller de 500 à 700 nm [115]. Les NPhs sont de nature hydrophobe et il faut donc couvrir leur surface (tensioactifs, silice, polymères...) [116], tout comme les QDs, pour les rendre applicables en biologie [117, 118]. Comme les NDs, ces nanoparticules offrent une bonne alternative aux QDs en terme de toxicité mais leur inconvénient réside dans le fait que leur synthèse et la fonctionnalisation de leur surface sont assez compliquées.

Les nanocristaux fluorescents organiques sont constitués de molécules organiques fluorescentes et généralement stabilisés par des tensioactifs. Ces nanocristaux peuvent être synthétisés par nanoprécipitation [119], microfluidique [120, 121], ablation laser [122, 123], procédés sol-gel [124, 125], auto-assemblage de fluorophores amphiphiles [126, 127]. Leurs propriétés sont directement liées à la nature du fluorophore dont ils sont constitués et les tailles obtenues varient fortement d'un procédé à l'autre. Au PPSM, des nanocristaux à base de BODIPY ont été synthétisés par microfluidique notamment [128]. Dans la plupart des cas, les NPs obtenues sont hydrophobes et doivent donc subir une modification de

surface pour pouvoir être utilisées en milieux biologiques.

Enfin, les **nanoparticules métalliques**, qui sont intrinsèquement non fluorescentes, sont utilisées telles quelles comme agent de contraste. Les plus courantes sont les particules d'or, supposées fortement biocompatibles [129]. Les nanoparticules ferriques sont également utilisées car, en plus d'être de très bons agents de contraste, elles permettent de faire une détection par magnétisme [130]. Ces nanoparticules peuvent être couvertes par des (macro-)molécules afin d'introduire des fonctionnalités de surface [131, 132] et alors de greffer des fluorophores comme le BODIPY [133, 134].

Toutes ces nanoparticules présentent des caractéristiques spectroscopiques intéressantes. Néanmoins, la plupart ne sont pas stables en milieux aqueux et la fonctionnalisation de leur surface n'est pas toujours simple à mettre en œuvre. De plus, certaines, comme les QDs, sont potentiellement toxiques. Les nanoparticules polymères ou à base de silice paraissent donc être une bonne alternative en terme de simplicité de chimie et de biocompatibilité. Ces particules n'étant pas intrinsèquement fluorescentes, il va falloir insérer de façon covalente ou non des fluorophores dans leur cœur ou à leur surface.

1.3.2 Nanoparticules rendues fluorescentes par dopage

Les nanoparticules de silice ou de polymère sont *a priori* des matériaux moins toxiques que les QDs. La silice et la plupart des polymères n'absorbent pas ou très peu dans le visible. Néanmoins, ces NPs n'étant pas intrinsèquement fluorescentes, il faut introduire des centres luminescents en leur cœur ou sur leur surface pour qu'elles puissent le devenir. Les fluorophores étant dans la plupart des cas des molécules hydrophobes, ils sont généralement placés au cœur des matériaux. La surface des NPs sert alors de plateforme fonctionnelle permettant l'introduction de molécules d'intérêt biologique, de groupements type PEO pour rendre les NPs furtives ou bien encore d'autres chromophores hydrosolubles sensibles à l'environnement (pH, métaux, température...) afin de réaliser des senseurs.

Nanoparticules de silice

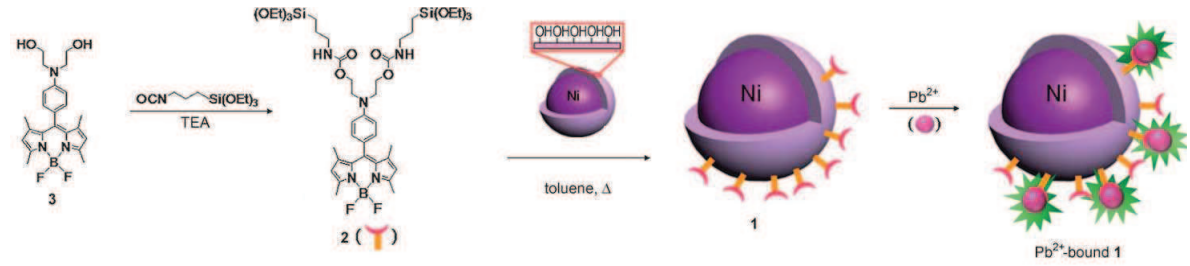
Les nanoparticules de silice (SiO_2) sont principalement synthétisées *via* deux méthodes : par un procédé sol-gel (méthode de Stöber [135]) ou par microémulsion inverse [136]. Les objets obtenus par ces méthodes peuvent mesurer entre 20 nm et 2 μm. De nombreuses nanoparticules à application en biologie ont ainsi été fabriquées [137].

Une grande variété de fluorophores peuvent être introduits dans le cœur des nanoparticules de silice par ces méthodes [138, 139]. Par exemple, Sokolov et coll. ont inséré une rhodamine 6G dans une matrice de silice [140]. Les nanoparticules obtenues mesurent entre 20 et 50 nm et les auteurs ont incorporé jusqu'à 700 fluorophores par particule. La brillance des objets est environ 700 fois supérieure à celle de la rhodamine 6G. Néanmoins,

la silice étant un matériaux poreux, les fluorophores incorporés doivent être liés de manière convalente à la silice afin d'éviter tout relargage [141]. Ceci est réalisé en insérant une fonction silane aux fluorophores. Ainsi, Prasad et coll. ont travaillé avec une Rhodamine silane afin d'éviter ces problèmes [142].

En ce qui concerne la fonctionnalisation de surface des NPs de silice, une méthode classique consiste à polymériser les fonctions alcool à la surface de la silice avec des silanes : soit la molécule à greffer possède déjà une fonction silane, elle est donc attachée telle quelle, soit de l'aminopropylsilane (APS) est greffé, ce qui est le cas le plus courant. Ainsi, des fonctions amines sont disponibles à la surface de la silice et, par couplage peptidique, des (macro-)molécules portant des fonctions acide carboxylique peuvent y être attachées [142, 143].

La silice est également largement employée pour couvrir des particules inorganiques (fer, QDs...) apolaires pour les rendre dispersables dans l'eau et introduire des fonctions de surface [144].



Schème 1.3 – Synthèse des nanosenseurs au plomb, magnétiques, fonctionnalisés par du BODIPY de Jung et coll. [145]. *Utilisé avec permission depuis Hye Young Lee et coll., A Selective Fluoroionophore Based on BODIPY-functionalized Magnetic Silica Nanoparticles : Removal of Pb^{2+} from Human Blood, Angewandte Chemie International Edition, 48, 1239-1243, 2009. Droits d'auteur 2009 John Wiley and Sons.*

Enfin, il est possible d'élaborer des nanosenseurs à base de silice [146]. Jung et coll. ont greffé un BODIPY sensible au plomb (Pb^{2+}) sur des nanoparticules de nickel recouvertes de silice (Schème 1.3) [145, 147]. Ce BODIPY n'est pas fluorescent car il y a transfert d'électron photo-induit (TEP) entre le doublet non liant sur l'azote et le benzyle du BODIPY ($\Phi_F = 0{,}07$). En présence de plomb (Pb^{2+}), le TEP est bloqué et la fluorescence du BODIPY en partie restaurée (Φ_F max $= 0{,}19$). Les auteurs ont alors synthétisé des NPs magnétiques à cœur nickel, couvertes par de la silice (méthode de Stöber), sur lesquelles ils sont venus greffer le BODIPY à fonction silane. Les objets ont un diamètre de 30-40 nm et permettent de mesurer des concentrations en plomb jusqu'à 5×10^{-7} M (Φ_F particule $\approx 0{,}005$). Les particules étant magnétiques par leur cœur, il est facile de séparer les particules complexées au plomb du milieu d'analyse avec un aimant.

Nanoparticules polymères

L'intérêt des polymères réside dans la large variété d'objets pouvant être synthétisés. Le nombre de possibilités offertes est quasiment aussi large que le nombre de monomères existant avec différentes sensibilités (pH, température...) [148, 149, 150]. Il existe divers types d'objets polymères fluorescents dispersables dans l'eau comme les dendrimères [151, 152], les liposomes, les microgels ou bien encore les latex (FIGURE 1.15) [153, 154, 155, 156]. Cette section ne traitera que de ces deux derniers types d'objets.

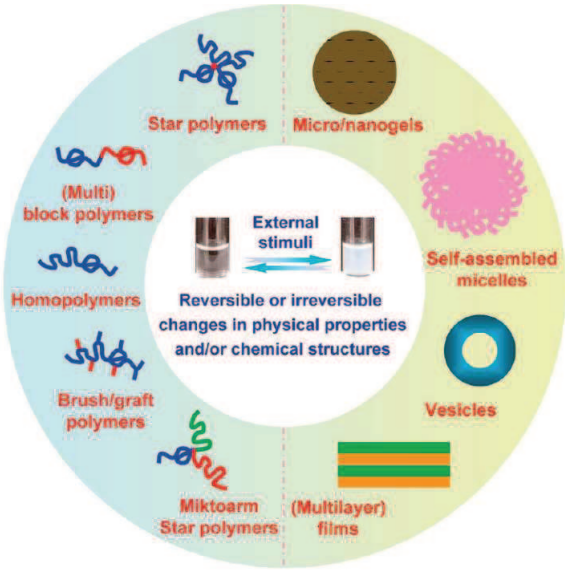


FIGURE 1.15 – Illustration de la variété d'objets polymères existant (chaînes à différentes topologies, microgels, micelles auto-assemblées, vésicules, multicouches, ...) [154]. *Utilisé avec permission depuis Jinming Hu et Shiyong Liu, Responsive Polymers for Detection and Sensing Applications : Current Status and Future Developments, Macromolecules, 43, 8315-8330, 2010. Droits d'auteur 2010 American Chemical Society.*

• Polymères hydrosolubles fluorescents

Les microgels ou nanogels aqueux sont des NPs gonflées par l'eau. Ils sont composés de chaînes polymères hydrosolubles réticulées. Il est possible de rendre les microgels fluorescents en copolymérisant le(s) monomère(s) hydrophile(s) avec un fluorophore monomère ou en post-fonctionnalisant les chaînes avec des fluorophores [157]. Dans tous les cas, pour ce type d'objet fluorescent, le fluorophore doit être lié de manière covalente avec le polymère car celui-ci est gonflé par le solvant. Scharff-Poulsen et coll. ont copolymérisé une rhodamine B (RhBAM) et une fluorescéine à fonction acrylamide (FAM) avec de l'acrylamide (AM) et du bisacrylamide (BAM) par une polymérisation en microémulsion inverse [158]. Les microgels mesurent 50 nm et contiennent en moyenne 5,7 FAM et 75 RhBAM par particule. Les microgels sont sensibles au pH grâce à la fluorescéine et permettent de faire un senseur pH ratiométrique sensible entre pH 5,8 et 7,2. Enfin, le photoblanchiment des microgels a été étudié et il s'avère que les fluorophores copolymérisés aux microgels photoblanchissent légèrement moins que les fluorophores libres en

solution.

Andresen et coll. ont quant à eux choisi de post-fonctionnaliser des microgels de P(AM-*co*-BAM-*co*-MAMCl) (MAMCl : hydrochlorure de (3-propylamine) méthylacrylamine) de 60 nm de diamètre environ [159]. Les microgels sont post-fonctionnalisés par trois sondes fluorescentes sensibles au pH : de l'"Oregon Green", de la fluorescéine et de la rhodamine B. Cela leur permet d'avoir des microgels pouvant mesurer le pH intra-cellulaire de 3,5 à 6,5.

Les microgels peuvent être rendus thermosensibles en incorporant un bloc polymère présentant une LCST (Lower Critical Solution Temperature) par exemple. Dans le cas des polymères à LCST (type PNIPAM - poly(*N*-isopropylacrylamide)), la chaîne sera en bon solvant à T<LCST et en mauvais solvant pour T>LCST. Le PNIPAM présente une LCST vers 37°C ce qui en fait un candidat intéressant pour des applications en biologie.

Des nanothermomètres [160] ou nanosenseurs de glucose [161] ont ainsi été synthétisés à partir de nanogels.

Une alternative aux microgels est l'utilisation de **chaînes polymères fluorescentes hydrophiles** non réticulées pouvant devenir hydrophobes ou amphiphiles sous l'action d'un stimulus externe (T, pH). Elles s'agrègent alors de manière réversible sous forme d'agrégats micellaires (non réticulés).

Shiraishi et coll. ont ainsi synthétisé des chaînes de copolymères P(NIPAM-*co*-BODIPY) de M_n = 132 kg/mol ayant 1 BODIPY pour 3200 unités NIPAM [162]. Le BODIPY est inséré dans la chaîne polymère par post-fonctionnalisation en faisant réagir un krypto BODIPY ayant une fonction pyridine en position méso sur une chaîne de P(NIPAM-*co*-CMS) (CMS : chlorométhylstyrène). À T<LCST les chaînes sont libres dans l'eau, en bon solvant, et à T>LSCT, les chaînes s'agrègent entre-elles et forment des agrégats de 80 nm environ. Le rendement quantique de fluorescence des objets passe de 0,05 à 15°C à 0,25 à 35°C (monomère dans l'eau : 0,06). Cela est attribué à la diminution de la mobilité du BODIPY lorsque les globules se forment, diminuant alors les désactivations par voie non radiative. Ce type d'objet peut être utilisé comme nanothermomètre.

Le même principe peut être appliqué en copolymérisant un fluorophore avec un polymère sensible au pH comme un polyacrylate possédant des amines tertiaires en bout de chaîne [163] ou le poly(acide acrylique).

Enfin, Liu et coll. ont combiné plusieurs approches pour obtenir des polymères à double fonctionnalité, thermosensibilité et : photochromisme [164], sensibilité au glucose [165] ou au pH [166]. Ces derniers sont synthétisés en trois étapes par une polymérisation RAFT en milieu homogène puis une post-fonctionnalisation. Dans un premier temps, un copolymère de RhBAM et d'oligo(éthylène glycol) monométhyl éther méthacrylate (OEGMA) est synthétisé dans le dioxane ($P(OEGMA_{99,5\%}$-*co*-$RhBMA_{0,5\%})_{90}$). Ensuite, un second bloc hydrophile est ajouté en copolymérisant du NIPAM avec de l'hydrochlorure de *N*-(3-

aminopropyl) méthacrylamide (APMA) dans un mélange eau/dioxane (P(NIPAM$_{98\%}$-*co*-APMA$_{2\%}$)$_{36}$-*b*-P(OEGMA$_{99,5\%}$-*co*-RhBMA$_{0,5\%}$)$_{90}$). Enfin, la fluorescéine isothiocyanate (FITC) est attachée aux chaînes de copolymères par un groupement thiourée afin d'obtenir le copolymère P(NIPAM$_{98\%}$-*co*-FITC$_{2\%}$)$_{36}$-*b*-P(OEGMA$_{99,5\%}$-*co*-RhBMA$_{0,5\%}$)$_{90}$. Une chaîne contient donc en moyenne 0,72 molécules de FITC et 0,49 molécules de RhBMA. À T<LCST les chaînes sont libres en solution (R_h = 4 nm) alors qu'à T>LCST les chaînes s'assemblent en agrégats micellaires (R_h = 22 nm) car le copolymère devient amphiphile. À pH <6, la RhBMA est fluorescente (forme ouverte) alors qu'en milieu basique elle n'est pas fluorescente (forme spirolactame). À l'inverse, la FITC n'est pas fluorescente en milieu acide (forme spirolactone) mais devient fluorescente en milieu basique (forme ouverte). De plus, à pH constant, il est observé que l'intensité de fluorescence de la FITC diminue alors que celle de la RhBMA augmente lorsque la température augmente. Ceci est attribué à des transferts d'énergie de type FRET depuis la FITC vers la RhBMA qui sont de plus en plus favorables lorsque la température augmente. En effet, à T>LCST, les chaînes forment des agrégats micellaires, et la distance entre fluorophores diminue. Les copolymères/microgels ainsi formés ont une double sensibilité au pH et à la température (Figure 1.16). Ces senseurs sont ratiométriques puisqu'en excitant les objets à 495 nm et en enregistrant l'émission de fluorescence respectivement à 522 nm pour la FITC et à 588 nm pour la RhBMA, et ceci à différents pH et températures, il est possible d'établir une droite d'étalonnage intrinsèque à l'objet.

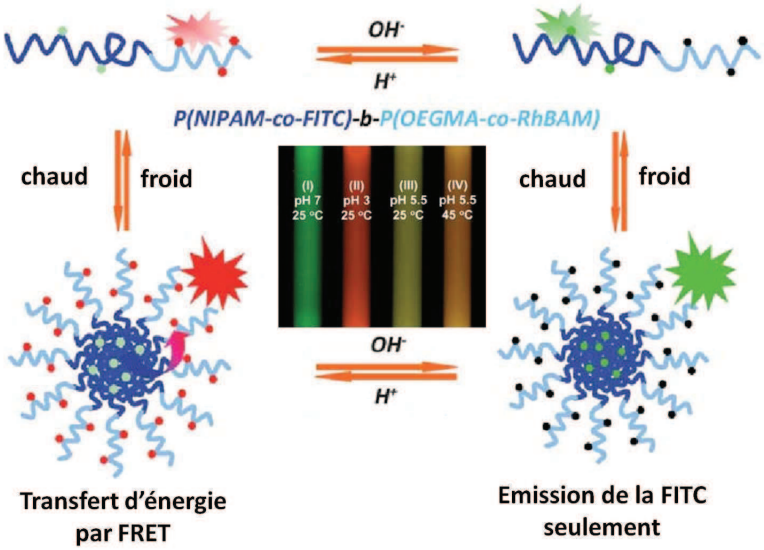


Figure 1.16 – Microgels thermo- et pH-sensibles développés par Shiyong et coll. (adapté de [166]).

• **Latex fluorescents**

Les latex sont des objets polymères dispersés dans l'eau, d'une taille pouvant aller de 10 nm à quelques μm, dont le cœur est hydrophobe (réticulé ou non). Les polymères les plus courants dans l'élaboration de latex fluorescents sont le polystyrène (PS) et poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA). Ces deux polymères ont l'avantage de présenter une température de transition vitreuse (T_g) vers 100°C, ce qui confère aux latex un cœur rigide à température ambiante. De plus, ces deux polymères n'absorbent pas ou quasiment pas dans le visible. Les deux types de monomères dont ils sont issus peuvent être (co)polymérisés par des méthodes de polymérisation radicalaire.

Des dispersions de NPs polymères dans l'eau peuvent être élaborées par différentes méthodes. Dans la méthode par déplacement ou évaporation de solvant, des chaînes polymères amphiphiles sont d'abord synthétisées puis, dans un second temps, assemblées sous forme d'agrégats micellaires. Le fluorophore est la plupart du temps copolymérisé avec le monomère principal dans la première étape. Des NPs fluorescentes peuvent être obtenues *in situ* durant le processus de polymérisation en utilisant des méthodes de polymérisation en milieu aqueux dispersé. Les fluorophores peuvent alors être incorporés aux NPs dans un second temps au cœur des objets par des méthodes de gonflement ou de post-greffage en couronne des NPs. Les fluorophores peuvent également être incorporés dès le début de la polymérisation en milieu aqueux dispersé en les mélangeant aux monomères hydrophobes (styrène, MMA...). Le cas particulier des monomères fluorescents copolymérisés par des méthodes en miniémulsion sera abordé dans le paragraphe 1.4.3.

La méthode la plus simple d'élaboration de latex fluorescents est la méthode par **déplacement de solvants**. Il s'agit de synthétiser des copolymères amphiphiles, de les isoler, puis de les redisperser dans un bon solvant miscible à l'eau (généralement du THF). Ensuite, la solution est lentement additionnée dans de l'eau sous forte agitation. Il faut procéder à une dialyse suite à la formation des nanoparticules afin d'éliminer les chaînes libres en solution et les solvants organiques. Cette méthode, assez simple, est relativement longue à mettre en œuvre et la taille des micelles obtenues pas toujours très reproductible (dépend de la T, de l'agitation...). De plus, les concentrations en NPs accessibles sont peu élevées ($<$ 1 wt %). Wu, Tong et coll. ont synthétisé des copolymères à blocs photosensibles PEO_{110}-*b*-PS_{41-259}-*b*-$PSPMA_{4-8}$ (PSMPA : poly(2-3-[3',3'-diméthyl-6-nitrospiro(indoline-2',2-[2*H*-1]benzopyran)-10-yl]propanoyloxy-éthyl-méthacrylate) par ATRP (section 1.4.1) [167, 168]. Le SPMA est un photochrome, les objets obtenus présentent donc un mode "allumé" et un mode "éteint" selon l'irradiation UV ou visible utilisée. Avec un bloc PS de 85 unités et un bloc PSPMA de 8 unités, les objets mesurent 58 nm et contiennent 1700 photochromes environ par objet.

Dans les rares cas où les copolymères amphiphiles ne sont pas trop hydrophobes, il est possible de former directement les micelles en solubilisant les copolymères dans l'eau et en agitant la solution pendant un temps suffisamment long pour que les micelles puissent

se former [169, 170]. Ensuite, les dispersions peuvent être purifiées par filtration.

La méthode par émulsification et évaporation de solvant consiste à solubiliser le polymère dans un bon solvant (non miscible à l'eau) et à ajouter de l'eau et des tensioactifs. Puis la solution est passée aux ultra-sons afin de former les objets. Enfin, le solvant organique est évaporé et les nanoparticules purifiées par dialyse ou filtration. Gabor et coll. ont synthétisé des nanoparticules de PLGA par cette méthode en incorporant un BODIPY commercial (BODIPY® 493/503, Invitrogen) [171]. Les NPs mesurent 120 nm de diamètre (σ = 0,087) et contiennent 0,25 % en masse de BODIPY. Ces nanoparticules peuvent être fonctionnalisées en surface par la protéine HSA (albumine de sérum humain) à l'aide d'un couplage peptidique entre les acides carboxyliques de surface des NPs et les fonctions amines de la protéine. Les fonctions acides n'ayant pas réagi sont passivées par la glycine. Le greffage de la HSA est caractérisé par mesures de diffusion dynamique de la lumière et potentiel ζ. Mais ces caractérisations ne permettent pas de conclure à un greffage covalent ou à une simple adsorption. Enfin, les NPs sont incubées en présence de cellules eucaryotes. À 37°C, environ 30% du BODIPY est relargué des NPs en 72h.

De la même manière, des NPs de PLGA fluorescentes ont été synthétisées en ayant au préalable marqué le polymère avec une sonde à fonction amine émettant dans le proche infra-rouge [172]. Sur les cellules, les NPs fluorescentes ne sont pas plus toxiques que les non fluorescentes. Elles ont également été testées sur des souris et elles sont principalement localisées dans le foie, contrairement aux fluorophores libres. Les auteurs concluent que ces NPs pourraient être utilisées pour faire du marquage des cellules du foie.

Raymo, Callan et coll. ont eux aussi encapsulé des chromophores dans des micelles polymères et les ont étudiés pour l'imagerie intra-cellulaire [173]. Pour cela, ils ont copolymérisé un macromonomère de PEO_{2k} à fonction méthacrylate avec du méthacrylate de décyle afin d'obtenir un copolymère statistique amphiphile. Le copolymère est ensuite assemblé sous forme de micelles (méthode évaporation de solvents) en présence de krypto-BODIPY avec un groupement acide benzoïque ou *N*-décyl benzamide en position méso et en présence d'un photochrome. Les fluorophores les mieux encapsulés sont les plus hydrophobes (groupement *N*-décyl benzamide pour le BODIPY). Le rendement quantique de fluorescence est quasiment divisé par 2 au cœur des micelles comparativement au BODIPY en solution diluée, ce qui est attribué à la forte proximité des fluorophores. En excitant les micelles avec de la lumière visible ou UV, il est possible de moduler le transfert d'énergie entre le BODIPY et le photochrome. Enfin, des cellules ovariennes de hamster chinois ont été incubées en présence des micelles fluorescentes pendant 24h. Les micelles passent à travers la membrane cellulaire, *a priori* par endocytose et ne semblent pas toxiques pour les cellules.

Larpent et coll. ont utilisé la **méthode de gonflement** pour obtenir des latex fluorescents. Il s'agit de synthétiser des latex de polymère à cœur réticulé (généralement PS

réticulé DVB - divinylbenzène), stabilisés par des tensioactifs, par une méthode en microémulsion [174]. Les objets obtenus par cette méthode ont un diamètre compris 10 et 20 nm. En parallèle, les fluorophores sont dispersés dans un bon solvant du PS (DCM, THF, ...). Cette solution organique est ajoutée en très petites quantités (de l'ordre de 100 μL) à la dispersion de NPs dans l'eau. Le solvant organique contenant le fluorophore va alors migrer au cœur des NPs, les faisant gonfler et les rendant fluorescentes. Les NPFs sont ensuite purifiées par dialyse afin d'éliminer les fluorophores non incorporés aux latex. Les nanoparticules obtenues peuvent présenter en leur surface des fonctions chlorure si le styrène a été copolymérisé avec du *p*-chlorométhylstyrène [175]. Par la suite, la fonctionnalité de surface peut être modifiée en fonctions amine ou azoture pour pouvoir respectivement greffer des fluorophores à fonction thiocyanate par couplage thiourée [176] ou à fonction alcyne par chimie click [177]. Larpent et coll. ont notamment synthétisé des nanosenseurs à Cu^{II} fluorescents à base de BODIPY (Figure 1.17) [178, 179]. Pour cela, du styrène et du divinylbenzène ont été copolymérisés en présence de vinylbenzylcyclame par une méthode de microémulsion. Ensuite, le BODIPY est incorporé à la matrice polymère par cette méthode de gonflement. Les nanoparticules ainsi obtenues mesurent 16 nm de diamètre et contiennent environ 75 BODIPY/particule. Le complexe Cu^{II}-cyclame absorbe vers 535-550 nm, c'est à dire dans la bande d'émission de fluorescence du BODIPY : en présence de cuivre, l'émission de fluorescence du BODIPY est inhibée par transfert d'énergie de type FRET du cœur fluorescent vers les complexes Cu^{II}-cyclame en surface et les sondes fluorescentes sont donc éteintes.

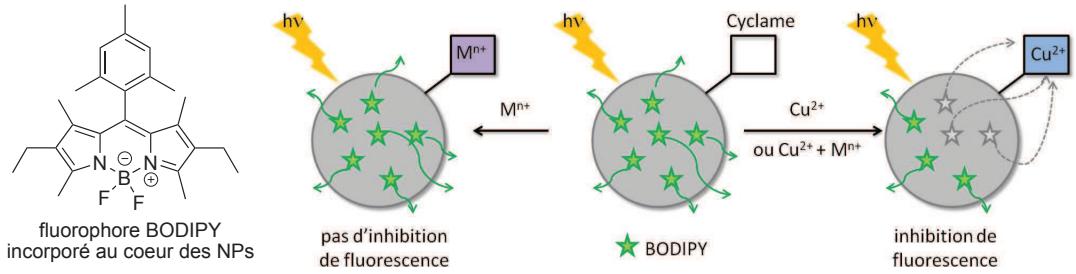


Figure 1.17 – Principe des senseurs de Cu^{II} développés par Larpent et coll. (adapté de [178]).

Par la même méthode, des BODIPY encombrés émettant vers le proche infra-rouge ont été incorporés à des latex de polystyrène de 300 à 1200 nm de diamètre [180]. Des nanoparticules fluorescentes à cœur PS chargées en "Nile Red" [181], ou en Pt^{II}octaéthylporphyrine et 9,10-diphényl- anthracène [182], ou cœur PS et couronne PEO, sensibles au dioxygène ont été préparées et étudiées sur des macrophages [183].

Enfin, il est possible d'encapsuler un fluorophore en le mélangeant à des monomères hydrophobes lors de processus de polymérisation en **émulsion ou en miniémulsion** (§1.4.3 pour plus de détails sur ces techniques). Il ne sera possible d'encapsuler que des fluorophores présentant une certaine solubilité à l'eau, telle la fluorescéine, par une technique d'émulsion car le fluorophore doit pouvoir migrer à travers la phase aqueuse. Wu et

coll. ont reporté la synthèse de NPs à cœur PS dans laquelle de la fluorescéine avait été encapsulée [184]. La surface des particules présentant des fonctions amines et acides, les auteurs ont pu greffer une autre sonde fluorescente comme la rhodamine. L'inconvénient principal de ces NPs est leur grand diamètre (3 μm).

La méthode de polymérisation en miniémulsion permet l'obtention de NPs généralement plus petites mais surtout ne nécessite pas de migration du fluorophore à travers la phase aqueuse. Landfester et coll. ont ainsi encapsulé des fluorophores de type pérylène dans des NPs de PS de 100 nm de diamètre environ [185, 186]. Les NPs sont chargées soit positivement (amines), soit négativement (acides carboxyliques) en surface. Les NPs ont été incorporées avec succès dans des cellules cancéreuse de type HeLa. Il ressort des observations que les NPs les plus chargées pénètrent le mieux et que les mécanismes d'endocytose ne sont pas les mêmes pour les deux types de particules.

Du BODIPY [187], du pyrène [188, 189] et de nombreux autres fluorophores [190] ou des lanthanides [191] ont ainsi été encapsulés dans des matrices de PS.

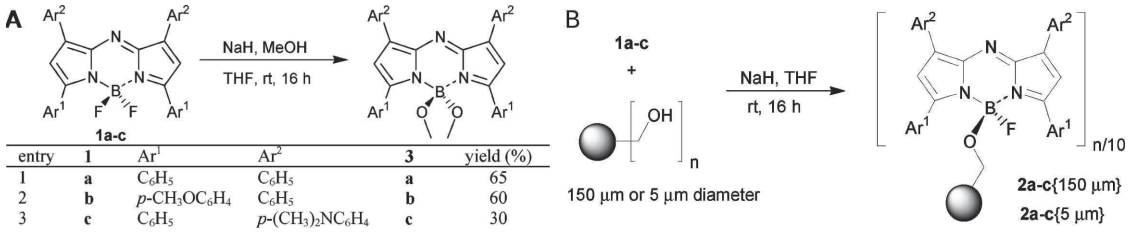
Le principal inconvénient des méthodes de gonflement et de co-encapsulation est que les fluorophores au cœur des nanoparticules ne sont pas liés de manière covalente à la particule, induisant un éventuel relargage du fluorophore au cours du temps. De plus, ces nanoparticules sont dans la plupart des cas stabilisées par des tensioactifs, molécules labiles et potentiellement toxiques.

Afin d'éviter ce problème de relargage, O'Shea et coll. ont greffé des Aza-BODIPY sur des latex de PS commerciaux (5-150 μm) présentant des fonctions alcool principalement en surface [192]. Le lien covalent est réalisé en substituant le fluor du BODIPY par l'oxygène des fonctions alcool des latex de PS en milieu basique (Schème 1.4). Environ 10% des fonctions alcool sont ainsi substituées par des Aza-BODIPY. Les particules peuvent émettre de 680 à 736 nm selon la nature de l'Aza-BODIPY greffé. L'inconvénient de ces objets réside dans leur taille micrométrique qui ne leur permet pas de pénétrer dans les cellules. Des travaux sont en cours afin de réaliser la même étude sur des particules de taille nanométrique. Des latex similaires ont été transformés en senseur pH. Cela est rendu possible en greffant un Aza-BODIPY pouvant s'allumer ou s'éteindre selon le pH (phénomènes de TEP) [193].

Le même type de nanosenseurs de pH a été synthétisé en greffant différentes molécules de la familles des xanthènes sur des latex PS de 80 nm de diamètre à fonction de surface amine [194].

- **NPs à base de polymères conducteurs**

Les **NPs à base de polymères conducteurs** constituent également un autre type de matériau fluorescent polymère [195, 196]. Des NPFs peuvent être préparées selon les méthodes évoquées précédemment [195] en encapsulant le polymère conducteur dans une



entry	1	Ar^1	Ar^2	3	yield (%)
1	a	C_6H_5	C_6H_5	a	65
2	b	*p*-$CH_3OC_6H_4$	C_6H_5	b	60
3	c	C_6H_5	*p*-$(CH_3)_2NC_6H_4$	c	30

Schème 1.4 – A. Synthèse des dérivés Aza-BODIPY $B(OMe)_2$. B. Fonctionnalisation des particules de PS par les Aza-BODIPY [192]. *Utilisé avec permission depuis Aniello Palma et coll., New On-Bead Near-Infrared Fluorophores and Fluorescent Sensor Constructs, Organic Letters, 11, 3638-3641, 2009. Droits d'auteur 2009 American Chemical Society.*

matrice de polymères amphiphiles (type PAA-*b*-PS [197, 198]). Les polymères conducteurs peuvent également être eux-mêmes amphiphiles et s'auto-assembler sous forme de micelles [199]. Mecking et coll. ont reporté la synthèse de NPs à base de polymères conducteurs par une méthode de miniémulsion [200]. Les objets mesurent entre 20 et 40 nm de diamètre. Les longueurs d'onde d'émission de fluorescente varient de 496 à 634 nm mais les rendements quantiques des NPFs dans l'eau sont relativement faibles (4 à 11 %). L'inconvénient de ces objets est qu'ils nécessitent une étape de purification par dialyse afin d'éliminer le catalyseur de polymérisation et les tensioactifs.

Dans le cas où les polymères conducteurs sont encapsulés, le relargage du polymère est quasi inexistant comparativement au cas des fluorophores organiques, à cause de leur forte masse molaire. Ils ont été étudiés pour l'imagerie en milieu biologique [199] mais leur principal inconvénient est qu'ils sont moins brillants que les particules polymères dopées par des fluorophores, bien que des études récentes aient permis de créer des NPs de polymère conducteur 15 fois plus brillantes que leurs analogues QDs [201]. De plus, les polymères conducteurs ne sont pas accessibles par polymérisation radicalaire, un type de polymérisation simple à mettre en œuvre et qui permet de générer des NPFs *in situ*.

• Toxicité des NPs polymères

De nombreuses études ont été faites concernant, d'une part, la toxicité des NPs polymères pour les cellules de mammifère et, d'autre part, la furtivité de ces objets une fois introduits dans le circuit sanguin. Les mécanismes d'internalisation par les cellules par endocytose de NPs ou des micelles polymères ne sont pas encore bien maîtrisés [202]. On sait cependant que des objets d'un diamètre inférieur à 150 nm sont facilement ingérés. Une modification de la couronne hydrophile par des molécules spécifiques des charges de surface peuvent aider à l'endocytose [71]. D'un point de vue furtivité, le polymère le plus répandu pour fonctionnaliser la surface des NPs polymères reste le PEO [73]. Si la biodistribution des NPs veut être contrôlée, d'autres (macro-) molécules devront être introduites en surface [203]. À ces fins, il faut donc réaliser la synthèse de NPs multifonctionnelles [80].

Les méthodes évoquées dans ce paragraphe pour la synthèse de NPs polymères ne permettent pas d'obtenir en une étape des NPs fluorescentes auto-stabilisées où le fluorophore est lié de manière covalente aux NPs. De plus, la plupart de ces méthodes requièrent l'utilisation de tensioactifs pour la stabilité colloïdale des NPFs et les dispersions obtenues sont la plupart du temps très diluées.

La section suivante a pour but de présenter la méthode de polymérisation en miniémulsion couplée à une méthode de polymérisation radicalaire contrôlée. En utilisant ces techniques avec un monomère fluorescent, il est alors possible d'obtenir des NPs fluorescentes en une étape, présentant différents blocs polymères fonctionnels. De telles méthodes permettent de travailler à des taux de solide intéressant (10-20 wt %). De plus, l'utilisation de polymères réactifs fonctionnels permet de s'affranchir des tensioactifs.

1.4 Élaboration de nanoparticules polymères à architecture contrôlée. *Synthèse in situ de nanoparticules fluorescentes auto-stabilisées*

1.4.1 Polymérisation radicalaire contrôlée

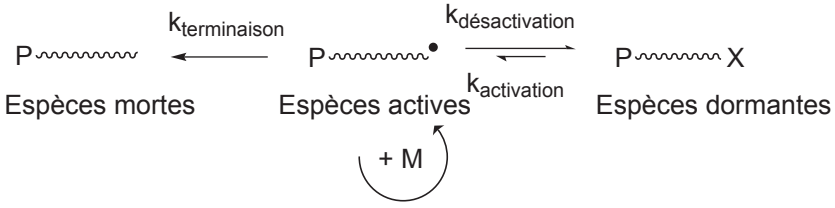
De toutes les techniques de polymérisation, la polymérisation radicalaire est l'une des plus utilisées dans la production mondiale de polymère. En effet, celle-ci concerne un large choix de monomères et n'est pas limitée en choix de procédé, de température et est compatible avec l'eau. Les synthèses peuvent ainsi être menées en milieu homogène (masse ou solution) ou en milieu hétérogène (émulsion, miniémulsion, suspension, précipitation, dispersion...). Mais la polymérisation radicalaire conventionnelle présente un inconvénient majeur : elle ne permet pas d'obtenir un contrôle de la structure macromoléculaire.

Il y a un demi siècle, Michel Szwarc fut le premier à introduire le concept de polymérisation vivante [204]. Il le définit comme étant un processus de croissance de chaînes "infini", sans réactions de terminaison et de transfert. La croissance continue, dit-il, tant qu'il y a des monomères à consommer. Il prévoit que ce processus peut être très utile dans la synthèse de copolymères à blocs par ajouts successifs des différents monomères. Cependant, il n'existe pas de polymérisation vivante idéale par voie radicalaire étant donné que la terminaison bimoléculaire entre radicaux et les réactions de transfert sont inévitables. Ces réactions secondaires indésirables devront être limitées afin d'obtenir des macromolécules à architecture contrôlée. Cela peut être réalisé en limitant le nombre de chaînes actives en même temps [205].

Ainsi, en 1982, Otsu a proposé un mécanisme de polymérisation basé sur l'utilisation d'iniferters (disulfure de tétraéthylthiurame), molécules capables d'amorcer (*ini*tiateur), de donner lieu à des réactions de transfert (trans*fer*t) et de terminaisons (*ter*minaison) [206]. Ces travaux marquent le début de la Polymérisation Radicalaire Contrôlée (PRC)

[207] qui a vu le jour dans les années 90 avec des techniques comme les polymérisations radicalaires contrôlées par terminaison réversible par les nitroxides (NMP) [208] et par transfert d'atomes (ATRP) [209, 210, 211] ou par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) [212]. Ces méthodes de polymérisation radicalaire permettent de fonctionnaliser les chaînes afin d'introduire un fluorophore ou une molécule d'intérêt biologique en bout ou le long de la chaîne [213, 104].

Le point commun, astucieux, de toutes ces techniques est de créer toutes les chaînes dans un laps de temps très court en début de polymérisation puis de les faire croître simultanément. Cela est rendu possible grâce à un équilibre entre espèces actives propageantes et espèces dormantes (Schème 1.5). Le temps de vie des chaînes en croissance est alors prolongé malgré leur grande réactivité [210]. Il est ainsi possible d'obtenir des chaînes au degré de contrôle proche de celui obtenu en polymérisation anionique, tout en gardant la grande flexibilité de mise en œuvre offerte par la polymérisation radicalaire.



Schème 1.5 – Principe général de la polymérisation radicalaire contrôlée.

Les critères d'une polymérisation contrôlée sont :

- une évolution linéaire du degré de polymérisation moyen en nombre (DP_n) et des masses molaires moyennes en nombre (M_n) avec la conversion en monomère (χ). Un écart à l'idéalité est constaté lorsque l'amorçage est lent ou lorsque des réactions de transfert ou de terminaisons irréversibles ont lieu (Figure 1.18) ;

$$M_n = DP_n \times M_{monomère} \times \chi + M_{extrémités} \tag{1.9}$$

$$DP_n = \frac{[\text{monomère(s)}]_0}{[\text{agent de contrôle}]_0} \times \chi \tag{1.10}$$

- une évolution linéaire des rapports logarithmiques de la concentration initiale en monomère ($[M]_0$) sur la concentration en monomère à l'instant t ($[M]_t$) avec le temps ;
- des indices de polymolécularité (I_P) qui décroissant avec la conversion et inférieurs à 1,5 ;
- un réamorçage possible à chaque moment de la polymérisation en ajoutant du monomère.

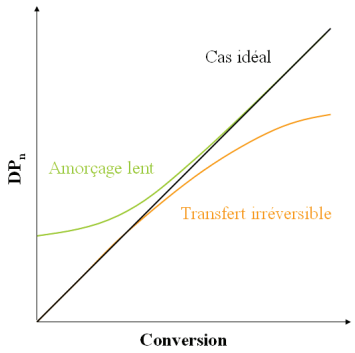


FIGURE 1.18 – Comportement théorique du DP_n (degré de polymérisation en nombre) en fonction de la conversion.

1.4.2 Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT)

La polymérisation RAFT, proposée en 1998 par Rizzardo et Moad [212], est basée sur un processus d'échange réversible assuré par des espèces soufrées appelées agents RAFT. Cette technique inclue la méthode MADIX (MAcromolecular Design via the Interchange of Xanthates) qui elle se limite aux dérivés dithiocarbonates (appelés xanthates) [214]. La structure générale des agents RAFT est donnée FIGURE 1.19. La nature des groupements partants (R) et activants (Z) est primordiale dans le choix d'un agent RAFT, comme cela sera évoqué plus en détail. Dans le cas où les agents RAFT ne sont pas moléculaires mais macromoléculaires, ils sont appelés macro-agents RAFT.

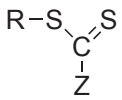
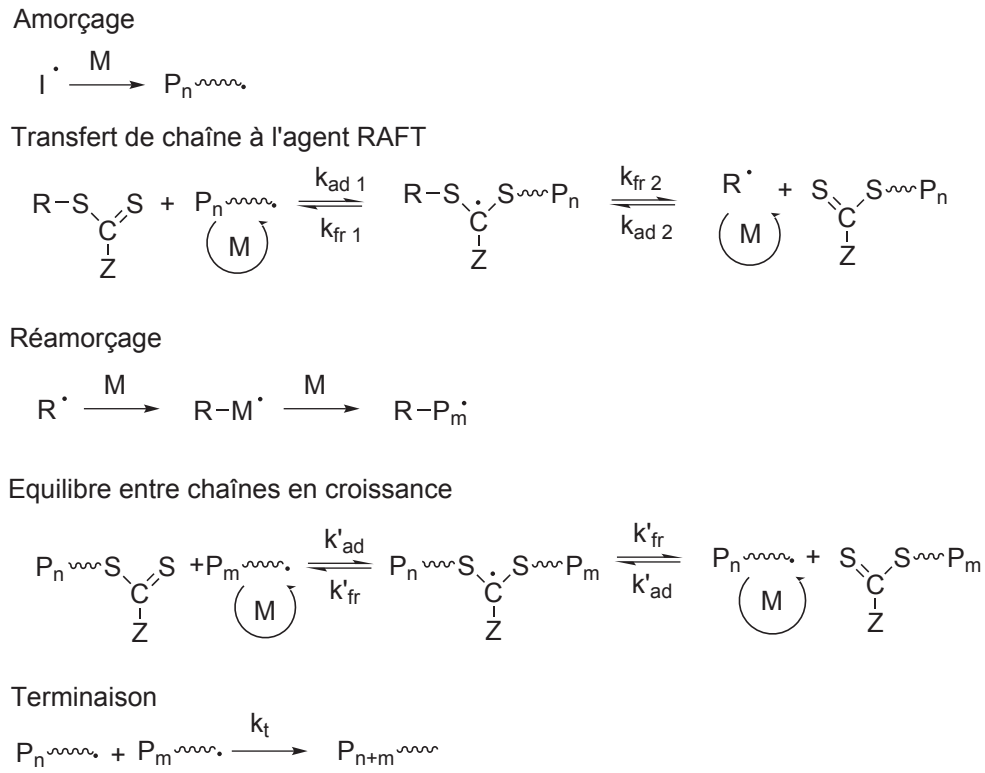


FIGURE 1.19 – Structure générale des agents RAFT.

D'un point de vue pratique, les modes opératoires des synthèses sont similaires à ceux d'une polymérisation radicalaire classique, l'agent RAFT étant ajouté au milieu réactionnel avant le début de la polymérisation. Par comparaison, la méthode NMP nécessite des conditions de synthèse plus lourdes que la RAFT, à savoir des températures et/ou des pressions assez hautes, éventuellement destructrices pour le fluorophore utilisé. La méthode par transfert d'atomes ATRP utilise des métaux tels que le cuivre, généralement colorés dans le visible, ce qui peut être gênant pour les propriétés spectroscopiques recherchées. C'est pourquoi, de toutes les techniques classiques de polymérisation radicalaire contrôlée, la polymérisation RAFT paraît la plus intéressante pour la réalisation de nanoparticules fluorescentes.

Principe du contrôle de la polymérisation en RAFT

Le contrôle de la polymérisation par la méthode RAFT est assuré par un équilibre d'addition-fragmentation réversible entre espèces actives (radicaux) et dormantes (chaînes portant le groupement RAFT) (Schème 1.6) [215].



Schème 1.6 – Mécanisme de la polymérisation RAFT.

Après une étape classique d'amorçage par un amorceur radicalaire ($I^{\bullet}$), les chaînes en croissance ($P_n^{\bullet}$) réagissent rapidement sur les agents de transfert par addition sur la double liaison C=S avec la constante $k_{ad\ 1}$. Le radical intermédiaire ainsi formé se fragmente alors en deux espèces ($k_{fr\ 2}$) : un nouveau radical ($R^{\bullet}$) et une espèce dormante. $R^{\bullet}$ peut réamorcer une polymérisation pour former une nouvelle chaîne de polymère ou s'additionner de nouveau sur l'agent RAFT ($k_{ad\ 2}$) pour former un macro-agent RAFT. Une fois tout l'agent RAFT consommé, l'équilibre d'additions-fragmentations réversibles successives prend place : il y a formation de chaînes macromoléculaires à architecture contrôlée. Les réactions de transfert entre espèces actives et dormantes doivent être rapides devant la propagation des chaînes de façon à avoir une évolution linéaire des masses molaires avec la conversion et une distribution étroite des masses molaires.

À l'issue de la polymérisation, la majorité des chaînes seront d'une longueur fixée par le rapport initial $[M]_0/[RAFT]_0$ et la conversion en monomère (DP_n, équation 1.10) et porteront à une extrémité le groupement R et à l'autre le groupement thiocarbonylthio.

Comme dans toute polymérisation radicalaire, il pourra y avoir des réactions de terminaison (k_t), mais la proportion de chaînes mortes par rapport aux chaînes vivantes sera

plus faible dans le cas d'une polymérisation RAFT que dans le cas d'une polymérisation radicalaire classique.

Pour que le contrôle soit assuré, il faut également que la concentration en agent RAFT soit largement supérieure à celle en amorceur (typiquement supérieure à 5).

D'un point de vue cinétique, la polymérisation RAFT suit théoriquement la même cinétique que des polymérisations radicalaires classiques. Néanmoins, il est courant d'observer des effets de retard à la polymérisation. Bien que ces effets ne soient pas totalement compris, deux hypothèses sont proposées, toutes deux mettant en cause le radical intermédiaire formé [216] :

- le radical intermédiaire réagit sur de courtes chaînes de polymères en croissance.
- la fragmentation du radical intermédiaire est lente devant les autres fragmentations, cela pouvant être dû à la présence d'un groupement Z trop stabilisateur ou d'un mauvais groupement partant R.

Choix de l'agent RAFT

L'équilibre entre espèces actives et dormantes est déterminé par le couple agent RAFT-monomère (Figure 1.20) [217, 218]. Ainsi, le succès d'une polymérisation RAFT va résider dans le choix d'un agent RAFT approprié. En fonction des groupements R ou Z, ceux-ci sont classés en différentes familles (Figure 1.20) :

- **le groupement Z**, appelé "groupement activateur" ou "stabilisant", va avoir un effet sur la stabilité du radical intermédiaire thiocarbonylthio. Des groupements électroattracteurs (ex : benzyle) vont favoriser l'addition des radicaux sur la double liaison C=S. Néanmoins la stabilité de cet intermédiaire doit être ajustée pour que la fragmentation du groupement R puisse avoir lieu et que la polymérisation soit réamorcée [220]. Dans le cas où Z est un atome de soufre, il s'agit d'agents RAFT trithiocarbonates (TTC) [221]. Le soufre permet de suffisamment activer la liaison C=S pour avoir des équilibres d'addition-fragmentation rapides, tout en minimisant les effets de retard à la polymérisation. Ces agents de contrôle sont de couleur jaune, alors que les agents dithiobenzoates sont roses.
- **le groupement R** doit être un bon groupe partant comparé aux chaînes polymères en croissance. Il doit également pouvoir facilement réamorcer une polymérisation. Pour choisir un bon groupement R, des paramètres comme l'encombrement stérique, la stabilité du radical, et sa polarité doivent être considérés. Avec des groupements cumyle ou cyanoisopropyle, de bons résultats sont obtenus pour les polymérisations du styrène, des acrylates et même pour des méthacrylates [222]. Des substituants porteurs d'un lien acide carboxylique (R = $C(CH_3)_2COOH$) sont largement employés car ils permettent de fonctionnaliser les agents RAFT.

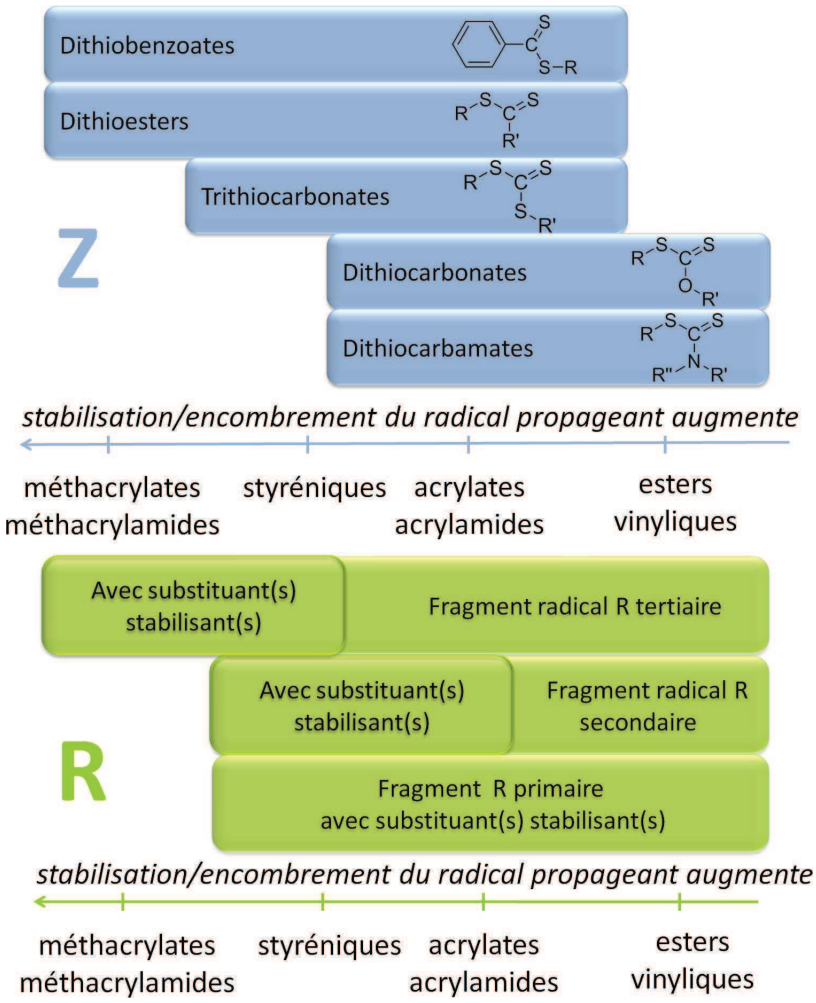


FIGURE 1.20 – Résumé des différents types d'agents RAFT adaptés aux grandes familles de monomères (issu de [219], adapté de [218]).

Synthèse de copolymères

La polymérisation RAFT est une polymérisation "pseudo-vivante" et permet la synthèse de copolymères statistiques, alternés ou à blocs [223] ou à architectures/nature de monomères encore plus variées [224]. Néanmoins, quelques précautions doivent être prises.

Pour des copolymères synthétisés à partir d'un milieu réactionnel contenant les deux monomères, l'agent RAFT doit permettre le contrôle d'au moins l'un des deux monomères présent en quantité suffisante [225]. La répartition des monomères dans la chaîne polymère sera liée à leurs rapports de réactivité, sachant que ceux-ci sont considérés être les mêmes que dans une polymérisation radicalaire classique. Différents types de copolymères (alternés, statistiques, à gradient...) peuvent ainsi être obtenus.

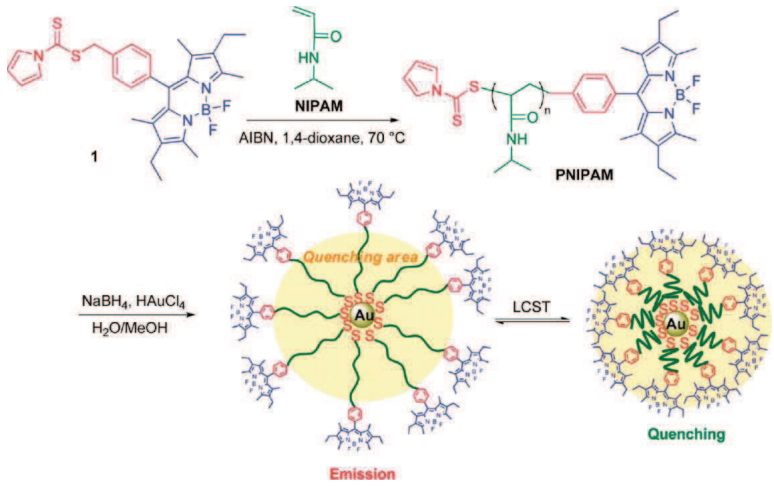
Dans le cas de copolymères à blocs obtenus *via* une extension de chaînes porteuses de la fonction RAFT (synthétisées dans une première étape), l'ordre dans lequel les blocs vont être synthétisés va être déterminant [226]. L'agent RAFT doit bien évidemment contrôler la polymérisation du premier bloc ; mais pour le second bloc, le groupement R partant sera alors la chaîne de polymère du premier bloc. Si le second monomère forme un radical plus stable que le macro-radical du premier bloc, la formation d'un copolymère à blocs ne se fera pas avec succès. C'est pourquoi il est recommandé de débuter la synthèse de copolymères à blocs par la formation de macro-agents RAFT de type méthacrylate et de poursuivre l'extension de chaînes avec des monomères styréniques puis acrylates.

Exemples de copolymères fluorescents synthétisés par RAFT

Chujo et coll. ont polymérisé deux types de monomères BODIPY à fonction méthacrylate en milieu homogène dans l'anisole par une méthode RAFT (agent RAFT : dithiobenzoate de cumyle) [227]. Ils ont ainsi obtenu des macro-agents de transfert fluorescents possédant en moyenne 20 fluorophores par chaîne. Ces derniers ont alors été utilisés pour réamorcer une polymérisation du styrène afin d'obtenir des copolymères à bloc P(BODIPY)-*b*-PS ayant environ 5 mol % de BODIPY par chaîne. Les copolymères sont ensuite solubilisés dans du THF puis séchés sur des lamelles de verre. Des NPs fluorescentes d'assez grande taille ($D \approx 250 - 300$ nm) sont obtenues. Ces objets, bien que présentant des caractéristiques spectroscopiques similaires aux BODIPY de départ sont polydipserses et indispersables dans l'eau.

Cette même équipe a ensuite synthétisé un agent de transfert de type RAFT à fonction BODIPY situé sur le groupement R (Schème 1.7) [134]. L'agent de transfert permet l'obtention de chaînes PNIPAM à architecture contrôlée et rendues fluorescentes par le BODIPY situé à leur extrémité. Les chaînes polymères sont ensuite fixées à des particules d'or par réduction de la fonction RAFT en thiol puis par création d'une liaison dative entre l'Au et les doublets non liants du soufre. Les particules d'or fluorescentes ainsi obtenues ont l'avantage d'être de petite taille ($D \approx 10$ nm) mais elles ne possèdent qu'environ 5 chaînes polymères par particule et donc seulement 5 fluorophores par particule. Une extinction

de fluorescence est observée pour des températures supérieures à la LCST du polymère car alors le BODIPY est suffisamment proche de l'or pour qu'il puisse y avoir transfert d'énergie non radiatif. Ce phénomène est réversible en faisant varier la température autour de la LCST et est d'autant plus marqué que la longueur de la chaîne PNIPAM est élevée.



Schème 1.7 – Particules thermosensibles or/BODIPY développées par Chujo et coll. [134]. *Utilisé avec permission depuis Atsushi Nagai et coll., BODIPY-Based Chain Transfer Agent : Reversibly Thermoswitchable Luminescent Gold Nanoparticle Stabilized by BODIPY-Terminated Water-Soluble Polymer, Langmuir, 26, 15644-15649, 2010. Droits d'auteur 2010 American Chemical Society.*

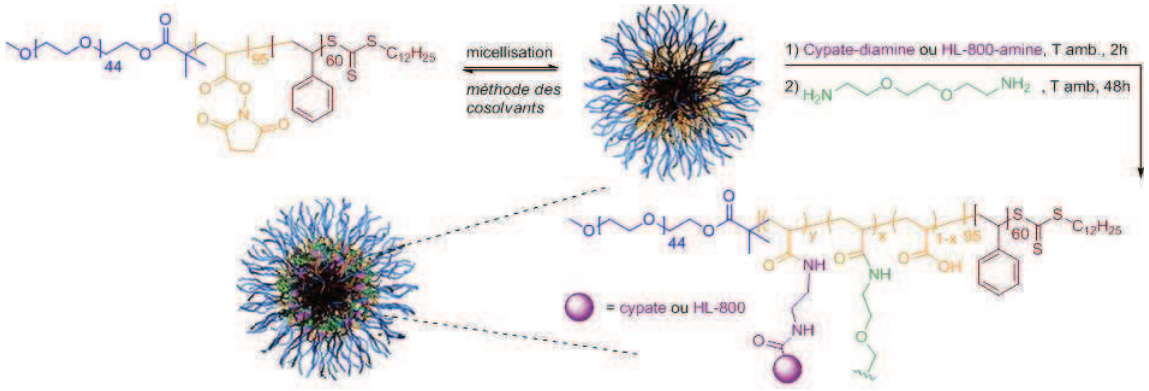
Winnik et coll. ont utilisé la même stratégie pour marquer un agent de transfert de type dithiobenzoate avec un naphtalimide. Cet agent RAFT fluorescent est ensuite utilisé pour former un copolymère de *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide et de *N*-méthacryloxy-succinimide [228].

Liu et coll. ont quant à eux synthétisé des copolymères amphiphiles P($S_{99,1\%}$-*co*-$NBDAE_{0,1\%}$-*co*-$SPMA_{0,8\%}$)$_{20}$-*b*-P($NIPAM_{99,7\%}$-*co*-$RhBAM_{0,3\%}$)$_{60}$ thermosensibles (PNIPAM), pH sensibles (RhBAM), photochromes (SPMA, forme spyropyrane du 10-(2-méthacryloxyéthyl)-30,30-diméthyl-6-nitro-spiro(2H-1-benzo-pyrane-2,20-indoline)) et ayant une sonde fluorescente fixe interne (NBDAE, 4-(2-acryloyloxyéthylamino)-7-2-nitro-2,1,3-benzoxa-diazole) [229]. Dans l'eau, les copolymères amphiphiles s'auto-assemblent spontanément sous forme d'agrégats micellaires sphériques de 50 nm de diamètre. L'émission de fluorescence des NPs dépend du pH et de la température (même principe que dans [166], Figure 1.16). De plus, en milieu basique, la RhBAM n'est pas fluorescente et en excitant les objets dans l'UV, le photochrome MCMA devient fluorescent et un transfert d'énergie vers le NBDAE devient possible. Cela permet d'avoir des nanosenseurs ayant quatre couleurs d'émission de fluorescence dépendant de la température et du pH.

Wooley et coll. travaillent sur des NPs cœur/couronne assemblées par la méthode par déplacement de solvants, à cœur ou à couronne post-réticulés [156, 230]. Les copolymères triblocs amphiphiles consituant les micelles sont synthétisés par deux polymérisation

RAFT successives en milieu homogène afin d'obtenir du PEO_{44}-*b*-$PNAS_{45}$-*b*-PS_{60}-TTC-C_{12} (PNAS : poly(*N*-acryloxysuccinimide)) (Ip = 1,2). Les groupements succinimides sont des esters activés qui permettent de post-greffer des molécules portant une amine *via* un couplage peptidique. La couronne des micelles est ainsi réticulée en faisant réagir les NPs avec un PEO diamine de faible masse molaire. Différentes sondes fluorescentes ont également pu être greffées sur la couronne des NPs, comme la cypate diamine ou l'HL-800 diamine (molécules de la famille des cyanines) (Schème 1.8) [231]. Pour le premier fluorophore, en moyenne 40 molécules sont insérées par particule (D_h = 59 nm), avec un Φ_F = 0,005 (B = 40 × 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$). Pour l'HL-800 diamine, en moyenne 20 fluorophores sont greffés par NP (D_h = 56 nm), avec un Φ_F = 0,036 (B = 144 × 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$). Le même type d'objet est obtenu en micellisant des copolymères à blocs PEO_{44}-*b*-$PVBA_{18}$-TTC-C_{12} (a) ou PEO_{113}-*b*-$PVBA_{46}$-TTC-C_{12} (b) (PVBA : poly(4-vinylbenzaldéhyde)). Les micelles sont ensuite fonctionnalisées avec une fluorescéine (F) à fonction amine et réticulées avec un PEO diamine court. Ces micelles réticulées fluorescentes mesurent environ 21-24 nm. Dans le cas du copolymère (a), les auteurs introduisent entre 15 (B = 104 × 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$) et 150 (B = 59 × 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$) fluorescéines par particule. Mais augmenter le nombre de F par particule ne permet pas d'augmenter la brillance des particules à cause de l'importante inhibition de fluorescence entre F. Afin d'éloigner les F, celles-ci ont été greffées sur les micelles à plus gros cœur (b). Le rendement quantique de fluorescence est alors largement augmenté (de 0,088 à 0,233 pour 15 F par particule) et la brillance a été augmentée jusqu'à 510 × 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$ (30 F par particule).

Ces types d'objets ont été transformés en senseurs pH ratiométriques avec une forme multicompartimentaire [232] ou en tube [233]. De même, d'autres NPs ont été fonctionnalisées par un plasmide ou des oligonucléotides et leur toxicité sur des cellules HeLa et CHO a été étudiée [234, 235].



Schème 1.8 – Nanoparticules fluorescentes à couronne hydrophile réticulée développées par Wooley et coll. (adapté de [231]).

La polymérisation radicalaire contrôlée RAFT permet donc l'obtention de polymères fluorescents à architecture contrôlée. L'utilisation de fluorophore possédant une fonction polymérisable permet de les lier de manière convalente à la chaîne polymère durant l'étape

de polymérisation. Néanmoins, ces polymères créés nécessitent une étape d'assemblage afin d'obtenir des NPFs. Une technique pour s'affranchir de cela est de former des NPFs par des méthodes de polymérisation en milieux aqueux dispersés comme la miniémulsion. En couplant ces procédés à la méthode RAFT, des NPFs à architecture macromoléculaire contrôlée sont obtenues *in situ* durant la polymérisation.

1.4.3 Synthèse de latex en milieux aqueux dispersés

Les polymérisations radicalaires peuvent être réalisées par différents procédés. Le plus simple est le procédé en masse, où les monomères liquides une fois polymérisés donnent un polymère solide ou un liquide très visqueux, souvent difficile à manipuler. En plus de cet inconvénient pratique, la forte viscosité du milieu réactionnel empêche d'éliminer la chaleur produite lors de la réaction de polymérisation la plupart du temps exothermique. Afin de diminuer la viscosité du milieu, il est alors possible d'utiliser des solvants organiques (ou éventuellement de l'eau selon les solubilités des monomères/polymères utilisés) dans l'objectif de diluer les monomères et polymères formés. Néanmoins, la dilution des monomères peut entraîner des diminutions de vitesses de polymérisation et n'est pas nécessairement intéressante d'un point de vue industriel.

Pour pallier ces problèmes, les chimistes ont développé les techniques de polymérisation en milieux hétérogènes aqueux qui permettent l'obtention de nanoparticules de polymères dispersées dans l'eau [236]. Elles se différencient principalement par leur état initial (solubilité du(es) monomère(s) et de l'amorceur, type et concentration en tensioactifs), mécanisme et taille des particules obtenues. Leur point commun est la formation de particules de polymères hydrophobes stabilisées par des (macro)molécules tensioactives dans l'eau. Le système étant dispersé, sa viscosité sera faible, et cela facilitera la mise en œuvre du produit final. L'eau permet également de dissiper la chaleur, diminuant ainsi les risques d'emballement thermique. Enfin, l'utilisation d'eau à la place de solvants organiques est plus respectueuse de l'environnement.

De façon industrielle, les latex sont principalement produits par des méthodes de polymérisation en émulsion [237]. L'état initial du système est constitué de deux phases : de grosses gouttes de monomère ($d > \mu m$), stabilisées par des tensioactifs, sont dispersées dans la phase continue (eau) contenant l'amorceur de polymérisation, des unités monomères en très faible nombre et des micelles de tensioactif. L'étape de nucléation a lieu dans la phase aqueuse après amorçage et le nombre de nanoparticules augmente rapidement jusqu'à disparition des micelles de tensioactifs. La croissance des particules est assurée par la **diffusion des monomères à travers la phase aqueuse**, les gouttes initiales jouant le rôle de réservoirs. Une fois tout le monomère consommé, une dispersion stable de particules de polymère stabilisées par des tensioactifs est obtenue. Typiquement les diamètres des NPs obtenues sont compris entre 50 et 500 nm.

Bien que cette méthode d'obtention de latex soit assez facile à mettre en œuvre, elle ne permet pas l'utilisation de monomères présents sous forme solide ou très hydrophobes, tels

que la plupart des fluorophores [238]. En effet, pour ce type de monomères la diffusion à travers la phase aqueuse est impossible. La polymérisation en miniémulsion permet quant à elle d'obtenir des dispersions stables de nanoparticules, sans nécessiter de diffusion du monomère à travers la phase aqueuse.

Polymérisation en miniémulsion

La première polymérisation du styrène en miniémulsion date de 1985 et a été réalisée par El-Aasser et coll. [239]. Le principe de cette technique est de former un système initial métastable de gouttes de monomère(s) stabilisées par des tensioactifs. Idéalement, les NPs obtenues seront une copie de ces gouttes.

La FIGURE 1.21 représente de façon simplifiée le principe de la polymérisation en miniémulsion. Le système initial est constitué de gouttes de monomères hydrophobes contenant un agent ultra-hydrophobe, un amorceur hydrosoluble ou organosoluble (cas représenté sur cette figure) et éventuellement un composé à encapsuler. Les gouttes sont stabilisées par des tensioactifs. Le mélange est alors soumis à un cisaillement sous forte énergie (typiquement des ultra-sons à l'échelle d'un laboratoire) et, si les composants sont bien choisis, une dispersion métastable de gouttes de monomère(s) homogènes en taille est obtenue. Que l'amorceur soit organo- ou hydro-soluble, la nucléation doit se faire préférentiellement dans les gouttes ; ensuite le monomère va polymériser au sein des gouttes jusqu'à sa consommation totale. La taille des particules finales obtenues est idéalement celle des gouttes de monomère dont elles sont issues, celles-ci allant typiquement de 50 à 500 nm [240, 241].

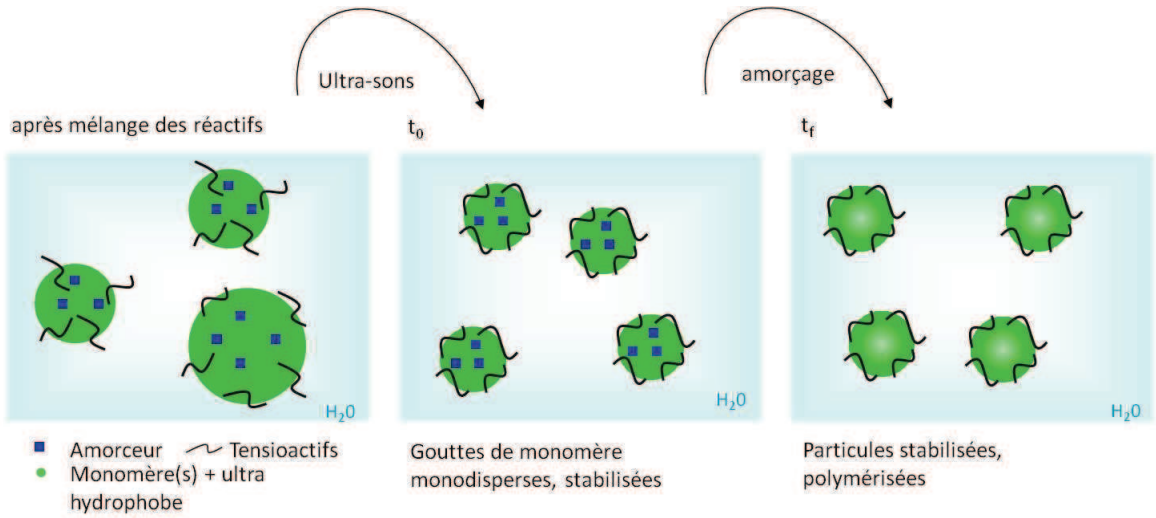


FIGURE 1.21 – Principe de la polymérisation en miniémulsion (adapté de [240]).

La bonne stabilité des gouttes de monomère initiales est primordiale pour l'obtention d'une dispersion de particules homogènes et nanométriques. En effet, comme toute émulsion, celle-ci va être perturbée par des phénomènes de coalescence et de diffusion comme

le mûrissement d'Ostwald [242]. Le choix des constituants de départ va donc être essentiel afin d'assurer la stabilité colloïdale du système.

Les miniémulsions sont des systèmes thermodynamiquement métastables, contrairement aux microémulsions qui sont des systèmes thermodynamiquement stables (où la totalité de la surface des gouttes de monomère(s) est couverte par des tensioactifs) [174].

Choix du tensioactif

Les phénomènes de coalescence (puis éventuellement de crémage) peuvent être évités par l'utilisation de tensioactifs. Ceux-ci vont avoir un double effet protecteur : par répulsion stérique et/ou électrostatique, ils vont pouvoir empêcher deux gouttes de coalescer ; par abaissement de la tension interfaciale entre les gouttes de monomère et la phase aqueuse, ils vont diminuer la pression de Laplace présente au sein de chaque goutte :

$$P_{Laplace} \propto \frac{\gamma}{d} \tag{1.11}$$

où :

$P_{Laplace}$	pression de Laplace
γ	tension interfaciale entre les phases aqueuses et organiques
d	diamètre des gouttes

Historiquement, le SDS (dodécylsulfate de sodium), tensioactif anionique, a été le premier à être utilisé en polymérisation en miniémulsion. Généralement, plus la concentration en tensioactifs est élevée, plus la tension interfaciale entre les phases organique et aqueuse est faible et plus les nanoparticules obtenues sont petites [243]. L'équipe de Landfester et coll. a comparé différentes natures de tensioactifs au SDS et étudié leur influence sur la taille de nanoparticules de polystyrène [244]. Dans le cas du bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), tensioactif cationique, les mêmes tailles de nanoparticules sont obtenues qu'avec le SDS à quantité de tensioactif comparable. Pour une concentration en tensioactif de 10 mM (C $\approx$ 1,5 wt % par rapport au styrène), le tensioactif couvre 30% de la surface des gouttes de monomère. Dans des conditions comparables et en utilisant un tensioactif non ionique polymère, dérivé du poly(oxyde d'éthylène) (Lutensol AT50®, BASF - 50 unités EO, chaîne alkyle), les particules obtenues sont environ deux fois plus grosses, bien que toujours monodisperses. L'utilisation de polymères amphiphiles comme tensioactifs sera détaillée par la suite.

Agents ultra-hydrophobes

Le phénomène de mûrissement d'Ostwald peut être diminué par l'ajout de molécules ultra-hydrophobes (UH) à la phase organique, modifiant ainsi le potentiel chimique des gouttes de monomère. Il s'établit alors une pression osmotique dans les gouttes qui va contrebalancer la pression de Laplace :

$$\Pi \propto \frac{RTc}{M} \tag{1.12}$$

où :

Π	pression osmotique
R	constante universelle des gaz parfaits
T	température
c	concentration en UH
M	masse molaire de l'UH

D'une manière schématique et simplifiée, considérons deux gouttes de monomères A et B de taille identique, contenant la même concentration c en agent ultra-hydrophobe. Si une partie du monomère de A migre vers B, A va devenir plus petite que B et par conséquent $P_{Laplace\ A} > P_{Laplace\ B}$. S'il n'y avait pas d'UH, A se viderait totalement dans B ; mais dans A, la concentration en UH a augmenté et donc la pression osmotique. Afin de diminuer la pression osmotique en A, une partie du monomère de B va alors devoir réintégrer A. Le système est alors revenu dans son état initial.

Beaucoup de molécules peuvent être utilisées comme agent ultra-hydrophobe, sachant que plus celui-ci sera insoluble dans l'eau, meilleure sera son efficacité [245]. Il faut bien sûr également que l'UH soit soluble au monomère. Le composé le plus couramment utilisé pour la polymérisation en miniémulsion du styrène est certainement l'hexadécane (HD), avec une solubilité dans l'eau de $7{,}0 \times 10^{-9}$ mol % (contre $5{,}2 \times 10^{-3}$ mol % pour le styrène) [246]. Bien que couramment utilisé, l'hexadécane a le désavantage de rester présent dans les particules finales obtenues, ce qui peut être problématique pour d'éventuelles applications en biologie.

C'est ainsi que Reimers et coll. ont les premiers pensé à employer des polymères comme UH [247] en utilisant du PMMA pour la polymérisation du MMA [248]. Pour ces auteurs, les polymères sont très efficaces comme stabilisants mais ils ne permettent la stabilisation des gouttes que d'une manière cinétique et non thermodynamique (contrairement à l'HD par exemple). En effet, leur forte masse molaire et leur faible concentration molaire ne permettent pas d'obtenir des pressions osmotiques aussi élevées que celles obtenues avec de petites molécules (équation 1.12). Néanmoins, ils stabilisent suffisamment les émulsions pour retarder les phénomènes de mûrissement d'Ostwald avant que la polymérisation ne démarre. El-Aasser et coll. ont utilisé le PS et l'hexadécane comme UH pour la polymérisation en miniémulsion du styrène [249, 250]. Les particules sont stabilisées par le SDS et amorcées en phase aqueuse par le KPS. Les auteurs ont utilisé trois polymères de masses molaires variant de 39 à 206 kg/mol. En utilisant le PS en plus de l'hexadécane, le nombre de particules obtenues est multiplié par 2, sachant que plus la masse molaire du PS est forte, plus le nombre de particules est faible pour un même pourcentage massique ajouté (accord avec Reimers). Par ailleurs, l'effet de la fonction terminale des PS (extrémité sulfonate ou H) ne semble pas avoir d'influence sur la cinétique de polymérisation et la taille des particules.

Enfin, la plupart des polymères ont l'avantage, devant les UH moléculaires, d'être solubles dans leur monomère, d'être très insolubles dans l'eau et surtout d'être inertes pour le produit final.

Choix de l'amorceur

Les amorceurs historiquement utilisés en miniémulsion sont hydrosolubles, comme le KPS (persulfate de potassium). Avec ce type d'amorceurs, une fois les radicaux générés en phase aqueuse et les oligoradicaux formés, ils vont migrer vers les gouttes de monomère pour commencer la polymérisation. En utilisant des amorceurs organosolubles comme l'AIBN, l'amorçage et la nucléation se font au sein des gouttes de monomère, sans migration des radicaux d'une phase à l'autre. El-Aasser et coll. ont cherché à savoir si la seule présence d'un amorceur organosoluble suffisait à remplacer partiellement l'HD [251]. Ils ont ainsi réalisé la polymérisation du styrène en présence d'HD et de SDS : l'AIBN et le peroxyde de benzoyle ne sont pas assez hydrophobes pour diminuer considérablement la quantité d'HD, mais le peroxyde de lauroyle a donné des résultats encourageants.

Obtention de nanoparticules ayant une surface hydrophile fonctionnalisable

Lors de l'élaboration de NPs multifonctionnelles, il peut être intéressant d'en (post-) fonctionnaliser la surface. Ceci peut être facilement réalisé en copolymérisant un monomère hydrophile fonctionnalisable avec un monomère hydrophobe. Landfester et coll. [252] ont obtenu des latex de polystyrène à fonction acide carboxylique ou amine en copolymérisant du styrène avec de l'AA ou du chlorure de méthacrylate de 2-aminoéthyle présent de 0 à 10% en poids. Si le tensioactif utilisé est non ionique, la stabilité colloïdale n'est pas assurée. En utilisant un tensioactif ionique, des particules homogènes sont obtenues. La même formulation permet d'encapsuler un fluorophore (*N*-(2,6-diisopropylphényle)-pérylène-3,4-dicarboximide) [185].

Dans la suite, nous verrons la synthèse de NPs de type cœur/couronne synthétisées en employant des copolymères à blocs.

Nanoparticules fluorescentes synthétisées par miniémulsion.

Il est possible de synthétiser des NPs fluorescentes où le fluorophore est lié de manière covalente au cœur des NPs en utilisant un comonomère fluorescent. Winnik et coll. ont ainsi synthétisé des NPs de PMMA ou de PS copolymérisés avec des dérivés méthacrylates de benzothioxanthènes [238]. Les NPs mesurent entre 60 et 145 nm de diamètre selon la nature de la matrice et la quantité de tensioactif utilisée. Les monomères fluorescents sont tous polymérisés à plus de 92 % et peuvent être incorporés jusqu'à 3 % en masse. La même équipe a également copolymérisé des dérivés naphtalimides dans une matrice de poly(méthacrylate de butyle) [253].

Récemment, Turshatov et coll. ont utilisé une approche différente en employant des dérivés monomères amphiphiles à base de BODIPY possédant des unités sulfonates [254]. Ces monomères sont utilisés avec du SDS pour la polymérisation en miniémulsion du styrène. Les auteurs arrivent à incorporer jusqu'à 0,1 wt % de BODIPY par rapport au styrène et les NPFs obtenues mesurent alors environ 100 nm de diamètre. Les monomères

fluorescents sont principalement localisés à la surface des NPFs et leurs durées de vie de fluorescence moyennes sont de 3,6-3,9 ns.

La miniémulsion permet également la synthèse de nanoparticules photochromes [255], ou de NPs à la fois fluorescentes et photochromes stabilisées par des tensioactifs [256] ou par une couronne hydrophile obtenue à partir d'un PEO à fonction méthacrylate [257].

Résumé sur la polymérisation en miniémulsion

Les caractéristiques d'une polymérisation en miniémulsion sont les suivantes :

- la formation d'une miniémulsion requiert de l'énergie pour la formation des petites gouttes de monomère ;
- la tension de surface entre les gouttes de monomère et la phase aqueuse est largement supérieure à 0 et la surface des gouttes n'est pas totalement recouverte par des tensioactifs ;
- les miniémulsions requièrent l'emploi d'agents ultra hydrophobes afin qu'une pression osmotique puisse s'établir et contrebalancer la pression de Laplace au sein des gouttes ;
- il n'y a par conséquent pas de migration de monomère à travers la phase aqueuse.

Si les constituants de départ sont bien choisis, une dispersion colloïdale stable et monodisperse de polymères est obtenue. Cette technique permet l'encapsulation ou la copolymérisation de chromophores ainsi que l'élaboration de particules à surface fonctionnalisable. Néanmoins, la polymérisation radicalaire classique en miniémulsion ne permet pas la formation de macromolécules à architecture et composition contrôlées. La polymérisation radicalaire contrôlée a alors été développée en milieu hétérogène afin d'obtenir des particules homogènes en terme de taille des NPs et de masse molaire des chaînes polymères.

1.4.4 Polymérisation RAFT en miniémulsion

La polymérisation RAFT en miniémulsion [258, 259] s'est développée dans le but d'obtenir des particules de taille nanométrique de structures variées (cœur/couronne par exemple [260]) et comportant des chaînes de copolymères d'architectures modulables (copolymères à bloc, alternés...). Contrairement aux milieux homogènes, la transposition de la polymérisation radicalaire classique à la polymérisation RAFT en miniémulsion n'est pas triviale. Les principaux problèmes rencontrés sont dus à la compartimentalisation des agents RAFT et monomères, modifiant la concentration en agents RAFT entre particules et durant la synthèse. La stabilité colloïdale des particules et le contrôle de la polymérisation sont fortement affectés par ces effets [261].

En PRC conduite en miniémulsion, toutes les chaînes sont amorcées en même temps et grandissent simultanément au sein des gouttelettes de monomère. Au début de la polymérisation il existe donc une forte concentration en oligomères, et pas ou peu de

chaînes de polymère à forte masse molaire (contrairement à la polymérisation radicalaire conventionnelle). Ceci peut entrainer un effet de "super gonflement" où les monomères des gouttes non nucléées migrent à travers la phase aqueuse pour alimenter les gouttes où la polymérisation a déjà débuté [262]. Ce phénomène peut être minimisé en utilisant par exemple des macro-agents RAFT plutôt que des agents RAFT moléculaires [263], une plus forte concentration en agent ultra-hydrophobe, une plus faible concentration en agent RAFT, ou encore l'utilisation de tensioactifs non ioniques.

De plus, des problèmes d'hydrolyse de l'agent RAFT, en particulier en milieu aqueux basique ont été reportés [264]. L'hydrolyse semble moins facile pour des agents RAFT trithiocarbonates que pour les dithioesters [265].

Enfin, l'un des problèmes majeurs est la migration de l'agent RAFT en phase aqueuse. Ce phénomène arrive principalement en début de polymérisation lors de la rupture du fragment R, pouvant entraîner des phénomènes d'inhibition ou de retard [266, 267]. Il est possible de limiter, voire d'empêcher cet effet en utilisant des agents RAFT macromoléculaires hydrophobes [268]. Ainsi, Heuts et coll. ont obtenu des nanoparticules de polystyrène plus petites (160 nm contre 250 nm de diamètre) et une cinétique de polymérisation plus rapide en utilisant un macro-agent RAFT possédant un bloc PS de 2080 g/mol (mais les I_P restent proches de 2) [269].

Malgré ces inconvénients, des avancées récentes ont montré le potentiel de cette technique pour réaliser des objets originaux et multi-fonctionnels lorsque les composants de départ ont été bien choisis. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant des macro-agents RAFT amphiphiles. Ces derniers permettent notamment de mener les synthèses sans l'utilisation de tensiocatifs comme cela sera abordé dans la partie suivante.

Utilisation de macro-agents RAFT amphiphiles

Les macro-agents RAFT amphiphiles vont permettre d'introduire un bloc hydrophile fonctionnel en surface des particules pour l'obtention de particules cœur/couronne. Durant la synthèse ils permettent également la stabilisation des particules par répulsion stérique. Ils permettent donc d'obtenir des NPs auto-stabilisées, sans tensioactifs.

Martins dos Santos, D'Agosto, Lansalot et coll. ont synthétisé des latex de polystyrène pegylés en utilisant un macro-agent RAFT dithiobenzoate à base de PEO_{45} [270]. Les auteurs utilisent comme agent ultra-hydrophobe l'hexadécane. En utilisant l'AIBN comme amorceur, les particules obtenues mesurent en moyenne 200 nm, mais si la concentration en macro-agent RAFT est élevée, les particules obtenues présentent des trous. Si l'AIBN est remplacé par le KPS, les particules sont légèrement plus petites mais elle présentent encore des trous. Ceci peut être attribué à la solubilité du PEO dans le styrène qui peut permettre la formation de compartiments multiples. Dans tous les cas, les copolymères à bloc PEO-*b*-PS présentent des I_P d'environ 1,9. La même équipe a alors changé de macro-agent RAFT en utilisant cette fois deux types d'agents trithiocarbonates (Figure 1.22) [271]. Encore une fois, en augmentant la concentration en macro-agent RAFT, les particules

obtenues sont plus petites. Avec le PEO-PTTC les particules sont plus homogènes en taille et les I_P plus faibles (1,3 contre 1,6 avec le PEO-DTTC). Par ailleurs, les auteurs ont observé que le PEO-DTTC formait des micelles en phase aqueuse, alors que le PEO-PTTC présente certainement une CMC très supérieure. Ce dernier est principalement localisé à l'interface entre les gouttes de monomère et la phase aqueuse, assurant par conséquent une meilleure stabilité des gouttes et empêchant une nucléation secondaire au cœur des micelles. L'amélioration du contrôle de la polymérisation et de la taille des gouttes observés avec le PEO-PTTC ont été attribués à cette localisation.

Il est à noter que le PEO-DTTC a été utilisé avec succès par Charleux et coll. dans la polymérisation en émulsion du styrène et de l'ABu (acrylate de butyle) [272].

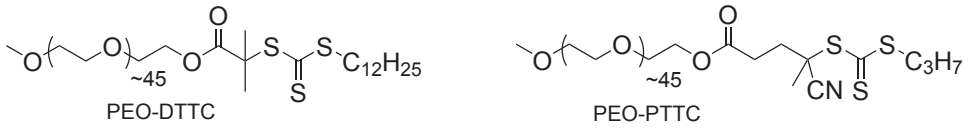


FIGURE 1.22 – Structure des macro-agents RAFT pegylés utilisés dans la référence [271] pour la polymérisation en miniémulsion du styrène.

Un des risques encourus en utilisant des macro-agents RAFT hydrophiles est qu'ils soient principalement localisés dans la phase aqueuse, rendant alors impossible un bon contrôle de la polymérisation dans les gouttes de monomères hydrophobes. Pour faciliter l'ancrage des macro-agents RAFT dans les gouttes de monomère il est alors possible d'ajouter un bloc de polymère hydrophobe de masse molaire judicieusement choisie. Ces macro-agents RAFT amphiphiles vont alors jouer le rôle de tensioactifs mais seront très peu labiles contrairement aux tensioactifs classiques.

Hawkett et coll. ont utilisé des macro-agents RAFT trithiocarbonates PAA_5-*b*-PS_{20}-TTC-C_4 (FIGURE 1.23) ou PAA_5-*b*-$PABu_{20}$-TTC-C_4 pour contrôler respectivement la polymérisation en miniémulsion du styrène ou de l'acrylate de butyle en milieu aqueux basique [273]. La polymérisation est réalisée en présence du macro-agent RAFT, du monomère, de l'eau basique et de l'ACPA comme amorceur. Aucun autre produit n'est nécessaire, comme un tensioactif ou un agent ultra-hydrophobe. Pour un rapport $[monomère]_0$ / $[macro\text{-}RAFT]_0$ de 50 environ, les nanoparticules à cœur PABu mesurent 70 nm de diamètre et les chaînes dont elles sont constituées ont un I_P de 1,24 alors que les particules à cœur PS mesurent 105 nm de diamètre et leurs chaînes ont un I_P de 1,19. Lorsque la taille du bloc polystyrène augmente (de 50 à 560), la taille des particules diminue (jusqu'à 73 nm de diamètre) mais les I_P augmentent (jusqu'à 2,09). La même équipe a alors étudié les propriétés tensioactives de trois types de macro-agents RAFT dérivés de celui présenté FIGURE 1.23 : PAA_8-*b*-PS_8-TTC-C_4, PAA_9-*b*-PS_5-TTC-C_4, PAA_9-TTC-C_{12} [274]. À l'aide de mesures de tension de surface, les auteurs ont trouvé que les deux agents RAFT à bloc hydrophobe PS_5-TTC-C_4 ou TTC-C_{12} se comportent comme des tensioactifs moléculaires avec une CMC définie. En revanche, il n'est pas possible de déterminer une CMC pour le PAA_8-*b*-PS_8-TTC-C_4, dû à une très faible solubilité du composé dans l'eau. Par ailleurs,

les auteurs ont montré que celui-ci stabilise mieux les gouttes de monomère. La taille du bloc hydrophobe des macro-agents RAFT amphiphiles est donc un critère primordial dans la stabilisation des particules.

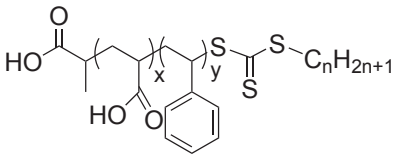


FIGURE 1.23 – Structure des macro-agents RAFT PAA_x-*b*-PS_y-C_n utilisés par Hawkett et coll. pour la polymérisation en miniémulsion du styrène [273, 274, 275].

Enfin, cette équipe a également étudié l'influence du bloc polystyrène sur le contrôle de la polymérisation du styrène en miniémulsion [275]. Les auteurs ont travaillé avec trois macro-agents RAFT de différentes longueurs de blocs hydrophiles et hydrophobes (FIGURE 1.23) : PAA_5-*b*-PS_{15}-TTC-C_4, PAA_5-*b*-PS_{24}-TTC-C_4, PAA_{20}-*b*-PS_{28}-TTC-C_4 et PAA_{12}-*b*-PS_5-TTC-C_4. La stabilité dans le temps des gouttes de styrène dans l'eau (après sonification du système) a été étudiée avec ces trois macro-agents RAFT, vraisemblablement en gardant constante la concentration en monomère ($[S]_0 = 4{,}23$ mmol) et en modifiant la concentration en macro-agent RAFT ($[\text{styrène}]_0/[\text{macro-RAFT}]_0$ variable, $\tau_{sol} \approx 1\%$). Avec les trois premiers macro-agents RAFT, pour un rapport $[\text{styrène}]_0/[\text{macro-RAFT}]_0$ (DP_n visé) de 300, les gouttes mesurent environ 70 nm de diamètre et sont stables dans le temps. En revanche, avec l'agent RAFT PAA_{12}-*b*-PS_5-TTC-C_4, le diamètre des gouttes augmente dans le temps (de 800 à 1200 nm en une heure), ce qui traduit un phénomène de mûrissement d'Ostwald. Avec les trois autres types de macro-agents RAFT, quel que soit le rapport $[\text{styrène}]_0/[\text{macro-RAFT}]_0$, les particules mesurent sensiblement la même taille, bien que les plus petites soient obtenues avec le plus hydrophobe des agents RAFT (PAA_5-*b*-PS_{24}-TTC-C_4). Lorsque le rapport $[\text{styrène}]_0/[\text{macro-RAFT}]_0$ augmente, les particules deviennent homogènes en taille. Ceci est attribué au fait que lorsque la concentration en macro-agents RAFT est trop grande par rapport à celle du styrène, ceux-ci ne se trouvent plus seulement à la surface des gouttes mais forment aussi des agrégats en phase aqueuse (FIGURE 1.24). Les auteurs concluent que le macro-agent RAFT le plus efficace est le plus hydrophobe des amphiphiles. Ce type de macro-agent RAFT est très intéressant pour la polymérisation en miniémulsion dans la mesure où il remplace à la fois le tensioactif et l'agent ultra-hydrophobe.

En Chine, l'équipe de Luo a également utilisé des macro-agents RAFT de même nature PAA_{29}-*b*-PS_5-TTC-C_{12} pour la polymérisation du styrène en émulsion [276]. Ils ont comparé leur efficacité de stabilisation colloïdale à des polymères à bloc PAA_{29}-*b*-PS_5 (sans fonction RAFT) et à du SDS. Des conclusions similaires à celles de Hawkett sont faites, à savoir que l'utilisation de tensioactifs macromoléculaires prévient le mûrissement d'Ostwald et les phénomènes de super gonflement, contrairement au SDS utilisé seul. Cette même équipe avait précédemment réalisé la synthèse de nanocapsules polymères

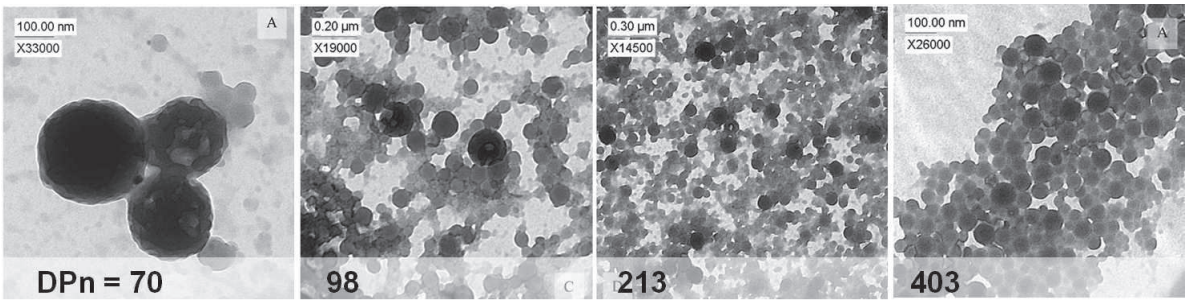


FIGURE 1.24 – Clichés de MET des latex de polystyrène stabilisés par PAA_5-*b*-PS_{24}-TTC-C_4 pour différents rapports $[\text{styrène}]_0/[\text{macro-RAFT}]_0$ (DP_n visé) et pour une $[\text{styrène}]_0$ constante (de gauche à droite, DP_n visé = 70, 98, 213 et 403) [275]. *Utilisation avec permission depuis Binh T. T. Pham et coll., Miniemulsion Polymerization with Arrested Ostwald Ripening Stabilized by Amphiphilic RAFT Copolymers, Macromolecules, 43, 7950-7957, 2010. Droits d'auteur 2010 American Chemical Society.*

en miniémulsion avec des agents RAFT de masse molaire beaucoup plus faible : PAA_2-*b*-PS_{1-3}-TTC-C_{12} et en présence d'hexadécane [277]. Les auteurs obtiennent alors des nanocapsules de polymère d'environ 100 nm, mais celles-ci ne sont homogènes en taille qu'avec l'ajout de SDS à la formulation.

En résumé, la polymérisation RAFT en miniémulsion est un outil de choix pour la réalisation de nanoparticules cœur/couronne présentant différents blocs polymères fonctionnels. Le succès de ce type de polymérisation réside dans un choix judicieux des constituants de départ. L'utilisation de macro-agents RAFT amphiphiles ayant des blocs hydrophiles et hydrophobes de masses molaires adaptées présente de nombreux avantages : elle permet de réaliser les synthèses en l'absence de tensioactifs et de molécules UH, constituants pouvant être gênants pour des applications en biologie notamment.

1.5 Choix d'un système "idéal" pour notre étude

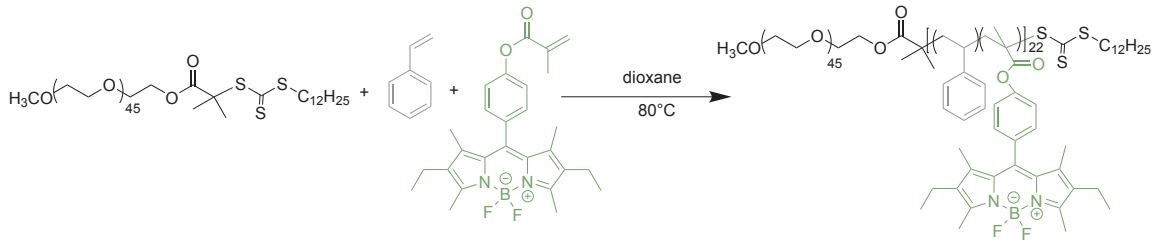
À travers cette introduction bibliographique il a été vu que les nanoparticules polymères sont un outil de choix pour l'élaboration de nanomarqueurs/nanosenseurs fluorescents. Afin d'en exploiter au maximum les capacités, il faut :

- utiliser un fluorophore photostable et aux propriétés de fluorescence éventuellement modulables. Le BODIPY est un bon candidat ;
- utiliser un fluorophore présentant une fonction polymérisable par voie radicalaire. Ainsi, il sera copolymérisé à une matrice polymère et donc lié de manière covalente à la NP évitant tout relargage ;
- isoler les fluorophores de référence du milieu extérieur afin d'éviter toute variation de fluorescence lors des changements de milieu ;
- pouvoir concentrer les fluorophores au cœur des objets tout en maintenant de bons rendements quantiques de fluorescence et donc une bonne brillance de l'objet ;
- avoir un cœur "dur" hydrophobe permettant de protéger au maximum le fluorophore et en réduisant sa mobilité (diminuant ainsi la probabilité de désexcitation par voie non radiative et une possible évolution des propriétés spectrales avec le temps) et avoir un cœur non absorbant dans le visible. Le PS satisfait à ces exigences ;
- que les NPs présentent une couronne hydrophile liée de manière covalente au cœur des objets, permettant une stabilité colloïdale des NPs et une certaine furtivité pour d'éventuelles applications en biologie. Cela est possible en utilisant une couronne à base de PEO.

La méthode de polymérisation RAFT est apparue comme un outil de choix pour remplir ces critères car elle permet la synthèse de nanoparticules auto-stabilisées composées de copolymères à blocs ou statistiques amphiphiles.

Des travaux préliminaires au laboratoire [193] ont permis de synthétiser des copolymères à bloc amphiphiles fluorescents en partant d'un macro-agent RAFT PEO à fonction trithiocarbonate (Schème 1.9). Cet agent RAFT, comme évoqué précédemment est connu pour pouvoir permettre le contrôle de la polymérisation du styrène (et non du MMA). En réalisant une extension de bloc en copolymérisant le styrène avec un BODIPY à fonction méthacrylate de phényle (BDPMA) en faible proportion, il a donc été possible de synthétiser des copolymères diblocs amphiphiles PEO_{45}-*b*-P(S_{18}-*co*-$BDPMA_4$)$_{22}$. La synthèse a été réalisée deux fois et semblait assez reproductible. Le contrôle de la polymérisation était conservé, les I_P étant de 1,1 environ.

Les copolymères ont ensuite été assemblés en micelles par une méthode de déplacement de solvants. Malheureusement, cette méthode n'était pas été très concluante puisque les objets obtenus étaient très polydisperses (forme et taille). De plus, le rendement quantique des micelles était de 0,07 contre 0,7 pour le monomère en solution diluée. Cela a été attribué à une trop grande proximité des fluorophores au sein des particules.



Schème 1.9 – Synthèse des copolymères fluorescents amphiphiles à base de PEO, de PS et de BODIPY monomère à fonction méthacrylate (BDPMA) [193].

Il a donc été envisagé de réaliser la synthèse de ces nanoparticules *in situ* par une méthode de polymérisation RAFT en miniémulsion afin de s'affranchir de l'assemblage des copolymères amphiphiles par la méthode de déplacement de solvants.

Le prochain chapitre présentera les conditions de synthèse développées afin de réaliser la synthèse de ces nano objets fluorescents, ayant une couronne hydrophile à base de PEO et un cœur fluorescent de PS copolymérisé à un monomère de BODIPY.

Dans la suite du manuscrit, les propriétés spectroscopiques de ces NPFs cœur/couronne seront étudiées. Puis, la nature du fluorophore en leur cœur ainsi que leur couronne seront modulées. Enfin, la fonctionnalisation de la surface des NPFs et des perspectives d'application en biologie seront abordées.

Chapitre 2 : Synthèse des nanoparticules fluorescentes par une polymérisation RAFT en miniémulsion

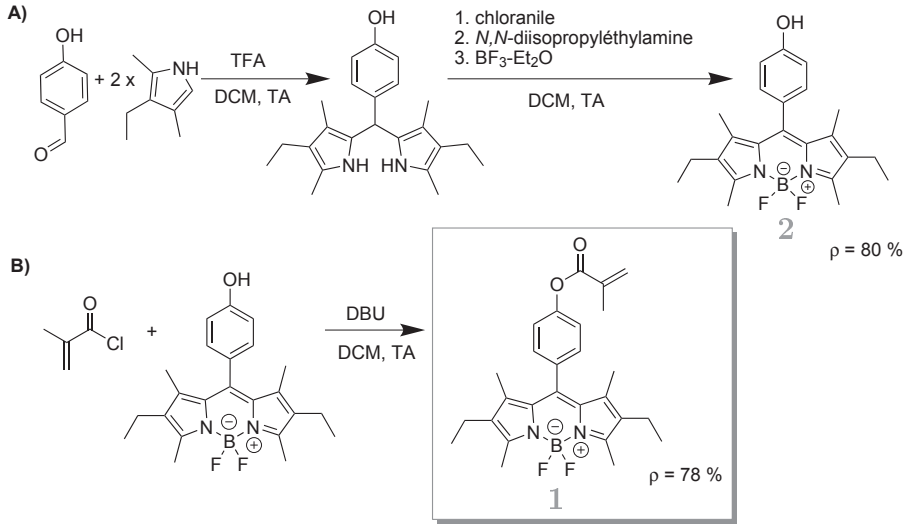
Dans le chapitre précédent, diverses méthodes de fabrication de nanoparticules fluorescentes (NPFs) polymères ont été présentées. Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré qu'un monomère dérivé du BODIPY à fonction méthacrylate de phényle (BDPMA) pouvait être copolymérisé avec le styrène par une polymérisation RAFT en milieu homogène et que la synthèse de copolymères amphiphiles PEO-*b*-P(S-*co*-BDPMA)-TTC était possible [193]. Ces copolymères, assemblés par la méthode de déplacement de solvants, forment des agrégats micellaires polydisperses. Afin d'éviter cette étape d'assemblage peu reproductible, nous proposons de réaliser la synthèse *in situ* des NPFs. Cela est rendu possible par une méthode de polymérisation en miniémulsion couplée à la technique de polymérisation RAFT. Ainsi, des NPFs d'un diamètre inférieur à 100 nm, dont la masse molaire des chaînes de polymère est contrôlée, pourraient être obtenues. Cette méthode permettrait également l'obtention de NPFs cœur/couronne avec une couronne hydrophile stabilisante et un cœur hydrophobe fluorescent. Ce chapitre a pour but de présenter la mise au point de cette synthèse.

Dans un premier temps, la synthèse du monomère BODIPY (BDPMA) sera abordée. Ensuite seront vues différentes conditions de polymérisation en miniémulsion en présence de macro-agents RAFT amphiphiles à base de PEO et de PAA. Enfin, un procédé simplifié "one-pot" de synthèse de NPFs sera présenté.

2.1 Synthèse du monomère fluorescent à base de BODIPY : BDPMA

La synthèse du monomère fluorescent **1** utilisé dans la plus grande partie de cette thèse est présentée sur le Schème 2.1. Ce monomère sera appelé BDPMA par la suite. Il a été choisi comme référence car sa synthèse est relativement simple et rapide et parce qu'il présente des propriétés spectroscopiques intéressantes (détaillées §3.1).

Le composé de départ utilisé pour obtenir le BDPMA est le BODIPY phénol **2**. Celui-ci est obtenu par une synthèse classique de BODIPY à partir d'aldéhyde (Schème 1.1) :



Schème 2.1 – Synthèse du monomère fluorescent à base de BODIPY : BDPMA.

dans un premier temps le dipyrrométhane est obtenu par condensation du 4-hydroxybenzaldéhyde sur deux unités krypto-pyrroles (catalysée par le TFA) ; puis le composé est oxydé et complexé par ajout de BF_3 en milieu basique.

Ensuite, le BDPMA est obtenu par estérification entre le BODIPY phénol **2** et le chlorure de méthacryloyle avec un rendement de 78 %. Par cette méthode il a été possible de synthétiser jusqu'à 1 g de BDPMA avec un rendement global de 62 %.

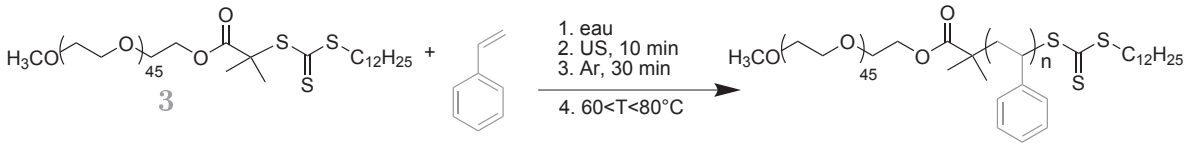
2.2 Synthèse de nanoparticules à couronne PEO

Les premières particules que nous avons souhaité obtenir sont constituées d'une couronne de PEO et d'un cœur PS. Le macro-agent RAFT à base de PEO **3** présente une masse molaire de 2 kg/mol ($\approx$ 45 unités EO), ce qui confèrera normalement aux objets une certaine furtivité en biologie. Dans cette thèse, seul ce PEO sera utilisé, le nombre d'unités EO le composant ne sera donc pas reprécisé et il sera appelé PEO-TTC.

La polymérisation en miniémulsion du styrène a été réalisée par une polymérisation RAFT en présence de macro-agent RAFT PEO-TTC (Schème 2.2). Ce macro-agent RAFT présente une CMC de 0,5 mM à 25°C [272]. Cela signifie donc qu'il a des propriétés amphiphiles grâce à la chaîne alkyle C_{12}. Les réactions étant réalisées à une concentration en PEO-TTC de 10 mM, celui-ci sera alors sous forme de micelles durant la synthèse. Par ailleurs, cet agent RAFT est connu pour pouvoir contrôler des polymérisations RAFT en émulsion [272] et en miniémulsion [271] du styrène et assurer la stabilité colloïdale des NPs obtenues.

Des expériences préliminaires ont été menées sans fluorophore afin de simplifier le système. Elles ont été réalisées sans agent ultra-hydrophobe (HD). Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau 2.1. Expérimentalement, le macro-agent RAFT et l'amorceur organosoluble (AIBN) sont dissous dans le styrène. Puis, de l'eau est ajoutée

et le système soniqué pendant 10 min (Schème 2.2). Enfin, le milieu est dégazé et placé dans un bain d'huile thermostaté (60 - 80°C).



Schème 2.2 – Synthèse de NPs par une polymérisation en miniémulsion du styrène en présence du macro-agent RAFT PEO-TTC **3**.

Tableau 2.1 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations RAFT en miniémulsion du styrène (1 mol/L_{eau}) dans l'eau en présence de PEO-TTC ($[S]_0/[RAFT]_0 = 100$), amorcées par l'AIBN ($[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 10$), à différentes températures, arrêtées après 20h.

Exp	T	χ_S^a	$M_{n,\,th}$	$M_{n,\,CES}^{PS}$	I_P	D_z (σ)
	°C	%	kg/mol	kg/mol		nm
CG51	60	35	6,1	6,5	1,07	50 (0,27)
CG49	70	43	6,9	6,7	1,08[b]	100 (0,20)
CG47	80	56	8,2	9,0	1,13[b]	700 (polydisperse)

[a] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie après 20h. [b] Distribution bimodale des masses molaires.

Les résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène stabilisées par le macro-agent RAFT PEO-TTC sont présentés dans le Tableau 2.1. La température des synthèses varie de 60 à 80°C, alors que les autres paramètres sont maintenus constants (concentrations). À 60°C, les NPs obtenues sont petites (D = 50 nm) et assez monodisperses. Les indices de polymolécularité des chaînes sont faibles (1,07), traduisant un bon contrôle de la polymérisation. En revanche, les taux de conversion en styrène sont faibles, probablement à cause d'une trop faible température utilisée pour cet amorceur à décomposition thermique[1]. À 80°C, les NPs obtenues sont très polydisperses et la distribution des masses molaires obtenues par CES dans le THF est bimodale. Le taux de conversion est légèrement plus élevé qu'à 60°C. Les NPs synthétisées à 70°C présentent un comportement intermédiaire. Ces résultats montrent que lorsque la température augmente, le diamètre des NPs augmente et le contrôle de la polymérisation empire. Nous supposons que ces effets sont dûs à la déshydratation du PEO lorsque la température augmente, modifiant alors certainement son coefficient de partage entre l'eau et la phase organique de styrène.

1. Temps de demi-vie de l'AIBN : 60°C : 33h30, 70°C : 8h30, 80°C : 3h30

Les polymérisations menées à 60°C semblent les plus prometteuses en terme de diamètre de NPs et de contrôle de la polymérisation. À cette température, la quantité d'amorceur (AIBN) ou la concentration molaire en styrène ont été augmentées dans le but d'améliorer les taux de conversion (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations RAFT en miniémulsion du styrène dans l'eau en présence de PEO-TTC ($[S]_0/[RAFT]_0 = 100$) à différents taux de solide, amorcées par l'AIBN à différentes concentrations, à 60°C, arrêtées après 20h.

Exp.	$[S]_0$ mol/L_{eau}	$[RAFT]_0/[AIBN]_0^a$	τ_{sol} wt%	χ_S^b %	$M_{n,\,th}$ kg/mol	$M_{n,\,CES}^{PS}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG51	1	10	11	35	6,1	6,5	1,07	50 (0,27)
CG59	1	5	12	38	6,4	7,1	1,13[c]	50 (0,22)
CG61	2	5	20	65	9,2	9,6	1,44[c]	100 (0,05)

[a] Rapport des concentrations molaires en macro-agent RAFT et en amorceur. [b] Conversion en styrène déterminée par gravimétrie. [c] Distribution bimodale des masses molaires.

Lorsque la quantité d'amorceur est multipliée par deux comparativement à l'agent RAFT, le taux de conversion ne semble pas changer (35-38%) et le diamètre des particules non plus. En revanche, l'indice de polymolécularité augmente et la distribution des masses molaires devient bimodale : une partie des chaînes semble contrôlée (pic fin aux plus faibles volumes de rétention), alors qu'une autre partie ne l'est pas (pic large aux plus fortes masses molaires).

Lorsque le taux de solide passe de 11 à 20% (en gardant constant le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$), le taux de conversion passe de 35 à 65% mais le diamètre des particules double également. L'indice de polymolécularité est assez élevé et la distribution des masses molaires est bimodale.

Des expériences menées dans les mêmes conditions en utilisant un amorceur hydrosoluble tel que l'ACPA ont donné des résultats similaires.

Pour toutes ces polymérisations, les gouttelettes de départ formées après ultra-sons sont très polydisperses et mesurent entre 700 et 1000 nm de diamètre. Les gouttes de monomère ne semblent pas suffisamment stabilisées par les macro-agents RAFT PEO-TTC et les systèmes ne semblent donc pas suivre un mécanisme de polymérisation en miniémulsion.

Le PEO-TTC ne paraît pas pouvoir suffisamment stabiliser les gouttelettes de départ. À l'issue de la polymérisation, quelle que soit la température utilisée, la quantité d'amorceur ou sa présence en phase aqueuse ou organique, les taux de conversion sont faibles et les masses molaires peu contrôlées. Lansalot et coll. ont étudié des systèmes très similaires [271]. Ils utilisent le même macro-agent RAFT PEO-TTC pour la polymérisation en miniémulsion du styrène dans l'eau, en présence d'environ 5 % d'agent ultra-hydrophobe

(HD). La polymérisation est réalisée à 75°C et amorcée par l'AIBN ($[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 0,5), soit des concentrations en amorceur beaucoup plus élevées que dans notre travail. Après 25h, le styrène atteint 86 % de conversion et les particules formées ont un diamètre assez grand (D_h = 370 nm, σ = 0,28). De plus, le contrôle de la polymérisation est médiocre (I_P = 1,6). La même synthèse a alors été réalisée en présence d'un macro-agent RAFT PEO-CN-TTC (Figure 1.22). Les NPs obtenues sont plus petites (D_h = 200 nm, σ = 0,08) et le contrôle de la polymérisation nettement meilleur (I_P = 1,3). Les auteurs attribuent cette différence au fait que le PEO-TTC pourrait former des micelles dans l'eau si sa concentration est supérieure à celle nécessaire à occuper la surface des gouttes de styrène. Par conséquent, le mécanisme de polymérisation n'est peut-être pas de la miniémulsion pure car une seconde nucléation peut avoir lieu au cœur de ces micelles. De plus, les groupements TTC ne sont pas nécessairement accessibles pour la polymérisation du styrène, entraînant un mauvais contrôle de la polymérisation. Au contraire, le PEO-CN-TTC serait quant à lui plus localisé à l'interface eau/styrène et ne formerait pas ou peu de micelles à ces concentrations. Le groupement RAFT serait donc plus accessible pour la polymérisation.

La polymérisation du styrène par le PEO-TTC dans les conditions employées est peu encourageante. De plus, les particules obtenues ne sont pas fonctionnalisables. Nous avons alors introduit un second bloc hydrophile à base de poly(acide acrylique) dans la structure des macro-agents RAFT en espérant obtenir des particules plus stables et un meilleur contrôle de la polymérisation.

2.3 Synthèse de nanoparticules à couronne PEO-*b*-PAA

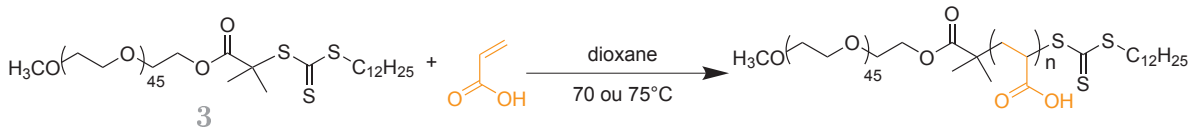
2.3.1 Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC en milieu homogène

Les résultats de la synthèse de particules à cœur PS stabilisées par des macro-agents RAFT PEO-TTC par une polymérisation en miniémulsion ne sont pas satisfaisants. Il a donc été envisagé de stabiliser les NPs par une couronne doublement hydrophile PEO-*b*-PAA.

Le pK_a de l'acide acrylique est de 4,35 [278]. Pour les polyélectrolytes, le pK_a dépend de la masse molaire du polymère, de la concentration et de la nature des sels en phase aqueuse, de la température... Dans le cas du PAA, il est compris entre 4,5 et 6,5 [279, 280]. Si la polymérisation est réalisée en miniémulsion dans l'eau en utilisant un équivalent de soude par rapport aux unités AA (pH $\approx$ 7-8), le PAA sera sous forme carboxylate, donc chargé négativement. Cette couronne doublement hydrophile doit pouvoir permettre la stabilisation des gouttelettes/particules de manière stérique et électrostatique.

Les macro-agents RAFT à deux blocs hydrophiles sont synthétisés dans le dioxane

entre 70 et 75°C par extension de bloc du macro-agent RAFT PEO-TTC (Schème 2.3). Notons que le PAA peut être synthétisé dans l'eau [281], mais pour des raisons pratiques il a été choisi de réaliser ces synthèses dans un solvant organique. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau 2.3.



Schème 2.3 – Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC.

Tableau 2.3 – Conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC à 70°C dans le dioxane.

Exp.	$[AA]_0$ mol/L_{total}	$[RAFT]_0^a$ mol/L_{total}	$[ACPA]_0$ mol/L_{total}	$[AA]_0/[RAFT]_0^a$	$[RAFT]_0^a/[ACPA]_0$
CG19B	2,1	$1{,}0.10^{-1}$	$7{,}0.10^{-3}$	20	15

[a] Macro-agent RAFT PEO-TTC.

L'évolution de la conversion molaire en acide acrylique en fonction du temps est présentée sur la Figure 2.1 (conversion déterminée par RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$, *cf.* §7.1.3). La polymérisation atteint 73% de conversion après 3h. Une période d'inhibition d'environ 20 min est observée.

Ces macro-agents RAFT à base d'acide acrylique ne peuvent pas être injectés tels quels dans les colonnes de CES à cause de leurs charges. Afin de pouvoir les analyser, ils sont donc méthylés par le triméthylsilyldiazométhane (TMS). Le polymère analysé n'est alors plus du PAA mais du poly(acrylate de méthyle). Les M_n déterminées par CES sont corrigées de cette différence de masse molaire. Les chromatogrammes d'exclusion stérique montrent un déplacement des pics vers les plus fortes masses molaires au cours de la polymérisation (Figure 2.1). Les masses molaires moyennes en nombre évoluent linéairement avec la conversion et les indices de polymolécularité sont inférieurs à 1,1 durant toute la polymérisation (Figure 2.1). La polymérisation de l'AA à partir de macro-agent RAFT PEO-TTC dans les conditions employées est donc contrôlée. Néanmoins, les valeurs des M_n expérimentales ne sont pas en adéquation avec celles théoriquement attendues. Cela est certainement dû à la calibration employée à base d'étalons de PS.

La polymérisation de l'acide acrylique à partir de PEO-TTC étant contrôlée et la cinétique de polymérisation étant connue, la synthèse d'un macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC en grandes quantités a donc été réalisée dans les mêmes conditions. Afin d'éviter la formation d'une grande quantité de chaînes polymères mortes, la synthèse du macro-agent RAFT est arrêtée après environ 50 % de conversion, soit environ 100 min. Pour introduire

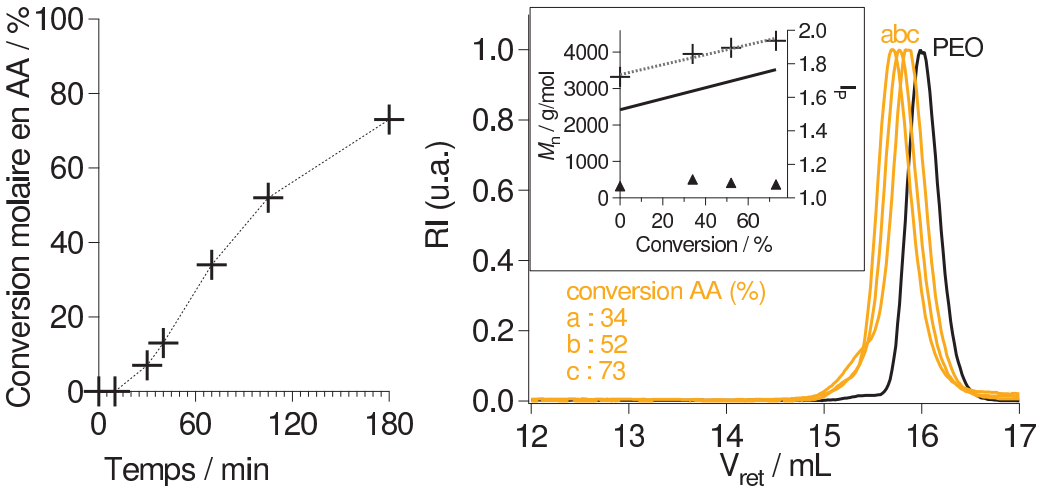


FIGURE 2.1 – Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC réalisée dans les conditions du TABLEAU 2.3. Gauche : évolution de la conversion molaire en acide acrylique en fonction du temps. Droite : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF pour les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC à différents taux de conversion et pour le macro-agent RAFT PEO-TTC de départ. Insertion : évolution des masses molaires moyennes en nombre théoriques (-) et expérimentales (+) et des indices de polymolécularité (▲) en fonction de la conversion molaire en acide acrylique ($M_{n,\,exp}$ et I_P déterminés par CES dans le THF en utilisant une calibration conventionelle PS).

un bloc PAA d'environ 10 unités, il faut donc commencer la polymérisation en visant un DP_n de 20 unités (TABLEAU 2.3).

TABLEAU 2.4 – Résultats expérimentaux obtenus pour la synthèse du macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC dans le dioxane à 70°C (conditions expérimentales identiques à celles du TABLEAU 2.3)

Exp.	t	χ^a_{AA}	$M_{n,\,th}$	$M^{PS}_{n,\,CES}$	I_P
	min	%	g/mol	g/mol	
CG20B	105	58	3280	4170	1,06

[a] Conversion molaire en acide acrylique déterminée par RMN dans le $CDCl_3$.

.

La polymérisation est reproductible puisque la conversion en monomère en 105 min correspond bien à celle attendue. En supposant que tout l'agent RAFT a réagi, le copolymère formé est constitué de 12 unités acide acrylique en moyenne ($DP_n = 12$). L'excès d'AA est éliminé par séchage sous vide sous agitation et chauffage (≈ 50°C) et son élimination vérifiée par RMN du ^1H dans le $CDCl_3$. Remarquons que sous sa forme protonée ce macro-agent RAFT est soluble dans la plupart des solvants organiques (chloroforme, toluène...) mais lorsqu'il est sous la forme carboxylate il est alors soluble uniquement dans l'eau.

Avant toute utilisation en milieu hétérogène, ce macro-agent RAFT a été testé pour la polymérisation RAFT en milieu homogène du styrène et du styrène copolymérisé avec du BDPMA. Les conditions expérimentales sont données dans le Tableau 2.5.

Tableau 2.5 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations RAFT du styrène et du styrène-*co*-BDPMA dans le dioxane en présence de PEO-*b*-PAA_{12}-TTC, amorcées par l'ACPA ($[RAFT]_0/[ACPA]_0 = 3{,}5$), à 80°C, arrêtées après 22h. Les concentrations en monomère(s) sont respectivement de 2,5 et 2,8 mol/L_{total}.

Exp.	$[M]_0/[RAFT]_0^a$	BDPMA mol %	χ_S^b %	$M_{n,\,th}$ kg/mol	$M_{n,\,CES}^{PS}$ kg/mol	I_P
CG22B	1000	0	15	19,2	18,6	1,28
CG24B	300	2,4	27	11,7	15,3	1,27

[a] Degré de polymérisation moyen en nombre visé. [b] Conversion en styrène uniquement, déterminée par gravimétrie.

Pour les deux extensions de bloc, aucun macro-agent RAFT résiduel n'est observé par CES, traduisant un bon réamorçage de celui-ci. Les masses molaires moyennes en nombre expérimentales et théoriques sont du même ordre de grandeur et les indices de polymolécularité inférieurs à 1,3 ce qui traduit un assez bon contrôle de la polymérisation. De plus, la présence de BDPMA ne semble pas perturber cette extension de bloc. Il sera donc possible de le copolymériser avec le styrène. Ces macro-agents RAFT peuvent par conséquent être employés pour la synthèse de particules à cœur PS ou P(S-*co*-BDPMA).

2.3.2 Utilisation des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA en miniémulsion

Les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC ont été utilisés dans la polymérisation en miniémulsion du styrène dans l'eau. Nous avons à présent choisi de nous mettre dans des conditions de miniémulsion classiques, c'est à dire qu'en plus des ultra-sons, un agent ultra-hydrophobe, l'hexadécane (HD), a été ajouté au système. Les polymérisations sont réalisées en milieu légèrement basique ($7 < pH < 8$) en utilisant un équivalent molaire de soude par rapport au nombre d'unités acide acrylique du macro-agent RAFT. L'amorceur choisi est l'AIBN afin d'avoir une nucléation principalement localisée dans les gouttes de monomère(s) et la polymérisation est réalisée à 80°C. La concentration en AIBN a été augmentée ($[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 2$) au vu des faibles taux de conversion rencontrés avec le styrène dans les synthèses précédentes (Tableau 2.2) et des résultats obtenus par Lansalot et coll. [271]. Les conditions et résultats expérimentaux sont résumés dans le Tableau 2.6.

TABLEAU 2.6 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC (8 mmol/L_{eau}), avec 6 wt % d'HD (par rapport au styrène), amorcées par l'AIBN ($[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 2), dans l'eau à pH 8 ($[OH^-]_0/[AA]_0$ = 1) et à 80°C, arrêtées après 20h.

Exp	M_1 (mol%)	M_2 (mol%)	$\frac{[M]_0}{[RAFT]_0}$	τ_{sol} wt%	χ^a %	$M_{n,\,th}$ kg/mol	$M_{n,\,CES}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG26B	S (100)	-	140	14	60	12,6	14,4[b]	3,9[b]	270 (0,21)
CG28B	S (100)	-	75	9	64	8,3	15,1[b]	2,8[b]	230 (0,39)
CG29B	S (80)	MMA (20)	70	9	-	-	13,6[b]	5,2[b]	150 (0,14)
CG30B	MMA (84)	ABu (16)	80	8	99	11,3	440,0[c]	3,1[c]	100 (0,2)

[a] Conversion molaire globale déterminée par gravimétrie. Masses molaires moyennes en nombre et indices de polymolécularité déterminés par CES dans le THF en utilisant une calibration conventionnelle PS[b] ou PMMA[c].

Dans le cas de l'homopolymérisation du styrène en miniémulsion, les taux de conversion obtenus sont raisonnables, vers 60 %. Quel que soit le DP_n visé, les NPs obtenues sont polydisperses et d'un diamètre bien supérieur à 100 nm. Les chromatogrammes d'exclusion stérique sont présentés FIGURE 2.2 et les valeurs des M_n expérimentales et théoriques ainsi que des I_P sont données dans le TABLEAU 2.6.

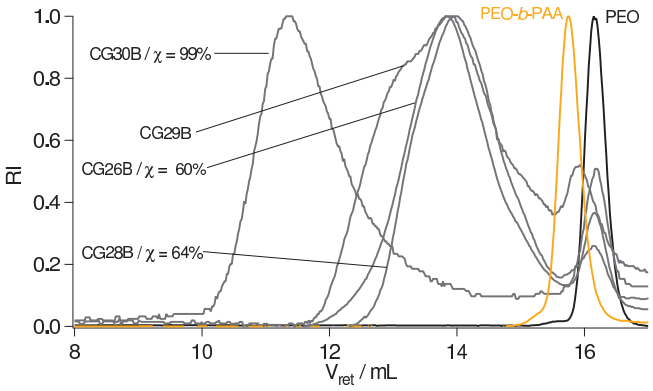


FIGURE 2.2 – Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF pour différentes polymérisations en miniémulsion en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC.

Les distributions des masses molaires sont larges et les I_P largement supérieurs à 2. Une détection UV-vis. en CES réglée au maximum d'absorption du groupement TTC (λ = 309 nm) montre que celui-ci n'est pas incorporé aux chaînes polymères. Le contrôle de la polymérisation n'est donc pas assuré.

Afin de savoir si les problèmes de contrôle de la polymérisation et de stabilité colloïdale étaient liés à l'hydrophobie du monomère, une copolymérisation du styrène avec le MMA (moins hydrophobe que le styrène) a été réalisée (TABLEAU 2.6). Néanmoins, l'agent

RAFT utilisé ne peut pas contrôler l'homopolymérisation du MMA. Dans les conditions de synthèse employées (80 mol % de S), l'ajout de MMA ne devrait en théorie pas perturber le contrôle de la polymérisation [225].

Les NPs obtenues sont plus petites que pour le styrène seul, autour de 150 nm de diamètre, et plus monodisperses. Le contrôle de la polymérisation n'est en revanche pas du tout assuré. La détection UV-vis. (λ = 309 nm) montre que le groupement TTC n'est pas incorporé aux chaînes de polymère.

Les particules obtenues avec le MMA étant plus petites qu'avec le S seul, la copolymérisation du MMA avec l'ABu (acrylate de butyle) a été testée (Tableau 2.6). Les 16 % d'ABu devraient pouvoir permettre le contrôle de la copolymérisation [225, 282]. Les particules obtenues sont encore plus petites (D = 100 nm) et monodisperses mais il n'y a aucun contrôle de la polymérisation. Encore une fois, la détection UV-vis. (λ = 309 nm) de la CES montre que le groupement TTC n'est pas incorporé aux chaînes de copolymère. La même expérience a été menée en amorçant la polymérisation par l'ACPA et les mêmes résultats ont été obtenus.

En conclusion, l'ajout d'un comonomère MMA et/ou ABu n'améliore pas le contrôle de la polymérisation. En revanche, les diamètres des NPs obtenus sont plus petits qu'avec le S seul. Les mécanismes de polymérisation doivent plutôt s'apparenter à des mécanismes d'émulsion que de miniémulsion.

Dans tous les cas d'homopolymérisation ou de copolymérisations, les gouttes de monomère aux temps initiaux mesurent entre 500 et 1000 nm de diamètre et sont polydisperses. Les systèmes ne sont donc pas stables aux temps initiaux, tout comme les systèmes précédents avec le PEO-TTC seul.

Le fait que les gouttes de monomère aux temps initiaux ne soient pas stables et qu'il n'y ait aucun contrôle de la polymérisation amène à penser que l'agent RAFT n'est pas adapté pour stabiliser les gouttes de monomère(s). Corroborant cette hypothèse, Hawkett et coll. ont étudié les propriétés tensioactives d'un macro-agent RAFT très similaire, le PAA_9-TTC-C_{12} [274]. Il s'avère que la CMC de ce dernier est de 7,9 mM ce qui est plus de 10 fois supérieur à celle du PEO-TTC-C_{12}. Le macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC devrait donc *a priori* avoir une CMC encore plus élevée.

De plus, les conditions de pH employées peuvent favoriser l'hydrolyse de l'agent RAFT [264, 283], rendant alors impossible tout contrôle de la polymérisation.

Une solution pour augmenter les propriétés tensioactives des macro-agents RAFT est d'ajouter un bloc hydrophobe type PS à leur extrémité. Ainsi, les macro-agents RAFT devraient permettre la stabilisation des gouttes de monomère(s) et le groupement TTC devrait être présent principalement en phase organique. Hawkett et coll. ont largement étudié l'utilisation de copolymères PAA-*b*-PS-TTC-C_n pour stabiliser la polymérisation

en milieu dispersé du styrène. En ajoutant seulement 5 unités styrène à un macro-agent RAFT PAA_9-TTC-C_n, la CMC évolue de 7,9 mM à 0,23 mM [274]. En utilisant divers macro-agents RAFT amphiphiles PAA_{5-20}-*b*-PS_{5-28}-TTC-C_4, les macro-agents RAFT les plus efficaces pour stabiliser les gouttes de monomère trouvés sont ceux ayant un bloc hydrophobe le plus long (PAA_5-*b*-PS_{24}-TTC-C_4) [275].

2.3.3 Synthèse des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC en milieu homogène

Les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC étant supposés trop peu tensioactifs pour pouvoir permettre à la fois la stabilisation des gouttelettes de monomère et le contrôle de la polymérisation, il paraît judicieux de leur ajouter un bloc hydrophobe à base de PS. Dans la section précédente, il a justement été vu que les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-TTC pouvaient réamorcer la polymérisation du styrène. Les nouveaux macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC ont donc été synthétisés dans les mêmes conditions, c'est à dire dans le dioxane à 80°C, en amorçant la polymérisation par l'ACPA (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 – Conditions expérimentales et caractérisations des macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X, synthétisés dans le dioxane à 80°C, amorcés par l'ACPA et à une concentration en styrène de 2,4 mol/L_{total}.

Exp.	$\frac{[RAFT]_0^a}{[ACPA]_0}$	$\frac{[S]_0^a}{[RAFT]_0}$	$DP^b_{n,\ PS}$	$M_{n,\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n,\ CES}$ kg/mol	I_P	HLB^c
CG41B	10	25	7	4,2	5,4	1,08	16
CG37B	5	100	18	5,3	6,6	1,09	10
CG32B	3	190	40	7,6	8,7	1,07	8

[a] Rapport des concentrations molaires en macro-agent RAFT et en amorceur. [b] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS dans le macro-agent RAFT amphiphile PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC. [c] balance hydrophile-lipophile pour les macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC. HLB calculée à l'aide de l'équation 2.1.

Trois macro-agents RAFT ont ainsi été synthétisés avec 3 longueurs de bloc PS différentes : 7, 18 ou 40 unités. Tous ont des indices de polymolécularité inférieurs à 1,1 et des masses molaires expérimentales assez proches des valeurs théoriques. Ces macro-agents RAFT ont donc des masses molaires bien contrôlées et peuvent être utilisés par la suite dans des polymérisations en miniémulsion.

2.3.4 Utilisation des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA$_{12}$-*b*-PS$_X$-TTC en miniémulsion

Deux des macro-agents RAFT amphiphiles triblocs synthétisés précédemment ont été engagés dans une polymérisation du styrène en miniémulsion. Ces macro-agents RAFT choisis ont respectivement 7 et 40 unités. Ils ont été retenus car ils ont les propriétés tensioactives les plus différentes (Tableau 2.7). Les conditions de polymérisation en miniémulsion sont résumées dans le Tableau 2.8.

Tableau 2.8 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène ($[S]_0/[RAFT]_0$ = 130, $[S]_0$ = 1,3 mol/L$_{eau}$), en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA$_{12}$-*b*-PS$_X$-TTC dans l'eau à pH 8 ($[OH^-]_0/[AA]_0$ = 1) à 80°C, en présence d'AIBN ($[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 2) et d'hexadécane (6 mol%), après 20h.

Exp.	$DP^a_{n,\,PS}$	τ_{sol}	χ^b_S	$M_{n,\,th}$	$M^{PS}_{n,\,CES}$	I_P	D^c_h
		%	%	kg/mol	kg/mol		nm
CG44B	7	14	77	12,4	41,4	3,35	80
CG35B	40	17	70	16,9	21,1	1,32	85

[a] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA$_{12}$-*b*-PS$_X$-TTC. [b] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie.

Les résultats des analyses de CES dans le THF des copolymères amphiphiles sont présentés dans le Tableau 2.8 et sur la Figure 2.3. Dans les deux cas, un déplacement des pics vers les plus fortes masses molaires est observé. La présence de macro-agent RAFT PEO résiduel est certainement due à la présence de PEO non fonctionnalisé par un groupement TTC. En utilisant un bloc PS de 40 unités, la distribution des masses molaires est assez étroite (I_P = 1,32) et les M_n expérimentales relativement identiques aux M_n théoriques. Ce macro-agent RAFT ne semble pas avoir subi d'hydrolyse malgré la synthèse menée à pH 8 à 80°C pendant 20h. Cela peut être expliqué par une localisation du groupement TTC dans la phase organique durant toute la polymérisation. En utilisant le macro-agent RAFT ayant un bloc PS de 7 unités, l'I_P est beaucoup plus grand (3,35) et les M_n expérimentales bien supérieures aux M_n théoriques. Le contrôle de la polymérisation n'est donc pas assuré avec ce macro-agent RAFT.

Il y a donc bien une influence de la longueur du bloc PS sur le contrôle de la polymérisation. En utilisant un macro-agent RAFT amphiphile avec un bloc hydrophobe plus long, celui-ci doit être localisé à l'interface des gouttes de monomère : le bloc PEO-*b*-PAA étant dans la phase aqueuse et le bloc PS-TTC dans la phase organique. Le macro-agent RAFT n'ayant que 7 unités ne doit pas être assez hydrophobe pour pouvoir permettre une localisation à l'interface eau/monomère. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de l'équipe de Hawkett évoqués précédemment [274].

Concernant le diamètre des NPs, il est similaire dans les deux cas (Tableau 2.8).

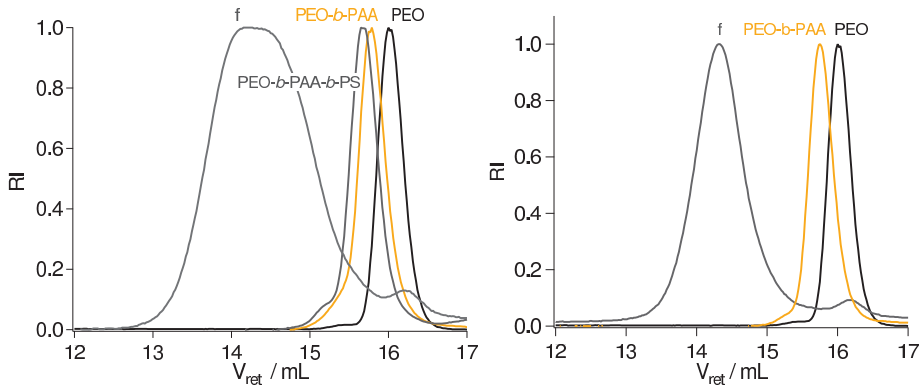


FIGURE 2.3 – Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF pour des polymérisations en miniémulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC. Gauche : PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_7-TTC. Droite : PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_{40}-TTC

En revanche, leur morphologie est totalement différente comme le montrent les clichés de MET (FIGURE 2.4). Dans le cas d'un macro-agent RAFT ayant 7 unités PS, les particules sont relativement monodisperses, sphériques et pleines. Avec un bloc PS de 40 unités, les particules semblent plus polydisperses mais surtout un grand nombre d'entre elles semblent présenter une cavité. Une piste d'exploration pour comprendre ce phénomène est de s'intéresser à la géométrie des macro-agents RAFT employés. En effet, les deux macro-agents RAFT ont la même masse molaire concernant la partie hydrophile. Mais la proportion du bloc hydrophile par rapport au bloc hydrophobe est totalement différente pour les deux macro-agents RAFT (TABLEAU 2.7). Afin de pouvoir comparer facilement les différences de caractères tensioactifs de ces macro-agents RAFT, leur balance hydrophile-lipophile (HLB) a été calculée :

$$HLB = 20 \times \frac{M_{\text{hydrophile}}}{M_{\text{totale}}} \tag{2.1}$$

où :

$M_{\text{hydrophile}}$	masse molaire du bloc hydrophile
M_{totale}	masse molaire totale

La HLB est classiquement utilisée pour les tensioactifs. Ce paramètre n'est peut être pas totalement approprié pour classer des copolymères amphiphiles mais nous l'avons choisi dans un soucis de simplicité. Une (macro-)molécule ayant une HLB inférieure à 10 est principalement lipophile, alors qu'une (macro-)molécule ayant une HLB supérieure à 10 est principalement hydrophile. Ainsi on trouve que le macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_7-TTC est principalement hydrophile, alors que le PAA_{12}-*b*-PS_{40}-TTC est principalement hydrophobe. Le premier va donc avoir tendance à former des objets sphériques, alors que le second va potentiellement pouvoir former des doubles émulsions contenant de l'eau. Nous pensons que c'est la géométrie des macro-agents RAFT qui mène à la formation des particules multi-compartimentées observées en MET.

Il est donc possible d'obtenir des particules à cœur PS et à couronne doublement hydrophile PEO-*b*-PAA. Pour cela, il faut employer des macro-agents RAFT amphiphiles

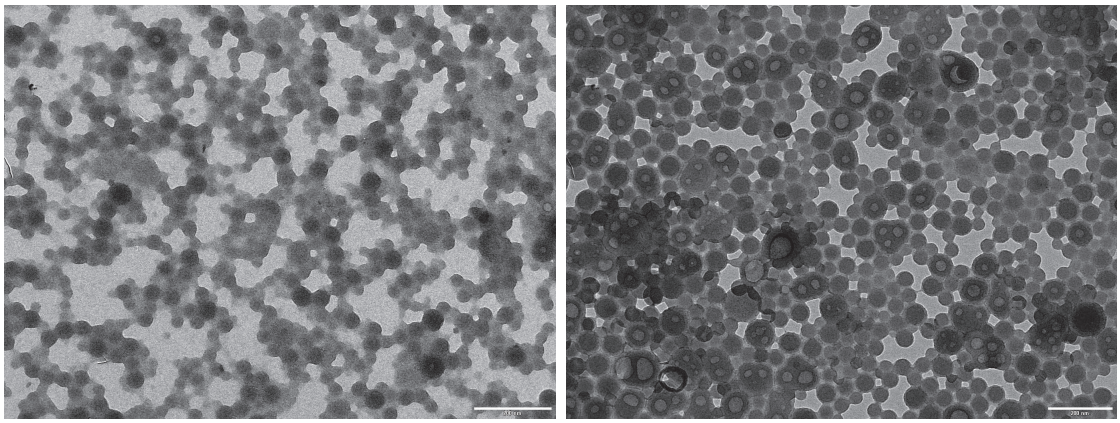


FIGURE 2.4 – Clichés de MET des particules à cœur PS obtenues par une polymérisation en miniémulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC. Gauche : PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_7-TTC. Droite : PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_{40}-TTC. Barres d'échelle : 200 nm.

PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_X-TTC ayant une longueur de bloc PS (X) judicieusement choisie : avec un long bloc PS ($X = 40$), le groupement TTC est localisé dans la phase organique permettant un bon contrôle de la polymérisation ; avec un court bloc PS ($X = 7$), les particules obtenues sont sphériques et "pleines" mais il n'y a plus de contrôle de la polymérisation. Dans la suite des travaux, il a donc été retenu de travailler avec une longueur de bloc PS intermédiaire, entre 20 et 30 unités afin de satisfaire aux critères de diamètres de particules et de contrôle de la polymérisation.

À ce titre, le BDPMA a été copolymérisé au styrène dans une polymérisation en miniémulsion en présence d'un macro-agent RAFT amphiphile PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_{18}-TTC.

Ensuite, étant donné que nous procédons à une première extension de bloc PS, puis à une seconde lors de la polymérisation en miniémulsion, nous avons envisagé de simplifier le procédé en mettant au point un procédé "one-pot" où la partie hydrophobe des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC serait synthétisée en même temps que la synthèse des NPs.

2.3.5 Effet du BODIPY

Au vu des résultats encourageants précédents, les mêmes synthèses ont été réalisées en copolymérisant 5 mol % de BDPMA (soit ≈ 20 wt %) avec du styrène, en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_{18}-TTC. Une première expérience a été menée en l'absence d'HD afin de voir si le BDPMA, ayant lui-même une très faible solubilité dans l'eau, pouvait servir d'agent ultra-hydrophobe. Les particules aux temps initiaux sont polydisperses. Le taux de conversion final en styrène est seulement de 30 % (contre 70-80% sans BDPMA) et les particules extrêmement polydisperses (D entre 40 et 1000 nm). La même expérience a donc été menée en utilisant à nouveau 5% d'hexadécane. Les mêmes résultats sont obtenus.

Afin de vérifier que le BODIPY ne perturbait pas la polymérisation, des tests de poly-

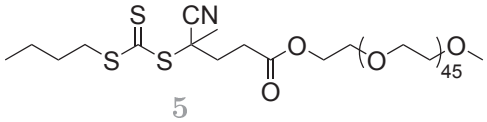
mérisation radicalaire classique en masse ou en solution dans le dioxane du méthacrylate de méthyle ont été menés en présence de 5 mol % d'un BODIPY non polymérisable (phényle en position méso). Le MMA a été choisi pour ces tests au détriment du styrène car ce dernier est connu pour se polymériser lentement. Dans les deux cas, l'évolution des conversions molaires avec le temps est identique avec ou sans BODIPY.

Afin de voir si le BODIPY pouvait intervenir dans des réactions radicalaires parasites, une expérience a été menée en polymérisant le styrène en masse en présence de 4 mol % de BODIPY non polymérisable. Une analyse par CES dans le THF en réglant la longueur d'onde d'absorption sur la longueur d'onde maximale du BODIPY, montre que le BODIPY **n'est pas** incorporé à la chaîne polymère par des réactions radicalaires.

En conclusion, le BODIPY ne perturbe apparemment pas la propagation des radicaux dans une polymérisation radicalaire. Dans le cas des polymérisations en miniémulsion, le BODIPY pourrait être un élément perturbateur dans le sens où il déstabilise les gouttelettes au début des polymérisations. Cela pourrait être dû à sa solubilité dans le styrène : en concentrant trop le BDPMA au sein des gouttes de styrène, peut être qu'une partie n'y est plus soluble et perturbe alors la stabilité colloïdale du système. En diminuant la concentration en BDPMA par la suite, les effets devraient être estompés.

2.4 Synthèse de particules à cœur PMMA et à couronne PEO-*b*-PAMA

En parallèle de la synthèse de particules à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA, nous avons voulu développer le même système mais avec des particules à cœur PMMA et à couronne PEO-*b*-PAMA (AMA : acide méthacrylique). Le contrôle de l'homopolymérisation des méthacrylates avec l'agent RAFT PEO-TTC utilisé jusqu'ici n'est pas possible. Un macro-agent RAFT similaire et plus "universel" a été développé par l'équipe de Lansalot et coll., à partir de l'agent RAFT moléculaire **4** [271]. En utilisant un macro-agent RAFT (PEO-CN-TTC **5**, Figure 2.5) similaire au PEO-TTC, nous voulions transposer la synthèse des particules à cœur polystyrène que nous avons mise au point à des systèmes à base de polyméthacrylates.



5

Figure 2.5 – Structure du macro-agent RAFT PEO-CN-TTC.

Dans un premier temps, un macro-agent RAFT PEO-*b*-PAMA-TTC a été synthétisé à partir du macro-agent RAFT PEO-CN-TTC (Tableau 2.9). En réalisant cette extension dans le dioxane à 70°C, il n'y a aucun contrôle de la polymérisation. De plus, la

solution obtenue est hétérogène. Le même résultat est obtenu en partant de l'agent RAFT moléculaire CN-TTC **4**. Ces mauvais contrôles de la polymérisation ont été attribués à une mauvaise solubilité de l'agent RAFT dans ce solvant. Les mêmes polymérisations ont alors été réalisées dans le DMSO à 70°C. Cette fois-ci le système est homogène et le contrôle de la polymérisation est très bon (I_P = 1,16).

TABLEAU 2.9 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations de l'AMA ([AMA] = 2 mol/L_{total}) en présence de macro-agent RAFT PEO-PAMA-CN-TTC, amorcées par l'ACPA ($[RAFT]_0/[ACPA]_0$ = 10), à 70°C, dans différents solvants, après 20h.

Exp	RAFT[a]	solvant	$\frac{[AMA]_0}{[RAFT]_0}$	χ^b_{AMA} %	$M_{n\,th}$ kg/mol	$M^{MMAc}_{n\,CES}$ kg/mol	I^c_P
CG66B	PEO-CN-TTC	dioxane	190	36	8,1	7,4	1,35[d]
CG69B	CN-TTC	dioxane	60	83	4,4	2,1	1,18[d]
CG67B	PEO-CN-TTC	DMSO	210	88	18,7	18,6	1,16
CG71B	CN-TTC	DMSO	70	90	5,7	8,0	1,15

[a] (macro-)agent RAFT utilisé. [b] Conversion en AMA déterminée par gravimétrie. [c] Masse molaire moyenne en nombre et indice de polymolécularité déterminés par CES en utilisant une calibration conventionnelle PMMA. [d] Distribution bimodale des masses molaires.

Comme pour les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC, la cinétique de polymérisation des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAMA-CN-TTC a alors été réalisée. Puis un macro-agent RAFT PEO-*b*-$PAMA_7$-CN-TTC a pu être obtenu.

Afin de rendre amphiphiles ces macro-agent RAFT, un bloc hydrophobe à base de PMMA a été ajouté. La synthèse est réalisée dans le DMSO à 70°C. Malheureusement, le réamorçage est mauvais et il reste beaucoup de macro-agent RAFT PEO-*b*-$PAMA_7$-CN-TTC non converti (I_P = 1,58). Les copolymères amphiphiphiles PEO-*b*-$PAMA_7$-*b*-$PMMA_{28}$-CN-TTC ont tout de même été testés dans une polymérisation en miniémulsion du MMA. Lors de l'ajout d'eau à pH > 8 et malgré les ultra-sons, les copolymères ne se dissolvent pas dans l'eau. Il est possible que cela provienne de fortes liaisons hydrogène établies entre les unités AMA et EO [219, 284]. Le copolymère PEO-*b*-$PAMA_7$-*b*-$PMMA_{28}$-CN-TTC a alors été modifié pour qu'il soit sous forme carboxylate avant l'ajout d'eau basique. Cela est réalisé en le traitant par de l'hydrure de sodium dans le THF. Une poudre est obtenue, contrairement à la pâte précédente. Cette fois-ci le copolymère se dissous un peu mieux dans l'eau en présence de MMA. Le milieu est soniqué et la polymérisation en miniémulsion démarrée. Après 20h, la conversion en MMA est de 65 % et les particules mesurent environ 160 nm de diamètre. Une analyse par CES dans le THF montre qu'il y a effectivement un déplacement des pics vers les plus fortes masses molaires mais qu'il reste du macro-agent RAFT de départ.

Ces expériences en présence de macro-agent RAFT PEO-CN-TTC étant peu encourageantes par rapport au système à base de macro-agents RAFT PEO-TTC, elles ont été

abandonnées.

2.5 Mise au point et optimisation d'un procédé "one-pot" pour la synthèse de NPs à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA

Nous avons montré que pour obtenir des NPs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur hydrophobe, il faut utiliser des macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA-*b*-PS-TTC. Afin de simplifier la synthèse et diminuer le nombre d'étapes à réaliser, un procédé "one-pot" a été développé. Dans un premier temps, il s'agit de polymériser le styrène en masse en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC et d'arrêter la polymérisation lorsque le nombre nécessaire d'unités styrène est atteint pour produire un macro-agent RAFT amphiphile permettant la stabilisation des gouttelettes de styrène (DP_n d'environ 20-30 pour le bloc styrène). Le milieu est alors constitué de macro-agent RAFT amphiphile PEO-*b*-PAA-*b*-PS_{20-30}-TTC et de monomère styrène n'ayant pas réagi. Une inversion de phase est alors réalisée en ajoutant de l'eau basique. Ainsi, des gouttes de monomère styrène résiduel stabilisées par les macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA-*b*-PS_{20-30}-TTC sont formées. Plusieurs paramètres ont alors été ajustés, à savoir : nécessité ou non d'ultra-sons afin d'homogénéiser le système et présence ou non d'HD. Les résultats suivants peuvent paraître incomplets mais il s'agissait surtout de faire des tests préliminaires afin de choisir le meilleur système.

2.5.1 Polymérisation en masse du PS en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC

Afin de connaître le temps nécessaire à la formation de copolymères amphiphiles PEO-*b*-PAA-*b*-PS_{20-30}-TTC, un suivi cinétique de la polymérisation du styrène en masse a été réalisé (Figure 2.6) dans les conditions du Tableau 2.10. Ces conditions ont été choisies car ce seront les mêmes qui seront utilisées lors de la synthèse des NPs.

Tableau 2.10 – Conditions expérimentales de la polymérisation en masse du styrène en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC, amorcée par l'AIBN à 80°C et en présence de 5 mol% d'HD (par rapport au styrène).

Exp.	$[S]_0$ mol/L_S^b	$[RAFT]_0^a$ mol/L_S^b	$[AIBN]_0$ mol/L_S^b	$[styrène]_0^a/[RAFT]_0$	$[RAFT]_0^a/[AIBN]_0$
CG102B	8,75	$5{,}5.10^{-2}$	$1{,}6.10^{-2}$	160	3

[a] Macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC. [b] Concentration en mole par litre de styrène.

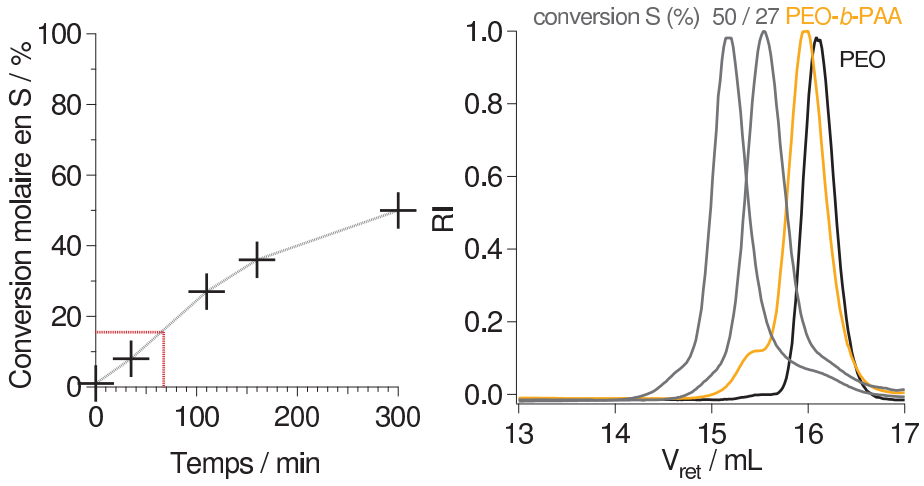


FIGURE 2.6 – Polymérisation en masse du styrène en présence de PEO-*b*-PAA-TTC. Gauche : évolution de la conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie en fonction du temps. Droite : chromatogrammes d'exclusion stérique enregistrés dans le THF pour deux conversions en styrène et pour les macro-agents RAFT de départ PEO-*b*-PAA-TTC et PEO-TTC.

La polymérisation est arrêtée après 5h. Une très forte viscosité du milieu est observée. Au regard de la cinétique FIGURE 2.6, en visant un DP_n du bloc PS de 160, il faut arrêter la polymérisation entre 15 et 20% pour obtenir un bloc PS de 20-30 unités. De tels taux de conversion sont obtenus lorsque la réaction est arrêtée entre 60 et 70 min (pointillés rouges, FIGURE 2.6). Toutes les polymérisations en miniémulsion "one-pot" de systèmes PEO-*b*-PAA-TTC seront donc réalisées en arrêtant la polymérisation en masse entre 60 et 70 min.

2.5.2 Inversion de phase sans ultra-sons

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si l'inversion de phase pouvait être réalisée sans ultra-sons, c'est à dire si le système constitué de styrène, de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-*b*-PS-TTC et d'eau basique pouvait lui-même s'organiser sous forme de gouttelettes auto-stabilisées. Comme indiqué précédemment, toutes les expériences sont arrêtées après 60 min de polymérisation en masse du styrène (15-20% de conversion). Les paramètres constants sont résumés dans le TABLEAU 2.11 et les différents tests faits sont résumés dans le TABLEAU 2.12.

Pour un rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ visé de 140-150, l'eau a été ajoutée à température ambiante ou à 80°C, tout en agitant le système (tests **A** et **B**). Dans les deux cas, suite à l'addition d'eau, le système n'est pas du tout homogène (présence de grumeaux). Les polymérisations sont tout de même démarrées et poursuivies durant une nuit. Le lendemain, les agrégats ont disparu mais la distribution en taille des NPs n'est pas homogène. De plus, le contrôle de la polymérisation n'est pas assuré ($I_P \approx 2$).

Afin d'obtenir un système moins visqueux lors de l'inversion de phase, la quantité de styrène a été augmentée par rapport à la quantité de macro-agent RAFT (test **C**).

Tableau 2.11 – Paramètres constants utilisés lors des polymérisations en miniémulsion du styrène à 80°C, évoquées dans le §2.5.

$[RAFT]_0^a/[AIBN]_0$	$[OH^-]/[AA]^b$	pH	τ_{sol} / %	T / °C
3	1	7-8	9-15[c]	80

[a] Macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{11}-TTC. [b] Rapport molaire entre le nombre d'unités acide acrylique portées par le macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA_{11}-TTC et les ions hydroxydes ajoutés dans le milieu réactionnel. [c] Le taux de solide varie légèrement d'une expérience à l'autre lorsque le DP_n du bloc PS varie, mais sera considéré comme constant.

Tableau 2.12 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène (conditions du Tableau 2.11) avec inversion de phase, sans utilisation d'US, arrêtées après 20h.

Exp	Test	$[S]_0/[RAFT]_0$	$[S]_0$ mol/L_{eau}	HD wt%[b]	US	T^a_{eau}	I_P	$D_{h,\ f}$ nm
CG107B	**A**	150	0,8	5	-	TA	2,3[c]	110[d]
CG108B	**B**	140	0,8	5	-	80	1,8[c]	130[d]
CG110B	**C**	200	0,8	5	-	TA	1,4[c]	190[d]
CG112B	**D**	560	2,4	5	-	TA[e]	n.a.[f]	n.a.[f]
CG113B	**E**	150	0,8	5	-	TA[e]	2,1[c]	190[d]

[a] Température du milieu réactionnel lorsque l'eau est ajoutée. [b] Pourcentage massique en HD par rapport au styrène. [c] Distribution bimodale des masses molaires observées en CES dans le THF. [d] Distributions des diamètres des particules au temps final polydisperses. [e] L'eau est ajoutée lentement dans le milieu réactionnel, tout en agitant à l'aide du barreau magnétique. [f] Non analysé.

L'eau est ajoutée à température ambiante. Le système se comporte de la même manière que lors des tests **A** et **B**, que ce soit avant ou après la polymérisation. Le système semble hétérogène à l'œil nu. Il a été analysé par MET (Figure 2.7). Il s'avère que ce dernier est constitué d'un mélange de filaments et d'objets sphériques hétérogènes. De tels objets ont été observés lors de polymérisations en émulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT à base d'acide acrylique et d'acrylate de PEO [219, 285] ou à base d'acide méthacrylique et de méthacrylate de PEO [286]. Ces morphologies surprenantes sont attribuées à la fusion de particules entre elles durant la polymérisation. Elles sont fortement dépendantes de la nature des sels utilisés dans la phase aqueuse, du pH et du caractère amphiphile des copolymères formés.

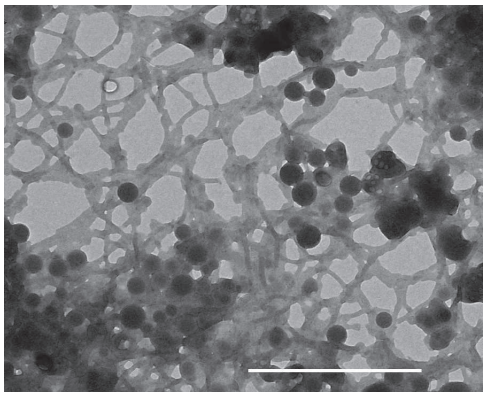


Figure 2.7 – Clichés de MET des particules à cœur PS de l'expérience **C**. Barre d'échelle : 1 μm.

Le système a été poussé à l'extrême en augmentant le rapport initial $[S]_0/[RAFT]_0$ jusqu'à 560 (test **D**). Dans ce cas, une émulsion inverse est formée. La polymérisation n'a donc pas été démarrée.

Enfin, dans le cas du test **E**, le styrène a été ajouté en deux étapes : une première quantité a été utilisée pour la polymérisation en masse ($DP_n = 50$) puis une seconde (à l'issue de cette polymérisation en masse) a été ajoutée afin d'obtenir un DP_n total de 150 unités. Là encore, les mêmes observations que pour les tests **A** et **B** sont faites.

Il ne semble donc pas possible de pouvoir réaliser la synthèse des NPs à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA sans utiliser d'ultra-sons.

2.5.3 Inversion de phase avec ultra-sons

Afin de vérifier que l'utilisation d'ultra-sons était réellement nécessaire, la synthèse **G** a été réalisée en présence d'ultra-sons (Tableau 2.13) dans les conditions de Tableau 2.11

À l'issue de la polymérisation en masse, l'eau est ajoutée d'un coup puis le milieu réactionnel agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant environ 30 min. La moitié de la dispersion est prélevée et soniquée pendant 10 min (**G**), alors que l'autre moitié est

laissée sous agitation magnétique (**F**). Puis, les deux dispersions **F** et **G** sont chauffées à 80°C afin de procéder à la polymérisation en miniémulsion.

TABLEAU 2.13 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène réalisées en l'absence ou en présence d'US, dans les conditions du TABLEAU 2.11, après 20h.

Exp.	Test	$[S]_0/[RAFT]_0$	$[S]_0$ mol/L_{eau}	HD wt %[b]	US	$D^a_{h,\ 0}$ nm	$D^a_{h,\ f}$ nm	I_P
CG114B	**F**	130	1,2	5	-	340[c]	100[c]	1,52[d,e]
CG114B	**G**	130	1,2	5	√	160[c]	70	1,31[e]

[a] Respectivement diamètres hydrodynamiques des gouttes de monomère après ajout d'eau et émulsification et des particules de PS aux temps finaux. [b] Pourcentage massique en HD par rapport au styrène. [c] Distribution large des diamètres de particules. [d] Distribution bimodale des masses molaires déterminées par CES dans le THF. [e] I_P calculés sans tenir compte du PEO résiduel.

Les résultats sont présentés dans le TABLEAU 2.13. Les particules au temps initial sont plus petites dans le cas où les ultra-sons ont été utilisés. De même, au temps final, dans le cas d'utilisation des ultra-sons, les particules obtenues sont plus petites et monodisperses. Ces observations sont confirmées par les clichés de MET (FIGURE 2.8).

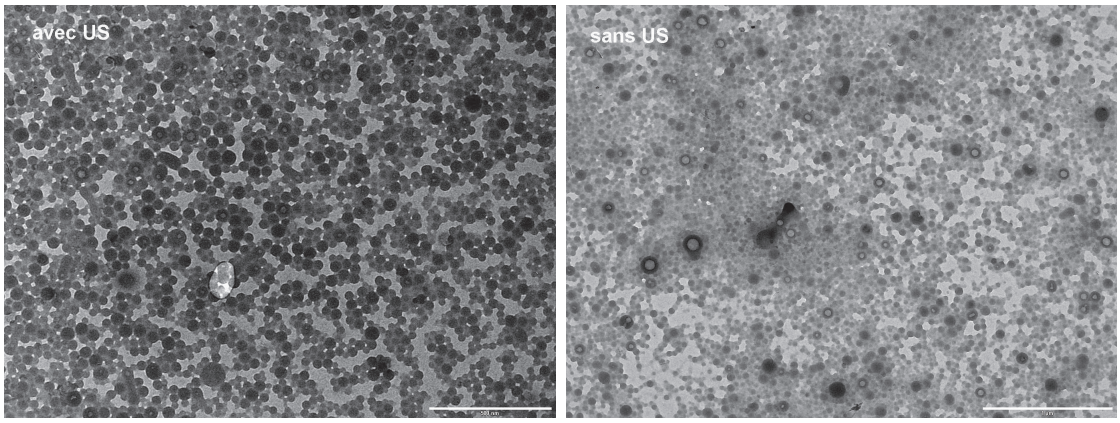


FIGURE 2.8 – Clichés de MET des polymérisations en miniémulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{11}-TTC, avec (gauche) ou sans (droite) ultra-sons. Barres d'échelle : gauche : 1 μm, droite : 500 nm.

De plus, le contrôle de la polymérisation est meilleur dans le cas où les ultra-sons sont utilisés (TABLEAU 2.13, FIGURE 2.9). La présence de macro-agent RAFT PEO résiduel est certainement due à la présence de PEO non fonctionnalisé par un groupement TTC.

D'un point de vue homogénéité des diamètres hydrodynamiques des NPs et contrôle de la polymérisation, il ne semble pas envisageable de pouvoir s'affranchir des ultra-sons.

La même expérience a été menée en utilisant 2 mol % de BDPMA. Les conditions expérimentales employées sont les mêmes que dans le TABLEAU 2.11.

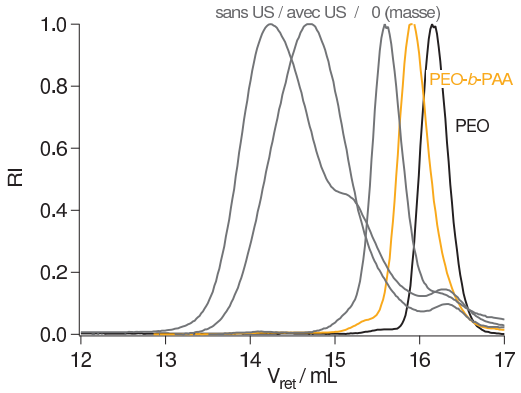


FIGURE 2.9 – Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF pour les polymères issus des polymérisations en miniémulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{11}-TTC, avec ou sans ultra-sons. Le temps 0 correspond à la fin de la polymérisation en masse.

TABLEAU 2.14 – Conditions et résultats expérimentaux des copolymérisations en miniémulsion du styrène avec 2 mol % de BDPMA, réalisées en l'absence ou en présence d'US, dans les conditions du TABLEAU 2.11, après 20h.

Exp.	Exp.	$[M]_0/[RAFT]_0^a$	$[S]_0$	HD wt%^{c}	US	$D_{h,\,0}^b$ nm	$D_{h,\,f}^b$ nm	I_P
CG115B	**F/BDPMA**	130	1,2	5	-	190^d	300^e	1,77
CG115B	**G/BDPMA**	130	1,2	5	√	210^d	110^d	2,01

[a] M correspond aux monomères styrène et BDPMA. [b] Respectivement diamètres hydrodynamiques des gouttes de monomère après ajout d'eau et émulsification et des particules de PS aux temps finaux. [c] Pourcentage massique en HD par rapport au styrène. [d] Distribution polydisperse des diamètres de particules. [e] Une seconde population d'objets mesurant environ 1 μm est observée.

Les résultats expérimentaux sont résumés dans le Tableau 2.14. D'un point de vue diamètres des gouttes aux temps initiaux, les résultats sont sensiblement les mêmes que lors des tests **F** et **G**. Comparée aux résultats précédents, le diamètre des particules est plus élevé lorsque du BODIPY est utilisé. Les copolymères ont été analysés en CES dans le THF en utilisant la détection UV-vis. réglée sur la longueur d'onde maximale d'absorption du monomère fluorescent (λ = 528 nm) (Figure 2.10). Il est possible de déterminer la conversion en BDPMA en comparant le signal correspondant au monomère libre à celui du monomère polymérisé (équation 7.2). À l'issue de la polymérisation en masse, la conversion molaire en BDPMA est de 40 %. À la fin de la polymérisation en miniémulsion elle est de 97 % dans les deux cas, avec ou sans ultra-sons. Le BDPMA se polymérise donc bien dans ces conditions. Mais, dans les deux cas, la distribution des masses molaires n'est pas étroite et les chromatogrammes sont polymodaux (RI, UV).

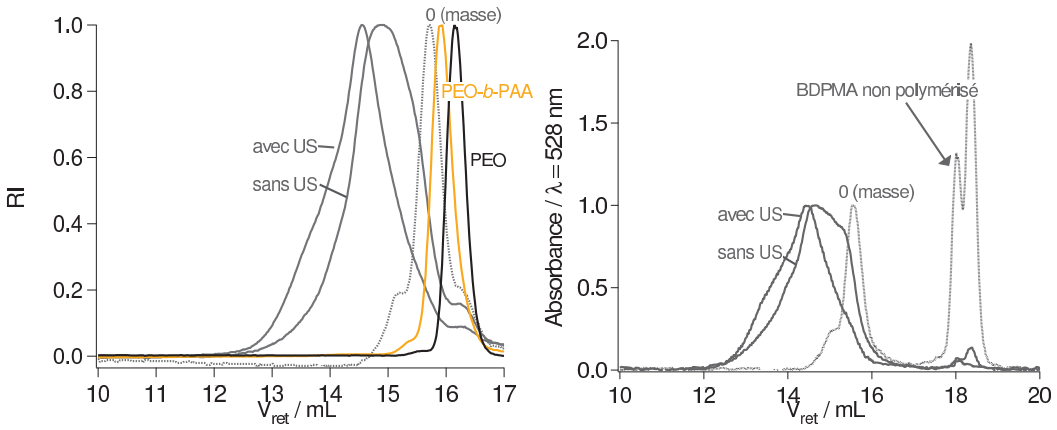


Figure 2.10 – Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF des polymérisations en miniémulsion du styrène en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA_{11}-TTC, avec ou sans ultra-sons (tests **F/BDPMA** et **G/BDPMA**). Gauche : détection RI. Droite : détection UV-vis. (λ = 528 nm).

En conclusion, que ce soit avec ou sans BDPMA, l'utilisation d'ultra-sons est nécessaire à l'obtention de NPs d'une taille minimale.

2.5.4 Effet de l'hexadécane

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que des polymères hydrophobes pouvaient eux-mêmes servir d'agents ultra-hydrophobes. La polymérisation en miniémulsion des NPs a donc été testée avec ou sans HD dans les mêmes conditions que dans le Tableau 2.11. Les résultats sont résumés dans le Tableau 2.15.

Que ce soit en terme de diamètre des NPs ou en terme de contrôle de la polymérisation, aucune différence n'est observée aux temps finaux lorsque l'HD n'est pas employé. En revanche, au temps initial les gouttes sont plus petites en l'absence d'HD. L'HD peut

Tableau 2.15 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène réalisées en présence ou en l'absence d'HD, dans les conditions du Tableau 2.11, après 20h.

Exp.	Test	$[S]_0/[RAFT]_0$	$[S]_0$ mol/L_{eau}	HD wt %[c]	US	$D^a_{h,\,0}$ nm	$D^a_{h,\,f}$ nm	I^b_P
CG114B	**G**	130	1,3	5	√	160	70	1,31
CG166B	**H**	180	1,3	0	√	85	70	1,27

[a] Respectivement diamètres hydrodynamiques des gouttes de monomère après ajout d'eau et émulsification et des particules de PS aux temps finaux. [b] I_P calculés sans tenir compte du PEO résiduel. [c] Pourcentage massique en HD par rapport au styrène.

faire gonfler les gouttelettes de styrène, cela peut peut-être expliquer cette différence de diamètre.

Par la suite, l'HD sera donc supprimé des formulations de synthèse de NPs. C'est un grand avantage comparativement aux systèmes utilisés généralement dans la littérature car l'HD peut être gênant pour d'éventuelles applications en biologie.

2.5.5 Optimisation du procédé "one-pot"

Au vu des résultats précédents, des conditions nous semblant optimales ont été trouvées pour la synthèse de particules à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur PS :

- un rapport $[M]_0/[RAFT]_0 = 160$ et une concentration en monomère(s) de 1,2 mol/L_{eau} environ ;
- polymérisation en masse du styrène pendant 60-70 min (soit ≈ 20 % de conversion en styrène) afin d'obtenir un macro-agent RAFT amphiphile PEO-*b*-PAA-*b*-PS_{20-30}-TTC
- aucune utilisation d'agent ultra-hydrophobe comme l'hexadécane ;
- ajout d'eau basique puis sonication pendant 10 min ;

Il reste néanmoins quelques paramètres à optimiser comme le pH de la phase aqueuse de la synthèse, la longueur du bloc PAA et la présence ou non d'agent réticulant.

Influence du pH

Le pH est un paramètre extrêmement important dans la mesure où les macro-agents RAFT sont constitués de PAA (polyélectrolyte) et de PEO. Trois pH différents ont donc été testés :

- neutralisation par de la soude en se plaçant à équivalence entre les unités AA et les ions hydroxydes (pH = 7,8),
- basification du système en ajoutant un excès de soude (pH > 12),

– neutralisation par un tampon phosphate (PBS 1×[2])

Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.16. À pH 7,8 ou 12, le contrôle de la polymérisation est sensiblement le même. Des particules sphériques sont observées dans les deux cas (Figure 2.11). En revanche, le diamètre des particules obtenues est plus petit à pH 12 (Tableau 2.16). Ballauff et coll. ont étudié la physico-chimie de systèmes semblables constitués d'un cœur PS et d'une couronne polyélectrolyte de PAA [287]. Ils ont trouvé que le pH devait être supérieur à 8 afin que toutes les unités acide acrylique soient déprotonées. La légère différence de diamètres obtenue entre les deux synthèses à pH = 7,8 et à pH > 12 est donc certainement due à cet effet, ajoutant une meilleure stabilité aux particules par répulsion électrostatique.

Enfin, le fait qu'aucune hydrolyse de l'agent RAFT ne soit observée même à ces pH très basiques confirme encore une fois sa présence à l'intérieur des gouttes, grâce à son bloc PS.

Tableau 2.16 – Effet du pH et des sels sur la polymérisation en miniémulsion du styrène par le système optimisé "one-pot" ($[S]_0$ = 1,2 mol/L_{eau}, $[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 3). Polymérisations arrêtées après 20h.

Exp.	$\frac{[S]_0}{[RAFT]_0}$	Base	$\frac{[OH^-]^a}{[AA]}$	pH_f^b	χ_S^c %	$M_{n,\,th}$ g/mol	$M_{n,\,CES}^{PS}$ g/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG166B	180	NaOH	1	7,8	77	17,6	21,5	1,27	70 (0,13)
CG136B	160	NaOH	1,3	>12	86	18,2	18,6	1,32	60 (0,08)
CG167B	140	PBS 1×	-	5,2	89	16,8	18,7	1,46[d]	poly

[a] Rapport molaire des concentrations en ions hydroxydes et en acide acrylique porté par les macro-agents RAFT. [b] pH mesuré à la fin de la polymérisation en miniémulsion. [c] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie. [d] Distribution bimodale des masses molaires observées en CES dans le THF.

Le milieu réactionnel a également été neutralisé par du PBS 1× car ce tampon est couramment utilisé en biologie. Dans ce cas, le pouvoir tampon du PBS n'est pas suffisant car le pH en fin de polymérisation est inférieur à 6. La distribution en taille des NPs est très hétérogène et cela a été confirmé par des clichés de MET (Figure 2.11). Le système est constitué d'objets très hétérogènes (filaments, objets membranaires, sphères) ce qui est certainement dû aux conditions de la synthèse réalisées en milieux acides et en présence de sels [219, 285, 288]. Des concentrations en PBS plus élevées n'ont pas été testées à cause de la forte concentration en sels dans ce dernier.

Le pH optimal pour l'obtention de petites NPs monodisperses est celui pour lequel toutes les unités acide acrylique des macro-agents RAFT sont déprotonées, c'est à dire à pH > 8. Dans la suite, afin de s'assurer que le pH soit toujours supérieur à 8, nous

2. PBS 1× : [NaCl] = 137 mM, [KCl] = 2,7 mM, [Na_2HPO_4] = 10 mM, [KH_2PO_4] = 1,76 mM

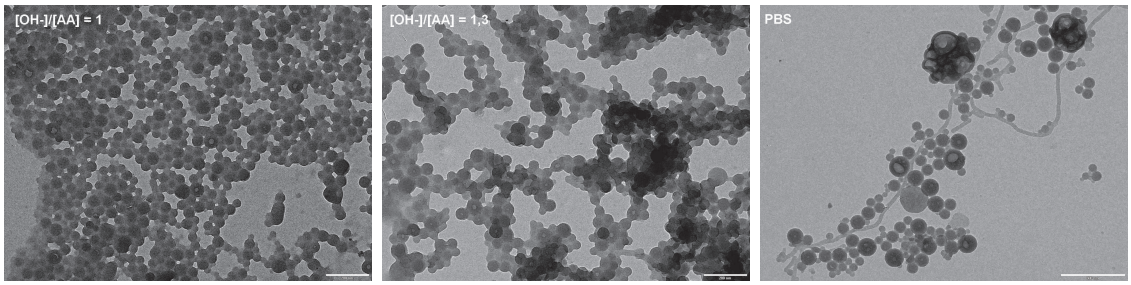


FIGURE 2.11 – Clichés de MET des NPs synthétisées par une polymérisation en miniémulsion "one-pot" à différents pH/sels. De gauche à droite, conditions et barres d'échelle entre parenthèses : $[OH^-]_0/[AA]_0 = 1$ (200 nm), $[OH^-]_0/[AA]_0 = 1{,}3$ (200 nm), PBS (1 μm).

utiliserons toujours la soude en excès (1,3 fois).

Influence de la masse molaire du bloc PAA

Différents macro-agents RAFT ayant une longueur de bloc PAA allant de 7 à 19 unités ont été synthétisés. Toutes les NPs obtenues en présence de ces macro-agents RAFT présentent les mêmes caractéristiques en terme de taille et de contrôle de la polymérisation. Dans la suite, les macro-agents RAFT notés PEO-*b*-PAA-TTC auront systématiquement entre 7 et 19 unités AA.

Réticulation par du divinylbenzène

Enfin, la réticulation du cœur des NPs par du divinylbenzène (DVB) a été testée. Ce dernier ne pouvant pas être incorporé au mélange réactionnel lors de la polymérisation en masse, il a été ajouté à la fin de la polymérisation en masse et dispersé de manière homogène, avant l'ajout d'eau basique.

TABLEAU 2.17 – Conditions et résultats expérimentaux de la polymérisation en miniémulsion "one-pot" ($[M]_0$ = 1,2 mol/L_{eau}, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$) réalisée en présence de DVB, arrêtée après 20h.

Exp.	$[S]_0/[RAFT]_0$	DVB mol %	χ_0^a %	χ_f^b %	D_z (σ) nm
CG148B	160	3	17	83	80 (0,12)

[a] Conversion molaire en S uniquement à la fin de la polymérisation en masse, déterminée par gravimétrie. [b] Conversion molaire globale en S et DVB après 20h.

Il n'a pas été possible d'analyser ce copolymère par CES en raison de la réticulation des chaînes entre elles. Concernant le diamètre des NPs, la DDL indique des diamètres légèrement supérieurs au cas sans DVB (D = 80 nm contre 60 nm, TABLEAU 2.17). La distribution en taille de NPs est également plus large. Ces changements de diamètres sont confirmés par des clichés de MET (FIGURE 2.12). Les particules sont effectivement

plus grosses et polydisperses lorsque le DVB est présent. De plus, les particules ont des morphologies différentes, certaines sont creuses.

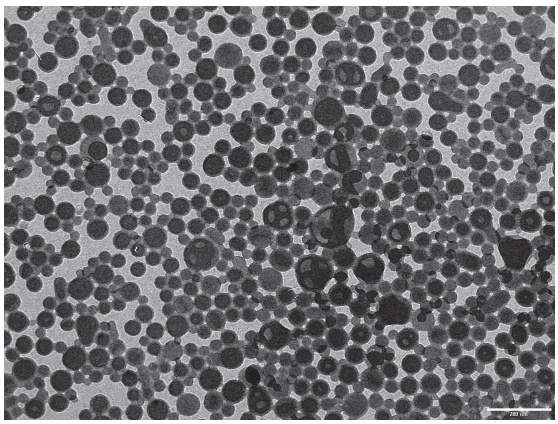


FIGURE 2.12 – Cliché de MET des NPs synthétisées par une polymérisation en miniémulsion "one-pot" en présence de DVB. Barre d'échelle : 200 nm.

L'emploi d'agent réticulant n'étant pas satisfaisant, les NPs ne seront donc jamais réticulées par la suite.

2.6 Polymérisation contrôlée en procédé "one-pot" optimisé

D'après toutes les études précédentes, des conditions paraissant optimales pour l'obtention de NPs à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA ont été choisies. Elles sont résumées dans le TABLEAU 2.18. Par la suite, ce seront toujours ces conditions qui seront employées, que les synthèses soient réalisées avec ou sans BODIPY.

TABLEAU 2.18 – Conditions expérimentales optimisées pour la synthèse des NPs en présence de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC par le procédé "one-pot" réalisé à 80°C.

T	$[M]_0^a$	$\frac{[M]_0}{[RAFT]_0^b}$	τ_{sol}	$\frac{[RAFT]_0^b}{[AIBN]_0}$	$[OH^-]/[AA]^c$	t_{US}^d	HD^e	t_{masse}^f
°C	mol/L_{eau}		%			min	wt %	min
80	1,2	160	≈ 14	3	1,3	10	0	60-70

[a] M correspond au(x) monomère(s) S (et BODIPY). [b] Macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC. [c] Rapport des concentrations molaires en ions hydroxydes ajoutés et en unités acides acrylique contenues dans les macro-agents RAFT. [d] Durée d'utilisation des ultra-sons. [e] Pourcentage massique en HD par rapport au styrène. [f] Durée de la polymérisation en masse.

Un suivi cinétique de réaction a été réalisé afin de vérifier le contrôle de la polymérisation (FIGURE 2.13). La polymérisation est rapide et le styrène atteint quasiment 80 % de conversion en 2h30, mais ne dépasse pas 86 % de conversion.

Les chromatogrammes d'exclusion stérique montrent un déplacement des pics vers les plus fortes masses molaires durant la polymérisation (FIGURE 2.13). L'évolution des M_n expérimentales est linéaire avec la conversion et suit la droite théorique. De plus, les I_P sont toujours inférieurs à 1,3 durant la polymérisation. La polymérisation est donc bien contrôlée.

Les NPs obtenues sont petites (D_h = 60 nm) et monodisperses TABLEAU 2.19.

TABLEAU 2.19 – Résultats expérimentaux de la polymérisation en miniémulsion "one-pot" réalisée dans les conditions optimisées du TABLEAU 2.18.

Exp.	t min	χ_S^a %	$M_{n,\,th}$ kg/mol	$M_{n,\,CES}^{PS}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG136B	290	86	18,2	18,6	1,32	60 (0,08)

[a] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie.

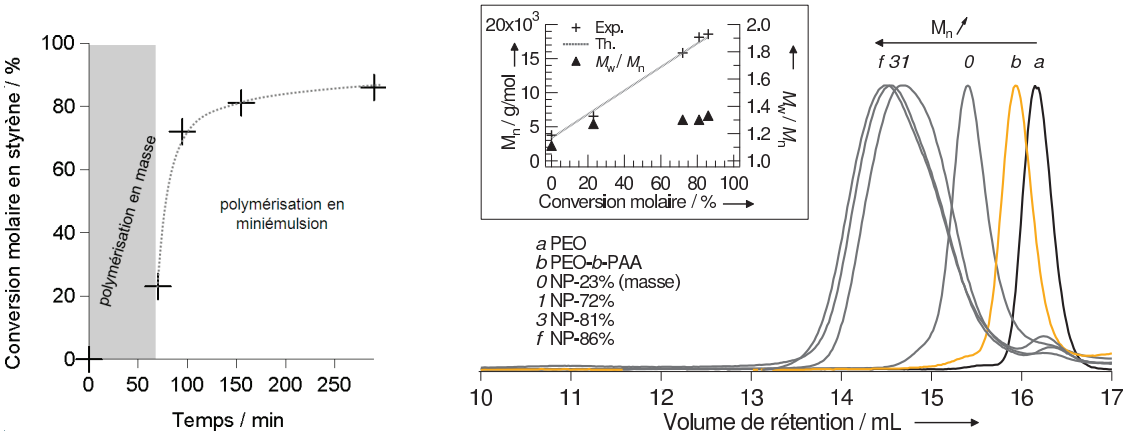


FIGURE 2.13 – Suivi de la polymérisation en miniémulsion du styrène dans les conditions optimisées "one-pot" (TABLEAU 2.18). Gauche : évolution de la conversion molaire en styrène (déterminée par gravimétrie) en fonction du temps. Droite : chromatogrammes d'exclusion stérique à différentes conversions en styrène. Insertion, évolution des masses molaires moyennes en nombre (+) et des indices de polymolécularité (▲) avec la conversion molaire.

Le procédé "one-pot" développé permet ainsi d'obtenir des NPs monodisperses par une polymérisation RAFT contrôlée en miniémulsion.

2.6.1 Problème des conversions molaires du styrène déterminées par gravimétrie

Les conversions en styrène déterminées par gravimétrie ne dépassant jamais 75 à 85%, une analyse plus complète des cinétiques de polymérisation a été effectuée. En effet, bien que rapide et simple à réaliser, la conversion déterminée par gravimétrie ne tient pas compte d'une éventuelle perte par évaporation des monomères volatiles comme le styrène.

Étant donné que le système est soniqué pendant 10 min, il est possible qu'une partie du styrène soit évaporée durant cette étape.

Afin de déterminer la quantité de styrène réellement présente dans le système, des analyses par RMN ^{1}H ont été faites. Les nanoparticules ne peuvent pas être analysées telles quelles dans le D_2O car le S et le PS n'y sont pas solubles. Elles ne peuvent pas non plus être séchées puis redispersées dans un solvant organique puisqu'alors le styrène serait évaporé. Il faut donc les dissoudre dans un bon solvant de toute la chaîne polymère juste après un prélèvement. Le $CDCl_3$ est un bon solvant des copolymères mais le PAA n'y est soluble que sous sa forme protonée. Or, la synthèse est réalisée en milieu basique. Le problème a été contourné en réalisant une extraction des copolymères en phase aqueuse acidifiée (les particules précipitent) par la phase organique $CDCl_3$. Ainsi, l'intégralité de la chaîne de copolymère et le styrène sont visibles par RMN du ^{1}H.

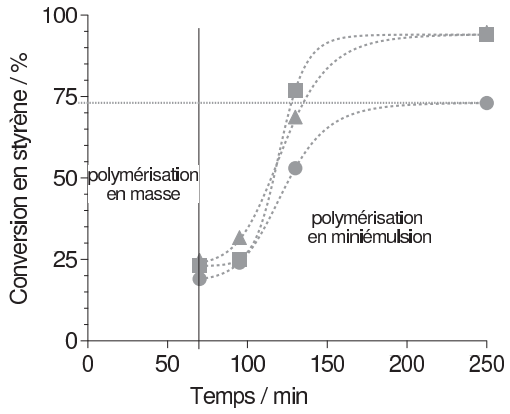


FIGURE 2.14 – Suivi de la polymérisation en miniémulsion du styrène dans les conditions optimisées "one-pot" (TABLEAU 2.18). Évolution des conversions molaires en styrène déterminées par gravimétrie (●), RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ (■) et par gravimétrie corrigée de 25 % de perte en styrène (▲) en fonction de la conversion.

Pour une cinétique similaire à celle présentée FIGURE 2.13, différents prélèvements ont été réalisés et analysés par RMN ^{1}H et par gravimétrie (FIGURE 2.14). Au temps final, la gravimétrie indique 74 % de conversion en styrène alors que la RMN montre 6 % de styrène non polymérisé (intégrale des protons vinyliques comparée à l'intégrale des protons aromatiques). Une partie du styrène s'est donc bien évaporée. La même observation est faite sur toute la cinétique de polymérisation. Les conversions déterminées par gravimétrie mais corrigées d'une perte en styrène de 25 % sont alors similaires à celles déterminées par RMN. Il s'avère qu'après sonication, 25 % de styrène s'est évaporé, malgré le fait que le système soit refroidi durant cette étape. Par la suite, les conversions en styrène seront donc systématiquement corrigées de la perte moyenne de 25 % en styrène due à l'étape de sonication.

2.6.2 Synthèse de NPs fluorescentes par une polymérisation RAFT "one-pot" en miniémulsion

L'objectif de cette étude étant d'obtenir des nanoparticules fluorescentes, la synthèse évoquée précédemment a été réalisée en présence de 2 mol % de BDPMA par rapport au styrène (soit environ 10 wt %). Le monomère fluorescent est incorporé au système en même temps que le styrène. Deux synthèses identiques ont été réalisées : la première dans le but de suivre une cinétique de la polymérisation (CG140B), la seconde, sans prélèvements intermédiaires, afin d'avoir un lot conséquent de NPFs (CG144B). Les résultats expérimentaux de ces deux polymérisations sont résumés dans le Tableau 2.20.

Tableau 2.20 – Résultats expérimentaux de la polymérisation en miniémulsion "one-pot" dans les conditions optimisées du Tableau 2.18 en présence de 2 mol% de BDPMA au temps initial.

Exp.	t min	χ_S^a %	χ_{BDPMA}^b %	$M_{\mathrm{n,\,th}}$ kg/mol	$M_{\mathrm{n,\,CES}}^{\mathrm{PS}}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG140B	235	99	93	17,0	16,3	1,26	65 (0,16)
CG144B	240	99	98	16,4	21,0	1,25	65 (0,08)

[a] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie et corrigée de 25 % de perte par évaporation. [b] Conversion molaire en BDPMA déterminée par CES dans le THF en utilisant une détection UV-vis. (λ = 528 nm).

La Figure 2.15 présente la cinétique de polymérisation des NPFs. La conversion en styrène est déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte par évaporation lors de l'étape de sonication. La conversion en BDPMA est déterminée par CES en utilisant la détection UV-vis (λ = 528 nm) (Figure 2.16). À la fin de la polymérisation, les conversions molaires individuelles en monomères sont supérieures à 95 %. Les chaînes de polymère sont donc en moyenne constituées de 3 unités BDPMA pour 120 unités S, soit de 2,5 mol % en fluorophore. Néanmoins, à l'issue de la polymérisation en masse, le styrène atteint environ 20 % de conversion alors que le BDPMA est à plus de 50 % de conversion. La conversion en BDPMA reste plus élevée que celle du styrène sur la quasi-totalité de la polymérisation. Il semble donc que le BDPMA polymérise plus rapidement que le styrène. Il y a par conséquent certainement un gradient de fluorophores le long de la chaîne polymère avec une concentration plus élevée au voisinage de la surface des NPFs.

Les chromatogrammes d'exclusion stérique au cours de la polymérisation sont présentés Figure 2.16. Il y a bien un décalage des pics vers les plus fortes masses molaires lorsque la conversion augmente. Il ne reste pas de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC, ce qui traduit un réamorçage efficace de ces derniers. Le faible épaulement visible à des volumes de rétention correspondant au PEO est certainement dû à des unités non fonctionnalisées par le groupement RAFT. L'évolution des M_n expérimentales est linéaire avec la conver-

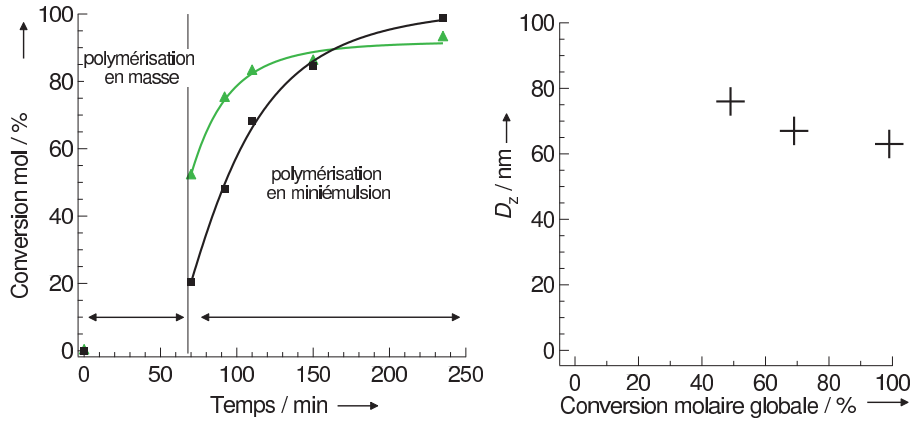


FIGURE 2.15 – Suivi de la copolymérisation en miniémulsion du styrène et du BDPMA (2 mol %) dans les conditions optimisées "one-pot" (TABLEAU 2.18). Gauche : évolution des conversions molaires en styrène (déterminées par gravimétrie et corrigées de la perte en styrène) (■) et en BDPMA (déterminée par GPC UV-vis, $\lambda = 528$ nm) (▲) en fonction du temps. Droite : évolution des diamètres hydrodynamiques des NPFs avec la conversion molaire globale.

sion et suit parfaitement la droite théorique. De plus, les I_P restent inférieurs à 1,3 durant toute la polymérisation. La reproduction de cette expérience présente les mêmes résultats expérimentaux (TABLEAU 2.20). La polymérisation RAFT par ce procédé "one-pot" est donc bien contrôlée et reproductible.

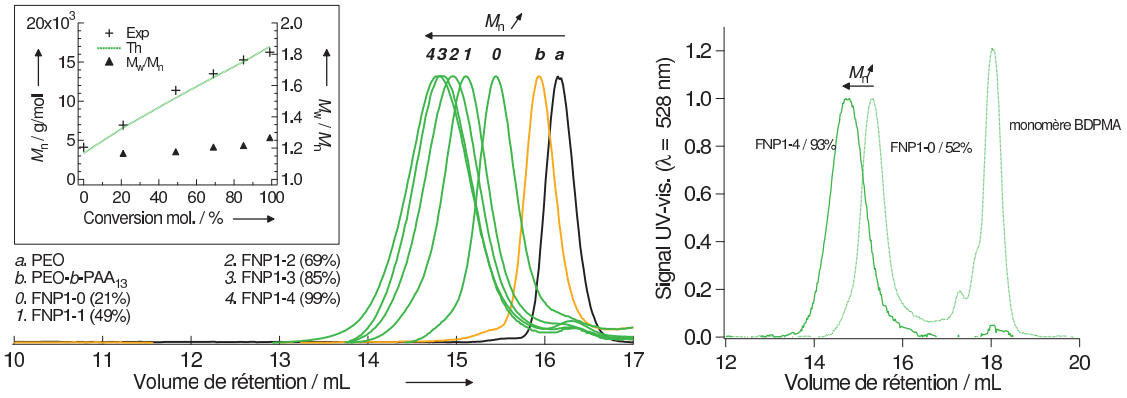


FIGURE 2.16 – Chromatogrammes d'exclusion stérique des NPFs, à différentes conversions molaires globales, enregistrés dans le THF. Gauche : détection en RI (conversions entre parenthèse : conversions molaires globales) et insertion : évolution des masses molaires moyennes en nombre (+) et des indices de polymolécularité (▲) en fonction de la conversion molaire globale déterminés par CES. Droite : détection par absorbance UV-vis. ($\lambda = 528$ nm) (conversions : conversions molaires en BDPMA).

Pour les deux synthèses, les diamètres hydrodynamiques des NPFs sont identiques (FIGURE 2.17). Ils sont très légèrement supérieurs à ceux obtenus sans BDPMA (D = 65 nm contre 60 nm). Les clichés de MET confirment la gamme des tailles et la morphologie sphérique des NPFs (FIGURE 2.17). Néanmoins, les diamètres mesurés par MET sont inférieurs à ceux mesurés par DDL (D ≈ 40 nm) car elles ne correspondent qu'au cœur

P(S-*co*-BDPMA) des NPFs. L'évolution des diamètres hydrodynamiques avec la conversion a été étudiée (FIGURE 2.15). Le diamètre des NPFs diminue légèrement durant la polymérisation, ce qui est couramment observé pour ce type d'objets étant donné que le styrène possède une densité inférieure au PS ($\rho_S = 0{,}91 < \rho_{PS} = 1{,}05$ g/cm^3).

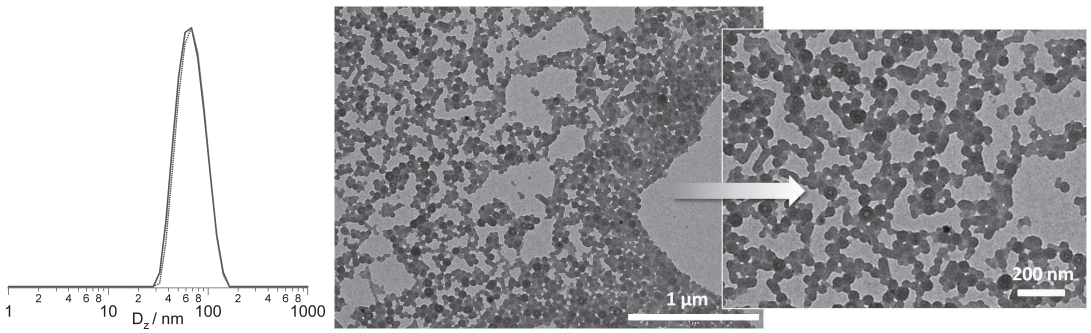


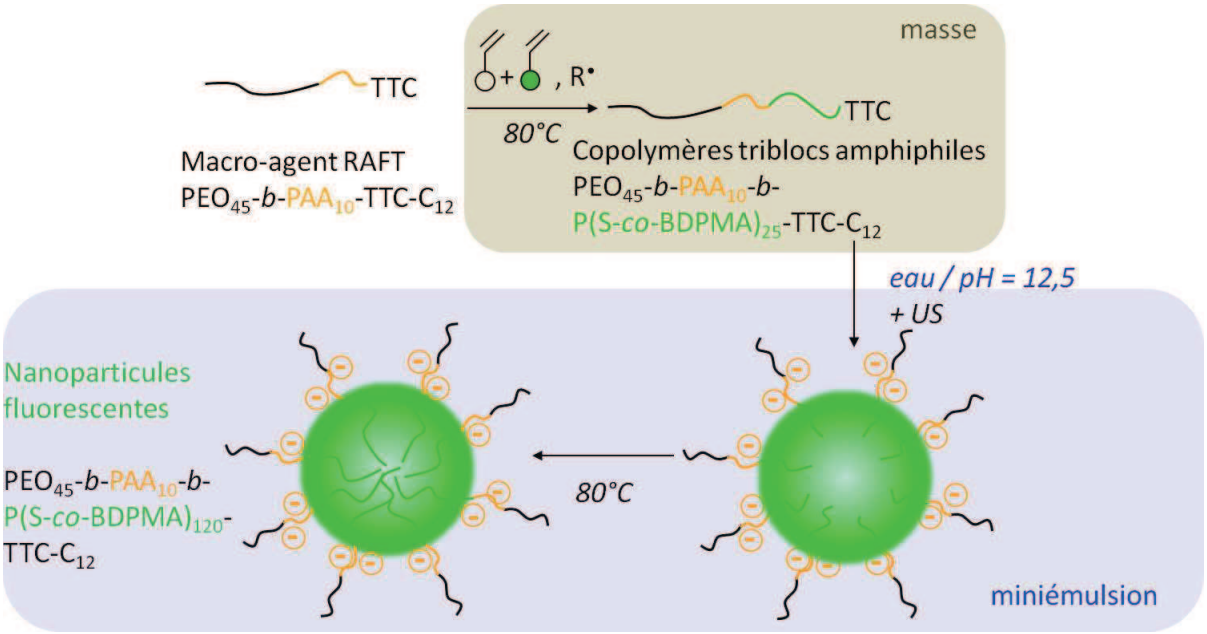
FIGURE 2.17 – Caractérisations des NPFs de styrène et de BDPMA (2 mol %) synthétisées en miniémulsion dans les conditions optimisées "one-pot" (TABLEAU 2.18). Gauche : signaux de la DDL pour les NPFs CG140B et les CG144B enregistrés dans l'eau (pH 9). Droite : clichés de MET.

Le procédé "one-pot" développé permet donc la synthèse reproductible de NPFs, à base de PS stabilisées par une couronne de PEO-*b*-PAA. La polymérisation menant à la synthèse des NPFs est contrôlée et les diamètres hydrodynamiques des objets sont inférieurs à 100 nm. De plus, ce système autorise l'emploi de comonomère fluorescent à 10 wt% par rapport au styrène, ce qui est intéressant en terme de brillance des objets. Ce travail a fait l'objet d'une publication [289]. Les caractéristiques spectroscopiques de NPFs seront étudiées en détail dans le chapitre suivant.

2.7 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que la synthèse de NPFs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne PEO ou PEO-*b*-PAA par une méthode RAFT en miniémulsion n'était pas triviale. En effet, afin d'obtenir des NPFs dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à 100 nm et pour lesquelles la polymérisation est contrôlée, un certain nombre de précautions doivent être prises. Néanmoins, il a tout de même été possible de trouver un système très satisfaisant en utilisant des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-*b*-PS-TTC et de le simplifier en développant un procédé "one-pot" (Schème 2.4). Dans ce procédé, la première étape consiste en une polymérisation en masse des monomère(s) en présence de PEO-*b*-PAA-TTC, arrêtée avant conversion totale. Dans un second temps, de l'eau basique est ajoutée au système puis le milieu réactionnel est soniqué et une dispersion homogène des gouttes de monomère(s) stabilisées par les macro-agents RAFT amphiphiles PEO-*b*-PAA-*b*-PS-TTC est obtenue. Enfin, en chauffant à nouveau cette miniémulsion, la polymérisation redémarre et des NP(F)s sont obtenues. Cette méthode est très reproductible et permet un bon contrôle de la polymérisation. Les synthèses sont menées à des taux de solide d'environ 12 wt % dans un volume de 5 mL, ce qui permet un large nombre d'expériences en spectroscopie et en imagerie de fluorescence pour la suite (typiquement expériences menées de 0,01 à 0,001 wt %)

Dans les chapitres suivants, les propriétés de ces objets seront abordées. Leurs caractéristiques spectroscopiques seront étudiées en détail. Puis, les NPFs seront modifiées que ce soit par la nature de leur cœur fluorescent ou par celle de leur couronne. Enfin, nous présenterons la post-fonctionnalisation des NPFs *via* un couplage peptidique entre les acides carboxyliques de leur couronne et des molécules à fonction amine.



Schème 2.4 – Synthèse de NPs fluorescentes à cœur poly(styrène-*co*-BDPMA), stabilisées par des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC, par une polymérisation RAFT en miniémulsion "one-pot", deux étapes.

Chapitre 3 : Propriétés spectroscopiques des nanoparticules

Dans ce chapitre sont présentées les caractéristiques spectroscopiques du fluorophore BDPMA ainsi que des NPFs dont la synthèse a été abordée dans le chapitre précédent.

Puis l'influence de la concentration en BDPMA au cœur des NPFs sur les propriétés spectroscopiques des NPFs sera abordée. Cette étude sera faite par des mesures de fluorescence stationnaires et résolues en temps sur ces NPFs à taux variables en BDPMA. Différents modèles d'analyse des déclins de fluorescence seront comparés.

Enfin, des expériences d'anisotropies de fluorescence stationnaires et résolues en temps ont été réalisées sur ces mêmes NPFs. De telles mesures permettent d'évaluer l'efficacité de transfert entre fluorophores confinés dans une matrice.

3.1 Caractéristiques spectroscopiques du monomère fluorescent BDPMA

Les spectres d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence du monomère BDPMA dans le toluène sont présentés Figure 3.1. Le toluène a été choisi comme solvant de référence dans toute cette étude de par sa grande similarité structurale avec le styrène.

Le BDPMA présente un maximum d'absorption à 528 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 540 nm. Les bandes d'absorption et d'émission sont fines, respectivement de 830 cm^{-1} et de 1000 cm^{-1} (largeurs à mi hauteur). À titre comparatif, la Rhodamine 590, dans l'éthanol, présente une bande d'émission de fluorescence d'une largeur de 1570 cm^{-1} et les QDs de 1200 cm^{-1} environ [24]. Le coefficient d'extinction molaire à 528 nm est de 73×10^3 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ et le rendement quantique de fluorescence est de 0,69, ce qui confère au BDPMA une brillance d'environ 50×10^3 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$. Le spectre d'excitation (λ_F = 540 nm) se superpose au spectre d'absorption ce qui signifie que l'espèce qui émet la fluorescence est bien la même que celle qui absorbe à 528 nm.

Le déclin du BDPMA peut être ajusté par une fonction monoexponentielle décroissante (χ^2 = 1,07) (Figure 3.1), suggérant une relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ suivant une cinétique de premier ordre. La durée de vie de fluorescence est de 4,9 ns, ce qui est classique pour ce type de BODIPY (§1.2.2).

Ce monomère fluorescent présente des caractéristiques spectroscopiques intéressantes,

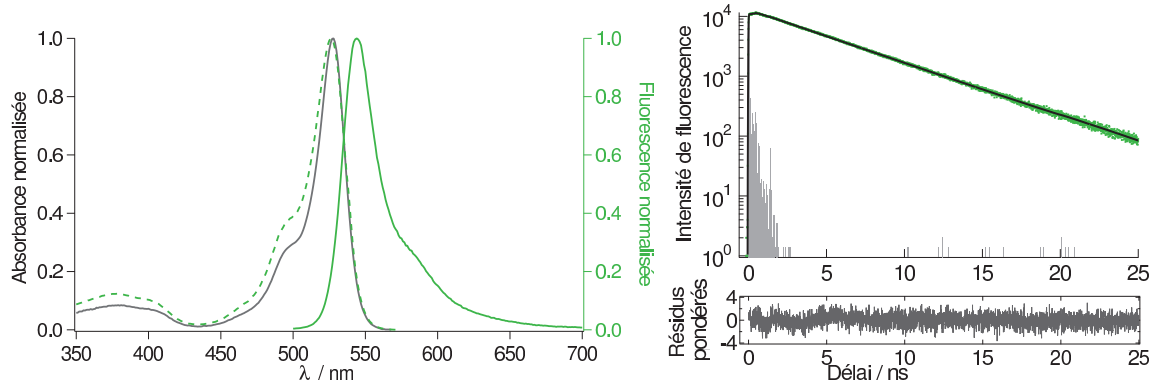


FIGURE 3.1 – Spectres du BDPMA enregistrés dans le toluène à 20°C ([BDPMA] $\approx 10^{-6}$ M). Gauche : spectres normalisés d'absorption (-), d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, -) et d'excitation (λ_F = 540 nm, ···). Droite : déclin de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 540 nm, ···), ajustement du déclin par une fonction monoexponentielle décroissante (–), impulsion laser (-) et résidus (-).

notamment pour l'élaboration de sondes adaptées à l'imagerie de fluorescence *in vitro* (§1.1.5). Il est donc intéressant de le copolymériser et de le concentrer au cœur de NPs polymères.

3.2 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs

Les propriétés spectroscopiques des particules dont la synthèse a été présentée dans le chapitre précédent (TABLEAU 2.20) sont présentées FIGURE 3.2 et dans le TABLEAU 3.1. Ces NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA), contiennent en moyenne 3 BDPMA par chaîne polymère, soit 2,5 mol % comparé au styrène. Afin d'estimer le nombre de fluorophores par particules, il faut connaître leur nombre d'agrégation (*i.e.* le nombre de chaînes polymères par particule). Ce nombre peut être évalué à l'aide des clichés de MET : en connaissant le rayon du cœur des NPFs et le volume de styrène initialement introduit dans la synthèse, on peut connaître le nombre de particules créées lors de la synthèse. Le nombre de chaînes polymères est estimé en faisant l'approximation qu'il est égal au nombre de macro-agents RAFT utilisés. Ainsi, le nombre d'agrégation peut s'exprimer sous la forme :

$$N_{\text{agg}}^{\text{MET}} = \frac{n_{\text{chaînes}}}{n_{\text{NPF}}} = \frac{V_{\text{NPF}}}{V_{\text{S}}} \times n_{\text{chaînes}} = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3}{m_{\text{S}}\rho} \times n_{\text{chaînes}} \tag{3.1}$$

où :

n_{NPF}	nombre de NPFs
$n_{\text{chaînes}}$	nombre de chaînes polymères
V_{NPF}	volume du cœur des NPFs (m^3)
V_{PS}	volume de polystyrène total (m^3)

r	rayon du cœur des NPFs (cm)
m_{PS}	masse de polystyrène totale déterminée par gravimétrie (g)
ρ	masse volumique du polystyrène (ρ = 1,05 g/cm^3 à 20 °C)

Pour des NPFs dont le cœur mesure 40 nm de diamètre, le N_{agg} est d'environ 1750 ($\pm$250). Dans ce calcul, la perte du styrène due à l'évaporation lors de l'étape de sonication a été prise en compte. Les NPFs évoquées précédemment contiennent donc en moyenne 5250 BDPMA copolymérisé avec du styrène, soit environ 0,16 BDPMA/nm^3. Cette valeur est 5 fois supérieure à ce que Larpent et coll. ont pu obtenir par la méthode de gonflement en chargeant des latex de PS par un krypto-BODIPY [178].

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du monomère dans le toluène et des NPFs dans l'eau sont très similaires (FIGURE 3.2). Un décalage bathochrome (4 nm) du maximum d'émission de fluorescence est observé lorsque l'on passe du monomère en solution à la matrice polymère. Cet effet a déjà été reporté par Álvarez, Costela et coll. pour des dérivés du krypto-BODIPY copolymérisés avec du MMA et a été attribué au confinement des fluorophores dans la matrice polymère [290]. La faible augmentation de l'absorbance lorsque la longueur d'onde diminue est due à la diffusion de la lumière par les NPFs. L'épaulement vibrationnel de la bande $S_0 \rightarrow S_1$ est plus marqué dans la matrice polymère qu'en solution, ce qui est couramment observé [193]. Les spectres d'excitation de fluorescence sont superposables aux spectres d'absorption, ce qui signifie qu'il n'y a qu'une seule espèce fluorescente dans le milieu.

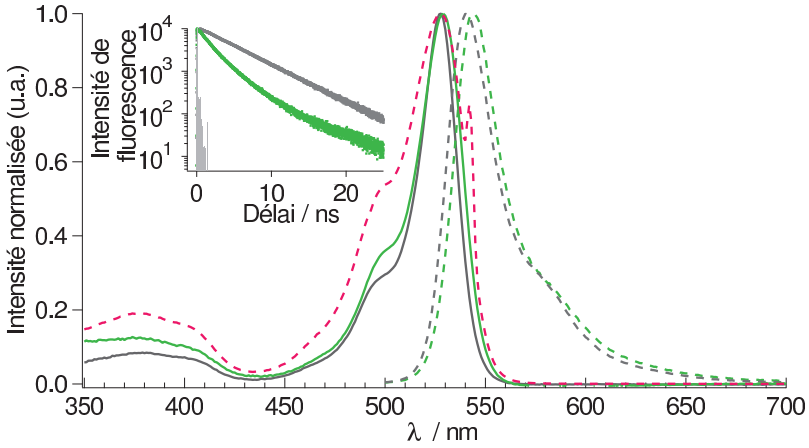


FIGURE 3.2 – Spectres des nanoparticules dans l'eau (-) (C $\approx 7.10^{-3}$ g/L) et du BDPMA dans le toluène (-) ([BDPMA] $\approx 10^{-6}$ M) : absorption (-), émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, ···) et excitation des NPFs ($\boldsymbol{\lambda_F}$ = 542 nm, ···). Insert : déclins de fluorescence ($\boldsymbol{\lambda_{exc}}$ = 495 nm, $\boldsymbol{\lambda_F}$ = 543 nm pour les NPFs et 540 nm pour le BDPMA), impulsion laser (-).

Malgré de fortes similitudes spectrales, le rendement quantique de fluorescence des NPFs dans l'eau est 3,5 fois plus faible que celui du monomère dans le toluène (TABLEAU 3.1).

Le déclin de fluorescence des NPFs dans l'eau ne peut pas être ajusté par une fonction

monoexponentielle décroissante, contrairement au monomère. La durée de vie des NPFs a donc été estimée en utilisant la durée de vie moyenne en intensité ("intensity-averaged decay time") [1] :

$$\overline{\tau} = \frac{\int_0^\infty tI(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \tag{3.2}$$

Cette définition de la durée de vie est particulièrement adaptée lorsque les déclins de fluorescence sont multi-exponentiels, ce qui est le cas pour ces NPFs.

La durée de vie moyenne des NPFs est de 2,8 ns (Tableau 3.1), ce qui est 1,8 fois plus faible que celle du monomère dans le toluène.

Tableau 3.1 – Caractéristiques spectroscopiques de NPFs mesurées dans l'eau et du BDPMA mesurées dans le toluène.

Exp.	n^a_{BDPMA}	λ_{abs}	λ^b_F	Φ_F	$\overline{\tau}^c$
		nm	nm	ns	
CG144B	3,0	529	544	0,20	2,8
BDPMA	-	528	540	0,69	4,9

[a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] λ_{exc} = 495 nm. [c] Durée de vie moyenne calculée à l'aide de l'équation 3.2 (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm pour les NPFs et 540 nm pour le BDPMA).

Il semble donc qu'en concentrant les fluorophores au cœur des NPFs, il y ait formation d'agrégats peu ou pas fluorescents, induisant une chute du rendement quantique et de la durée de vie de fluorescence des fluorophores à l'état excité. Afin de mieux comprendre ce phénomène, des NPFs à taux variable en BDPMA ont été synthétisées.

3.3 Influence de la concentration en BDPMA

Afin de mesurer l'influence de la concentration en BDPMA sur les propriétés d'émission de fluorescence des NPFs, trois NPFs d'architecture identique mais à taux variable en BDPMA ont été synthétisées. Toutes ces synthèses sont faites dans les conditions du système optimisé "one-pot" décrites dans le chapitre précédent (Tableau 2.18). Les caractéristiques de ces nanoparticules à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne PEO-*b*-PAA sont résumées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 – Caractéristiques des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA) ayant différents taux en BDPMA. Synthèses réalisées par une polymérisation en miniémulsion dans les conditions du Tableau 2.18, arrêtées après 4h.

Exp.	χ_S^a %	χ_{BDPMA}^b %	$M_{\mathrm{n,\,th}}$ kg/mol	$M_{\mathrm{n,\,CES}}^{\mathrm{PS}}$ kg/mol	$\mathrm{I_P}$	$\mathrm{n_{BDPMA}^c}$	D_z (σ) nm
CG38C	99	97	18,1	32,9	1,32	0,3	65 (0,06)
CG174B	91	99	15,2	23,7	1,45	1,1	75 (0,12)
CG178B	99	98	15,6	15,6	1,32	2,1	80 (0,15)
CG144B	99	98	16,4	21,6	1,25	3,0	65 (0,08)

[a] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie et corrigée de 25 % de perte par évaporation. [b] Conversion molaire en BDPMA déterminée par CES dans le THF en utilisant une détection UV-vis (λ = 528 nm). [c] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère.

Pour toutes ces NPFS, la conversion en BDPMA est élevée ($>$ 97%) et les polymérisations dans l'ensemble contrôlées ($\mathrm{I_P}$ autour de 1,3 - 1,5). Les nanoparticules présentent sensiblement le même diamètre hydrodynamique (D_z autour de 70 nm) et les clichés de MET (non présentés) montrent que ce sont des objets sphériques. Le nombre d'agrégation pour tous ces objets sera considéré comme étant similaire ($N_{\mathrm{agg}}^{\mathrm{MET}} = 1750$).

Ces NPFs, dont la quantité en BDPMA à cœur est variable, ont sensiblement les mêmes caractéristiques en terme de diamètres et de masses molaires des chaînes dont elles sont constituées. Leurs propriétés spectroscopiques pourront donc être comparées, dans l'eau ou dans un solvant organique tel que le toluène. Dans ce solvant, les chaînes constituant les NPFs sont dissociées et n'interagissent pas entre elles. La synthèse des NPFs étant réalisée en milieu basique, il faut d'abord soit acidifier, soit méthyler les unités acides acryliques afin de rendre les copolymères solubles dans le toluène.

3.3.1 Rendement quantique de fluorescence, brillance et durée de vie

Les propriétés spectroscopiques de ces nanoparticules ont été étudiées par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire et résolue en temps. Les NPFs ont été

étudiées dans l'eau et les chaînes polymères dans le toluène.

Pour toutes ces NPFs, les spectres d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence sont identiques aux NPFs étudiées auparavant, ayant 3 BDPMA par chaîne.

TABLEAU 3.3 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différentes concentrations en BDPMA, mesurées dans l'eau ou dans le toluène.

			eau				toluène	
Exp.	n^a_{BDPMA}	[BDPMA]^b mol/L$_S$	Φ_F	$\overline{\tau}^c$ ns	k_r $\times 10^7 s^{-1}$	k_{nr} $\times 10^7 s^{-1}$	Φ_F	$\overline{\tau}^c$ ns
BDPMA	-	-	-	-	-	-	0,69	4,9
CG38C	0,3	0,02	0,56	5,8	9,7	7,6	0,63	4,9
CG174B	1,1	0,08	0,39	4,3	10	16	0,68	4,9
CG178B	2,1	0,17	0,24	3,2	7,5	24	0,69	4,9
CG144B	3,0	0,23	0,20	2,8	7,1	29	0,47	4,8

[a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] Concentration en BDPMA au cœur des NPFs en mole par litre de styrène. [c] Durée de vie moyenne calculée à l'aide de l'équation 3.2 (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm pour les NPFs et 540 nm pour le BDPMA).

La FIGURE 3.3 présente l'évolution du rendement quantique des NPFs en fonction du nombre moyen de BDPMA par chaîne. Lorsque la concentration en BDPMA augmente, le rendement quantique diminue. Pour la plus faible concentration en BDPMA, le rendement quantique des NPFs tend vers celui du fluorophore dans le toluène.

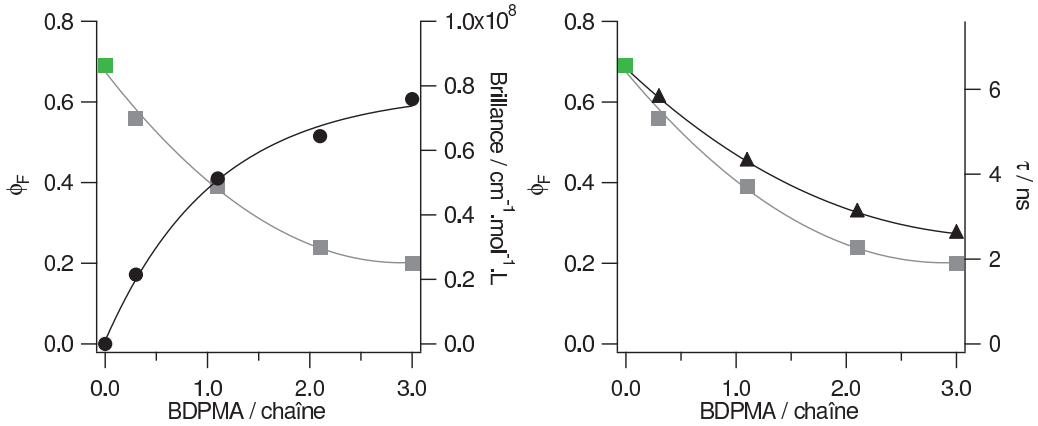


FIGURE 3.3 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à taux variable en BDPMA dans l'eau à 20°C. Gauche : évolution du rendement quantique (■) et de la brillance (●) en fonction du nombre de BDPMA par chaîne polymère. Droite : évolution du rendement quantique (■) et de la durée de vie moyenne (▲) en fonction du nombre de BDPMA par chaîne polymère. Le rendement quantique du BDPMA mesuré dans le toluène à 20°C (■) est superposé sur les deux courbes.

Il s'agit donc de savoir s'il y a un intérêt à concentrer les fluorophores au cœur des NPFs. Pour répondre à cela, il faut s'intéresser à la brillance des objets (équation 1.6).

Dans le cas de NPFs composées de chaînes fluorescentes, ce paramètre peut s'exprimer comme étant :

$$B = nN_{agg}\Phi_F\varepsilon \tag{3.3}$$

où :

n	nombre de fluorophores par chaîne polymère
N_{agg}	nombre d'agrégation (ici 1750)
Φ_F	rendement quantique de fluorescence des NPFs
ε	coefficient d'extinction molaire du BDPMA (L.mol^{-1}.cm^{-1})

L'évolution de la brillance avec la concentration en BDPMA est présentée Figure 3.3. Bien que le rendement quantique diminue lorsque la concentration en fluorophore augmente, la brillance, elle, augmente. Il y a donc un intérêt à concentrer les fluorophores afin d'avoir la meilleure brillance possible. Pour les NPFs les plus concentrées en BDPMA, la brillance est d'environ 80 $\times$ 10^6 cm^{-1}.mol^{-1}.L. Ces NPFs sont donc environ 1000 fois plus brillantes qu'un BODIPY seul, et 100 à 1000 fois plus brillantes que les QDs [24]. En comparaison aux systèmes similaires de Wooley et coll. [231], ces objets sont 160 fois plus brillants.

Afin de savoir quelle était la cause de cette perte de rendement quantique, les durées de vie de ces NPFs dans l'eau ont été mesurées (Figure 3.4). Lorsque la concentration en BDPMA augmente au cœur des objets, les déclins sont de plus en plus rapides. Ces déclins sont trop complexes pour pouvoir être ajustés par une fonction monoexponentielle décroissante.

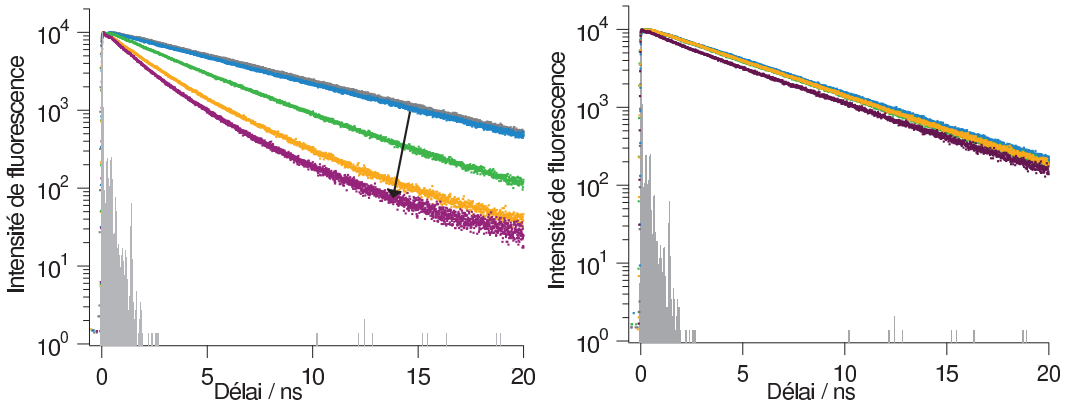


Figure 3.4 – Déclins de fluorescence des nanoparticules à différents taux de BDPMA par chaîne (0,3 • • •, 1,1 • • •, 2,1 • • •, 3,0 • • •) (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm), déclin de fluorescence du BDPMA dans le toluène (• • •) et impulsion laser (-). Gauche : dans l'eau. Droite : dans le toluène.

Dans un premier temps, seules les durées de vie moyennes en intensité ont donc été comparées (Figure 3.3, Tableau 3.3). Lorsque la concentration en BDPMA augmente, les durées de vie diminuent, comme le rendement quantique de fluorescence. L'analyse des constantes de vitesses radiatives (k_r) et non radiatives (k_{nr}) permet de comprendre un

peu mieux ces phénomènes :

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau} \text{ et } k_{nr} = \frac{1 - \Phi_F}{\tau} \tag{3.4}$$

$$\frac{1}{\tau} = k_r + k_{nr} \tag{3.5}$$

Lorsque la concentration en BDPMA augmente, k_r évolue peu, elle diminue seulement d'un facteur 1,2 en passant du milieu le plus dilué au milieu le plus concentré. En revanche, k_{nr} augmente d'un facteur 3,8.

L'évolution de τ^{-1} est linéaire avec la concentration en BDPMA (Figure 3.5). Si k_r est supposé constant lorsque la concentration en BDPMA augmente, cela signifie donc que la diminution de la durée de vie de fluorescence est due à l'augmentation de k_{nr} avec la concentration en BDPMA. L'ordonnée à l'origine donne une valeur de $(k_r + k_{nr})_0$ de 0,16 ns^{-1}, ce qui correspond à une durée de vie de 6,3 ns. Cette valeur pourrait être attribuée à la durée de vie d'un BDPMA très dilué au sein d'une matrice polymère.

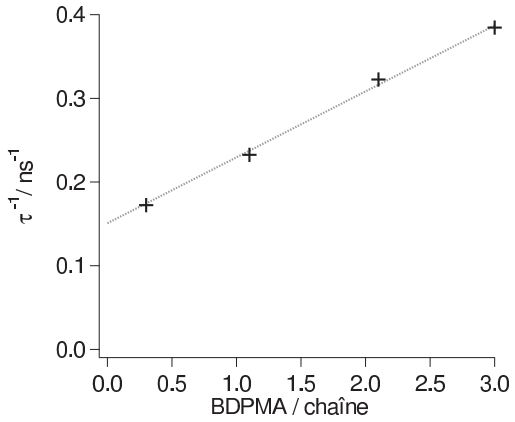


Figure 3.5 – Évolution de l'inverse de la durée de vie moyenne de fluorescence des NPFs à taux variable en BDPMA dans l'eau, en fonction du nombre de BDPMA par chaîne polymère.

Les résultats obtenus en terme de rendement quantique de fluorescence et de durée de vie signifient que, lorsque la concentration en BDPMA augmente au cœur des NPFs, des agrégats peu ou pas fluorescents sont formés. Ces agrégats sont des pièges énergétiques [193] et induisent une augmentation de k_{nr} avec la concentration en BDPMA.

Enfin, les chaînes polymères ont été étudiées en bon solvant, dans le toluène. Le rendement quantique et la durée de vie moyenne sont sensiblement les mêmes que ceux du BDPMA dans le toluène (Tableau 3.3, Figure 3.4). Il y a seulement une exception pour les NPFs les plus concentrées en BDPMA (3 par chaîne) où le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence sont légèrement inférieurs au BDPMA en solution. Cet effet peut être attribué à des agrégats de BDPMA au sein d'une même chaîne. Ceux-ci seraient formés lors de la synthèse des NPFs car le BDPMA est incorporé très rapidement dans la chaîne de copolymère (*cf.* chapitre 2).

Il semble donc que lorsque les BDPMA sont proches, dans un espace confiné tel que le cœur des NPFs, ils forment des agrégats peu ou pas fluorescents. Lorsque la distance entre BDPMA augmente, *i.e.* lorsque les chaînes sont analysées dans le toluène, ces agrégats ne peuvent plus exister et les propriétés classiques du BDPMA en solution diluée sont retrouvées.

Afin de comprendre la nature des interactions entre BDPMA au cœur des NPFs et la raison de la perte de fluorescence avec l'augmentation de la concentration, une analyse plus fine des déclins de fluorescence a été effectuée.

3.3.2 Étude approfondie des déclins de fluorescence

NPFs dans l'eau, ajustement des déclins de fluorescence

Les déclins de fluorescence des NPFs dans l'eau sont complexes. Ils ne peuvent être ajustés par une fonction monoexponentielle décroissante comme c'est le cas pour le BDPMA en solution diluée.

Les déclins peuvent être ajustés par une somme de trois exponentielles décroissantes mais ce modèle a peu de sens physique. Les résultats d'un ajustement de ce type sont résumés dans le Tableau 3.4. Ces ajustements ont été réalisés en gardant constants les paramètres τ_1, τ_2 et τ_3 et en les optimisant pour tous les déclins de fluorescence des NPFs dans l'eau. Les trois durées de vie de fluorescence sont de 1,0 ns, 2,6 ns et 6,4 ns. Cette dernière durée de vie est assez proche de celle déterminée à l'aide de la Figure 3.5 et correspond probablement au cas d'un fluorophore BDPMA isolé dans une matrice polymère. La tendance pour ces trois durées de vie est que le poids de la durée de vie la plus courte augmente avec la concentration en BDPMA, alors que le poids de la durée de vie la plus longue diminue. Ces résultats concordent avec ceux évoqués précédemment en terme de durée de vie moyenne de fluorescence et de rendement quantique. Il est à noter que le déclin des NPFs à 1 BDPMA par chaîne ne peut pas être ajusté avec succès par cette méthode (χ^2 = 7,6).

Tableau 3.4 – Paramètres d'ajustement des déclins de fluorescence dans l'eau des NPFs à taux variable en BDPMA, ajustés par une somme de trois exponentielles décroissantes, avec τ_1, τ_2 et τ_3 fixés, a_1, a_2 et a_3 variables. τ_1 = 1,0 ns, τ_2 = 2,6 ns et τ_3 = 6,4 ns et χ^2 global = 1,07.

Exp.	n_{BDPMA}	a_1 (τ_1 = 1,0 ns)	a_2 (τ_2 = 2,6 ns)	a_3 (τ_3 = 6,4 ns)	χ^2
CG38C	0,3	0,02	0,04	0,94	1,07
CG178B	2,1	0,29	0,65	0,06	1,08
CG144B	3,0	0,44	0,52	0,05	1,06

Un modèle plus réaliste dans le cas de distributions de durées de vie est l'utilisation d'exponentielles étendues [291, 292]. Kohlrauch a initialement introduit cette loi afin de

décrire la décharge de condensateurs ne suivant pas une loi décroissante strictement monoexponentielle, mais présentant une distribution de constantes de temps [293]. Elle a ensuite été reprise par Werner afin de décrire des déclins rapides de luminescence d'un phosphore inorganique, puis par Förster dans le cas de transferts d'énergie [294]. L'équation de Kohlrausch peut s'écrire sous la forme :

$$I(t) = I_0 e^{-(t/\tau_0)^\beta} = \int_0^\infty f(k) e^{-(kt)} dk \tag{3.6}$$

où $0 < \beta \leq 1$ et τ_0 et $1/k$ sont des durées de vie. La fonction de distribution $f(k)$ est la transformée de Laplace inverse de $I(t)$ et n'a de solution analytique que pour $\beta = 0{,}5$. Lorsque $\beta \neq 0{,}5$, plusieurs modèles mathématiques ont été proposés afin d'obtenir la fonction de distribution $f(k)$ [291]. Une estimation de $f(k)$ a été proposée par Berberan-Santos et coll. (équation 3.7). Par cette équation $f(k)$ est déterminée à 5 % près pour des valeurs de $\beta > 0{,}2$. Dans le cas où $\beta > 0{,}5$, la distribution peut s'exprimer comme :

$$f(k) = \tau_0 \frac{B}{(k\tau_0)^{(1-\beta/2)/(1-\beta)}} \times exp\left[-\frac{(1-\beta)\beta^{\beta/(1-\beta)}}{(k\tau_0)^{\beta/(1-\beta)}}\right] \times (1 + C(k\tau_0)^\delta) \tag{3.7}$$

où :
- B et C : constantes dépendantes de β
- τ_0 : durée de vie de fluorescence donnée par l'équation 3.6
- $\delta =$: $\beta(\beta - 0{,}5)/(1-\beta)$

L'exposant β est inversement proportionnel à la largeur à mi-hauteur de la distribution des durées de vie (Figure 3.6). Ainsi, β reflète l'homogénéité des durées de vie, avec pour référence $\beta = 1$ lorsqu'il n'y a qu'une seule durée de vie. Dans le cas de transfert d'énergie de type Förster, $\beta = 0{,}5$, et dans le cas de transfert d'énergie de type Dexter, $\beta = d/s$, où d est la dimension fractale et s dépend du mécanisme de transfert d'énergie (dipôle-dipôle, dipôle-quadrupôle, quadrupôle-quadrupôle) [291].

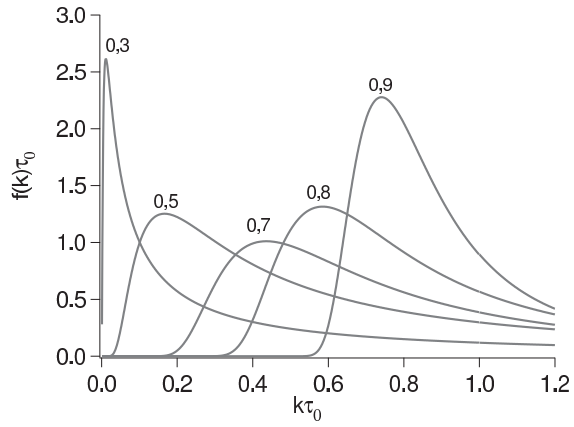


Figure 3.6 – Distributions des durées de vie (1/k) obtenues par l'équation 3.7. Les chiffres au-dessus de chaque courbe correspondent aux exposants β (adapté de [291]).

Les exponentielles étendues ont été utilisées avec succès pour décrire, entre autres, des phénomènes complexes d'homo- ou d'hétéro-transfert lorsque des fluorophores sont

confinés dans des NPs de silice [295], des particules polymères [296], de l'ADN [297], des surfaces d'alumine [298].

Winnik et coll. ont étudié des latex de poly(méthacrylate de *n*-butyle) chargés par des monomères naphtalimides (synthétisés par une polymérisation en miniémulsion) [253]. Les auteurs proposent d'étudier l'hétérotransfert entre les deux monomères, l'un servant de donneur, l'autre d'accepteur.

Dans le cas du donneur seul, le déclin est ajusté par une fonction de type Kohlrausch. La durée de vie moyenne du donneur, $< \tau_D >$, est alors donnée par :

$$< \tau_D >= \frac{\tau_D}{\beta}\Gamma\left(\frac{1}{\beta}\right) \tag{3.8}$$

où :

τ_D	durée de vie du donneur
$< \tau_D >$	durée de vie moyenne du donneur
$\Gamma(x)$	fonction gamma

Les auteurs trouvent $\tau_D = 5{,}3$ ns, $< \tau_D > = 5{,}5$ ns et $\beta = 0{,}92$. Le paramètre β trouvé, assez proche de l'unité, traduit une faible déviation par rapport à un comportement monoexponentiel. En présence de l'accepteur, les déclins peuvent être ajustés par une équation de type Förster :

$$I_D(t) = I_0 e^{[-(t/\tau_D)^\beta - P(t/<\tau_D>)^{0,5}]} \tag{3.9}$$

P est un paramètre d'ajustement qui varie avec la concentration en accepteur et qui est proportionnel au cube du rayon de Förster. L'analyse des déclins par cette méthode permet d'estimer un rayon de Förster proche de celui calculé par la méthode des recouvrements de spectre.

Dans des travaux ultérieurs, Winnik et coll. ont copolymérisé des monomères de type naphtalimide ou coumarine à fonction méthacrylate d'alkyle à du styrène [299]. L'exposant β obtenu vaut en moyenne 0,9, ce qui traduit encore une fois une faible déviation par rapport à un comportement idéal.

Dans notre cas, il peut s'agir soit d'homotransfert entre BDPMA isolés, soit d'hétérotransfert entre BDPMA isolés et agrégats de BDPMA. Dans le cas d'un hétérotransfert, le déclin de l'échantillon le plus dilué en BDPMA (0,3 par chaîne) peut servir de référence pour obtenir l'exposant β en l'absence d'agrégats (accepteurs). Cette hypothèse paraît envisageable dans la mesure où les constantes de vitesse radiative et non radiative de cet échantillon sont du même ordre de grandeur qu'un fluorophore isolé dans une matrice polymère (Figure 3.5). L'ajustement du déclin de ces NPFs par l'équation 3.8 donne comme paramètres d'ajustement $\tau_D = 5{,}8$ ns, $\beta = 0{,}97$ et $\chi^2 = 1{,}07$. Malheureusement, il n'a ensuite pas été possible d'ajuster les déclins des NPFs à plus forts taux en BDPMA par l'équation 3.9. Un ajustement par l'équation 3.6 en prenant $\beta = 0{,}5$ (Förster pur) n'est pas possible car cette équation décroît trop rapidement avec le temps.

Dans le cas d'un mécanisme de transfert de type Dexter, l'expression de l'intensité de fluorescence est donnée par [300] :

$$I_D(t) = I_0 e^{-(t/\tau_D)^\beta - P(t/<\tau_D>)^{d/s}} \tag{3.10}$$

où les paramètres d'ajustement sont d (dimension fractale), s (ordre des interactions multiples), τ et β.

Il n'a pas non plus été possible d'ajuster les déclins des NPFs à différents taux en BDPMA par cette expression.

Toutes ces expressions de l'intensité de fluorescence en fonction du temps déclinent trop rapidement par rapport aux déclins de fluorescence des NPFs, mais un simple ajustement par l'équation 3.6 ne donne pas des χ^2 satisfaisants ($\chi^2 > 5$). Il a alors été envisagé d'utiliser une équation comportant un terme correspondant à des agrégats de BDPMA (en exposant β) et un terme correspondant à des BDPMA isolés (exponentielle simple) afin d'ajuster ces déclins :

$$I(t) = a_1 e^{(-t/\tau_1)^\beta} + a_2 e^{(-t/\tau_2)} \tag{3.11}$$

Un ajustement en combinant les déclins entre eux en gardant τ_1 et τ_2 fixés, et β, a_1 et a_2 variables donne des résultats satisfaisants pour les NPFs à 0,3, 2 ou 3 BDPMA par chaîne (χ^2 global = 1,25). Les paramètres d'ajustement obtenus sont τ_1 = 1,6 ns et τ_2 = 6,4 ns. Malheureusement, le déclin des NPFs à 1 BDPMA par chaîne ne peut pas être ajusté avec ces valeurs ($\chi^2 > 10$). De plus, avec cet ajustement l'exposant β augmente avec la concentration en BDPMA (respectivement de 0,78 à 0,87 lorsque le nombre de BDPMA par chaîne passe de 0,3 à 3). Ce résultat traduirait une augmentation de l'hétérogénéité des NPFs lorsque la concentration en BDPMA diminue, ce qui semble peut réaliste.

Les déclins ont alors été ajustés en fixant β et τ_2 et en variant τ_1, a_1 et a_2. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.5 et les déclins et ajustements présentés Figure 3.7.

Tableau 3.5 – Paramètres d'ajustement des déclins de fluorescence enregistrés dans l'eau des NPFs à taux variable en BDPMA, ajustés par l'équation 3.11, avec β et τ_2 fixés, τ_1, a_1 et a_2 variables. β = 0,88, τ_2 = 6,0 ns et χ^2 global = 1,21.

Exp.	n_{BDPMA}	τ_1	a_1	a_2	χ^2
CG38C	0,3	5,4	0,21	0,79	1,09
CG174B	1,1	2,9	0,95	0,05	1,46
CG178B	2,1	1,8	0,93	0,07	1,08
CG144B	3,0	1,6	0,94	0,06	1,22

La durée de vie constante de ces déclins (τ_2) est de 6,0 ns. Cette valeur est assez proche de celle estimée pour des BDPMA isolés dans du PS (6,3 ns, Figure 3.5). Cette durée de vie discrète correspond donc certainement bien à des fluorophores BDPMA isolés.

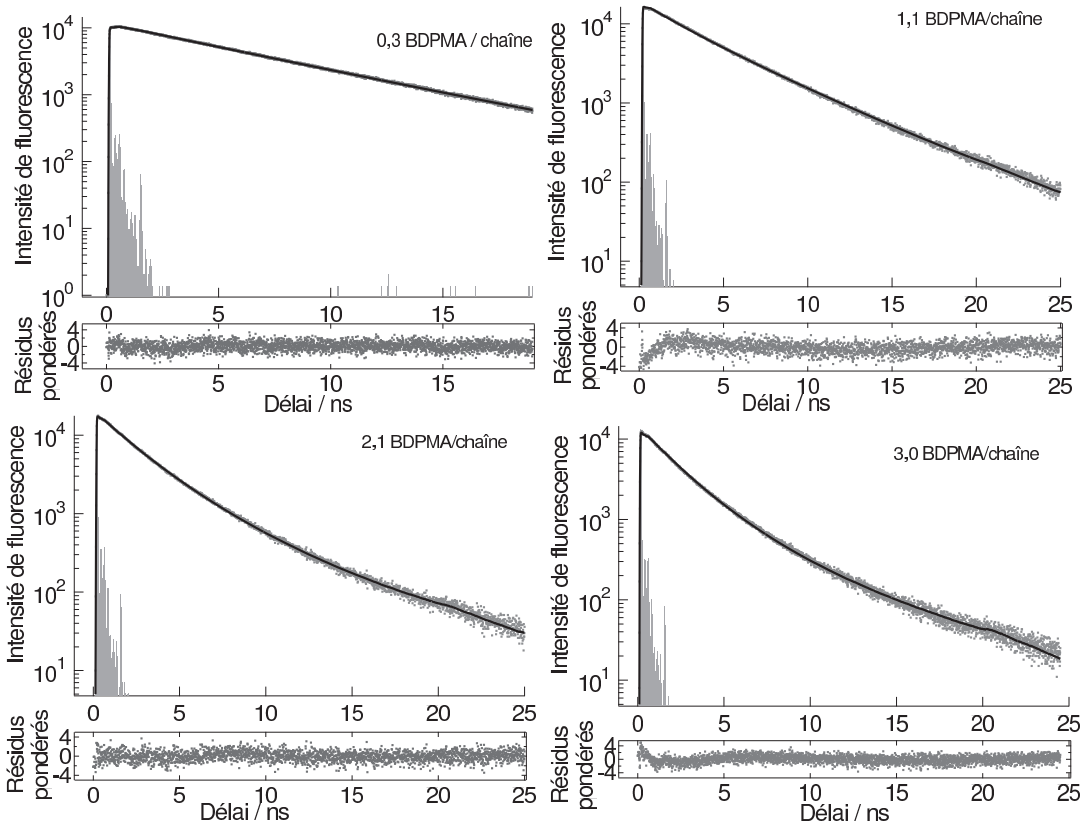


FIGURE 3.7 – Déclins de fluorescence (···), ajustement des déclins par l'équation 3.11 (-), impulsion laser (-) et résidus pondérés (-) pour les NPFs à taux variable en BDPMA (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm). De haut en bas et de gauche à droite : 0,3, 1,1, 2,1 et 3,0 BDPMA par chaîne polymère.

Le paramètre β obtenu vaut 0,88, ce qui est du même ordre de grandeur que celui obtenu par Winnik et coll. pour des fluorophores copolymérisés avec du styrène [299]. Ce paramètre, assez proche de l'unité, traduit une faible hétérogénéité des systèmes. D'une manière générale, τ_1 diminue avec la concentration. Néanmoins, deux comportements se distinguent :

- dans le cas des fluorophores très dilués (0,3 par chaîne), le déclin de fluorescence suit quasiment une loi monoexponentielle ($a_1 \ll a_2$) ;
- dans le cas des fluorophores plus concentrés (1 $\leqslant$ BDPMA par chaîne $\leqslant$ 3), les déclins suivent quasiment un loi d'exponentielle étendue pure ($a_1 \gg a_2$).

La visualisation des fonctions de distribution des durées de vie permet une comparaison simple des durées de vie (Figure 3.8). Pour $\beta = 0,88$, les paramètres de l'équation 3.7 sont B = 0,647 et C = 0,344 [291].

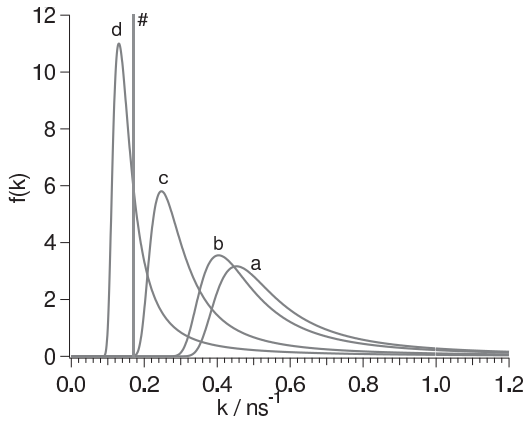


Figure 3.8 – Distribution des durées de vie (1/k) obtenues par l'équation 3.7, des échantillons à 3 (a), 2 (b), 1 (c) ou 0,3 (d) BDPMA par chaîne polymère. Le dirac (#) correspond à $1/\tau_2$.

Les NPFs de BDPMA copolymérisé au styrène sont donc hétérogènes. Elles sont certainement constituées d'agrégats de BDPMA peu fluorescents et de BDPMA isolés. Lorsque la concentration en BDPMA est faible, le système est essentiellement constitué de fluorophores isolés. En revanche, lorsque la concentration en BDPMA est supérieure ou égale à un fluorophore par chaîne, le système est principalement constitué d'agrégats peu ou pas fluorescents. La durée de vie de ces agrégats diminue lorsque la concentration en BDPMA augmente. Ces observations sont complémentaires avec celles faites en terme de rendement quantique et d'évolution de la constante de transfert k_{nr} avec la concentration.

Chaînes polymères dissoutes dans le toluène

Les déclins de fluorescence des chaînes à taux variable en BDPMA dans le toluène sont moins complexes que ceux des NPFs dont elles sont issues (Figure 3.4).

Pour les échantillons contenant moins de 3 BDPMA par chaîne, les déclins sont ajustables par une fonction monoexponentielle décroissante (Tableau 3.6). La durée de vie obtenue est similaire à celle du BDPMA dans le toluène.

Le déclin des chaînes contenant 3 BDPMA est ajusté par une somme de deux exponentielles décroissantes (Tableau 3.6). Une des durées de vie correspond certainement à des BDPMA isolés (τ_1) et la seconde (τ_2), très rapide, à des agrégats de BDPMA le long de la chaîne polymère comme cela a déjà été évoqué précédemment.

Tableau 3.6 – Paramètres d'ajustement des déclins de fluorescence enregistrés dans le toluène des chaîne de copolymères à taux variable en BDPMA.

Exp.	n^a_{BDPMA}	Φ_F	$\overline{\tau}$ [b] ns	a_1	τ_1 ns	a_2	τ_2 ns	χ^2
BDPMA	-	0,69	4,9	1[c]	4,9			1,07
CG38C	0,3	0,63	4,9	1[c]	5,0			1,06
CG174B	1,1	0,68	4,9	1[c]	4,8			1,08
CG178B	2,1	0,69	4,9	1[c]	4,9			1,05
CG144B	3,0	0,47	4,8	0,77[d]	4,8	0,23[d]	0,7	1,14

[a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] Durée de vie moyenne calculée à l'aide de l'équation 3.2 (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm pour les NPFs et 540 nm pour le BDPMA). [c] Déclins ajustés par une fonction monoexponentielle décroissante. [d] Déclin ajusté par une somme de deux exponentielles décroissantes.

Conclusion

Lorsque la concentration en BDPMA augmente au cœur des NPFs, il y a formation d'agrégats de BDPMA peu ou pas fluorescents qui jouent le rôle de pièges énergétiques. La formation de ces agrégats a été mise en évidence par une analyse des rendements quantiques de fluorescence des NPFs à différents taux de BDPMA, ainsi que des durées de vie de fluorescence. Une analyse approfondie de ces déclins a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de la distribution des BDPMA dans les NPFs.

Dans le chapitre 2, un suivi cinétique de la copolymérisation du BDPMA avec le styrène a permis de mettre en évidence que le fluorophore se polymérise plus rapidement que le styrène. Il existe donc certainement un gradient de fluorophores au sein des chaînes polymère. C'est cette répartition graduelle et la proximité des chaînes polymères qui doit être à l'origine de la formation des agrégats des BDPMA.

Malgré cette diminution de fluorescence lorsque la concentration en BDPMA augmente, la brillance des NPFs augmente. Cette brillance est même largement supérieure à celle rencontrée pour la plupart des NPFs utilisées dans la littérature. Il y a donc un intérêt à concentrer les BDPMA au cœur des NPFs.

3.4 Transferts d'énergie au cœur des NPFs : mesures d'anisotropie de fluorescence

Les mesures d'anisotropie de fluorescence permettent, entre autres, d'évaluer les transferts d'énergie entre fluorophores immobiles au sein d'un matrice polymère.

La lumière est une onde électromagnétique constituée d'un champ électrique $\overrightarrow{E}$ et d'un champ magnétique $\overrightarrow{B}$, perpendiculaires, oscillants en phase et ayant la même direction de propagation. Dans la lumière naturelle, ces champs n'ont pas de direction privilégiée, la lumière n'est pas polarisée. En revanche, une onde électromagnétique plane est dite polarisée linéairement si, lors de la propagation, les vecteurs champs électriques restent dans un même plan ; les vecteurs champs magnétiques restent alors également dans un même plan, perpendiculaire au précédent. Le plan formé par le vecteur $\overrightarrow{E}$ et la direction de propagation est appelé plan de polarisation. La direction du vecteur $\overrightarrow{E}$ est prise par convention comme direction de polarisation de l'onde. Il est possible de donner un état polarisé à une onde ne l'étant originellement pas en utilisant des polariseurs. Ces milieux ne transmettent que les composantes des trains d'ondes incidents dont le vecteur $\overrightarrow{E}$ vibre parallèlement à une direction déterminée, direction qui sera la direction de polarisation du rayon émergent. Si l'on place un second polariseur, appelé analyseur, à la suite du premier, tourné d'un angle θ (angle entre les directions de polarisation du polariseur et de l'analyseur) et si l'amplitude du champ électrique de la lumière polarisée à la sortie du polariseur est E_0, l'amplitude à la sortie de l'analyseur sera $E = E_0 cos\theta$. Comme l'intensité est proportionnelle au carré de l'amplitude, l'intensité I à la sortie de l'analyseur sera $I = I_0 cos^2\theta$ (loi de Malus) où I_0 est l'intensité à la sortie du polariseur. L'intensité sera maximale si les directions de polarisation du polariseur et de l'analyseur sont parallèles. Elle sera nulle (aucune lumière ne sort de l'analyseur) si $\theta = 90^\circ$, c'est-à-dire si les polariseurs sont croisés.

Les fluorophores absorbent la lumière selon leur moment de transition et la lumière émise est également parallèle à ce moment de transition dans la plupart des cas. Si la lumière incidente est polarisée, la probabilité d'excitation d'un chromophore est proportionelle à $cos^2\theta$, où θ est l'angle entre le champ électrique $\overrightarrow{E}$ et le moment de transition du chromophore. Ainsi, si une population de fluorophores est éclairée par une lumière polarisée, les molécules dont le moment de transition est parallèle au champ électrique seront préférentiellement excitées. Tout changement de la direction de polarisation durant l'état excité va causer une diminution d'anisotropie. Des mesures d'anisotropie de fluorescence peuvent donc fournir par exemple des indications sur la mobilité des molécules, la fluidité d'un milieu.

Dans le cas de molécules uniques en milieu dilué, le mouvement de la molécule sur elle-même durant le temps de l'analyse peut induire une dépolarisation de la lumière. Si cette molécule est figée, il ne peut y avoir de dépolarisation de la lumière (Figure 3.9, cas A). En revanche, dans le cas d'assemblées de fluorophores dans une matrice figée, il

peut y avoir une dépolarisation de la lumière par transfert d'énergie entre fluorophores (FIGURE 3.9, cas B).

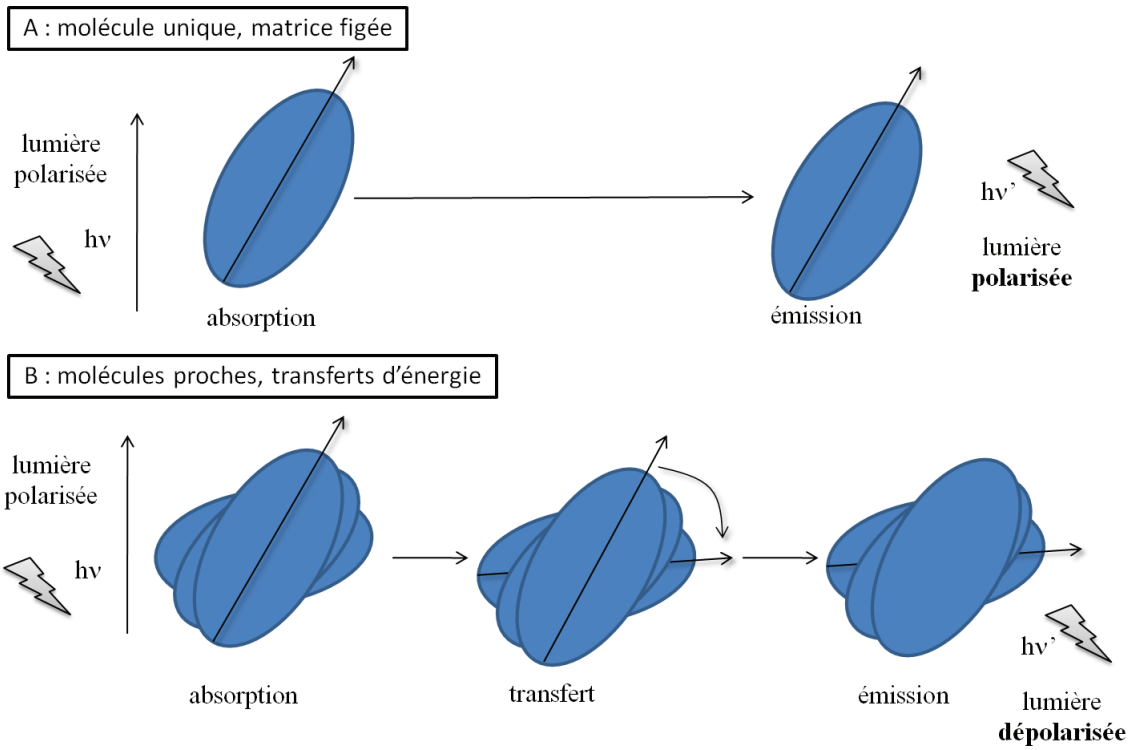


FIGURE 3.9 – Exemples de dépolarisation de la lumière par des fluorophores (adapté de [301]). Les formes ovales représentent des fluorophores et les flèches les moments de transition d'absorption et de fluorescence de ces fluorophores, supposés parallèles.

C'est ce dernier cas qui va nous intéresser afin de déterminer l'efficacité de transfert entre BDPMA au sein d'une particule ou d'une chaîne de polymère. Les BDPMA sont répartis de manière aléatoire au cœur des nanoparticules, l'anisotropie d'une nanoparticule ou d'une solution de nanoparticules est donc supposée nulle. Néanmoins, en excitant préférentiellement une population de BDPMA et en regardant dans le temps la dépolarisation de la lumière, il doit alors être possible qualitativement et quantitativement de déterminer l'efficacité de transfert entre fluorophores. Ceci est possible par des mesures d'anisotropie de fluorescence non pas stationnaires, mais résolues en temps.

Expérimentalement, de la lumière polarisée verticalement (V) ou horizontalement (H) à l'aide d'un polariseur est envoyée sur une cuve contenant l'échantillon à analyser. En sortie de cet échantillon, un second polariseur est placé de manière à ne récupérer que la lumière polarisée à nouveau verticalement ou horizontalement (FIGURE 7.3). Les composantes verticales ou horizontales de l'intensité sont mesurées grâce à un photomultiplicateur. L'intensité totale de fluorescence correspond à $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$. Le facteur G est un facteur de correction pour le rapport des composantes parallèles et perpendiculaires à la direction de polarisation de la lumière incidente. Il est indépendant de l'échantillon analysé et est

défini par :

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \tag{3.12}$$

L'anisotropie est quant à elle le rapport des intensités verticales et horizontales (intensités étant respectivement dirigées parallèlement ou orthogonalement par rapport à la polarisation du faisceau d'excitation), sur l'intensité totale de fluorescence :

$$A = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times G \times I_{VH}} \tag{3.13}$$

3.4.1 Estimation des temps de diffusion des NPFs et des chaînes polymère

Les mesures d'anisotropie ne peuvent être valides que si la durée de l'émission de fluorescence est courte devant les mouvements du matériau qui causeraient une dépolarisation de la lumière. Ainsi, pour des NPFs en suspension, il ne faut pas qu'elles aient le temps de tourner durant le temps de l'analyse. À l'aide de la loi de Stokes-Einstein (équation 7.12), le temps de diffusion rotationnelle peut être estimé pour des nanoparticules sphériques par :

$$\tau_R = \frac{1}{6D_R} = \frac{4}{3}\pi\frac{\eta r^3}{kT} \tag{3.14}$$

où :

τ_R	temps de diffusion rotationnelle (s)
D_R	coefficient de diffusion rotationnelle (s^{-1})
r	rayon hydrodynamique (m)
η	viscosité du solvant ($J.m^{-1}.s^{-1}$)
k	constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$)
T	température d'analyse (K)

Pour des NPFs d'un rayon hydrodynamique de 30 nm dans l'eau, à 20°C, τ_R = 30 000 ns et à 60°C, τ_R = 12 000 ns. Ces temps sont quasiment 1000 fois supérieurs à la durée de vie de fluorescence des NPFs dans l'eau. Les mesures d'anisotropie de fluorescence des NPFs dans l'eau seront donc valables.

Dans le toluène, seules les chaînes polymères seront observées. L'écart entre extrémités d'une chaîne polymère peut s'exprimer par :

$$r^2 = C_\infty n l^2 \tag{3.15}$$

où :

r	distance entre extrémités de chaîne
C_∞	rapport caractéristique
n	nombre d'unités monomères de longueur l
l	longueur d'une unité de répétition

Le rapport caractéristique tient compte de la rigidité de la chaîne dans le solvant d'analyse. Les valeurs des rapports caractéristiques sont tabulées dans le Polymer Handbook [302] pour chaque couple polymère-solvant. Afin d'estimer la longueur de chaînes de copolymères PEO_{45}-*b*-PAA_{10}-*b*-PS_{120} dans le toluène, nous avons choisi de faire la somme de chaque longueur de segment. Les valeurs des rapports caractéristiques pour chaque bloc de polymère sont résumées dans le TABLEAU 3.7. Dans certains cas, le C_∞ n'était pas renseigné dans le toluène, il a alors fallu prendre celui dans le solvant le plus similaire. La longueur des unités monomères (l) est prise comme étant égale à deux fois la liaison carbone-carbone (0,154 nm) pour les monomères styrène et acide acrylique et à trois fois cette distance pour l'EO. Dans ce cas, l est légèrement surestimé puisque la longueur de la liaison carbone-oxygène est légèrement inférieure à celle de la liaison carbone-carbone.

TABLEAU 3.7 – Caractéristiques de taille des différents blocs polymères du PEO_{45}-*b*-PAA_{10}-*b*-PS_{120}.

polymère	solvant	C_∞	l^a	n^b	r_i^c
			nm		nm
PEO	benzène	4,3	0,462	45	6,4
PAA	dioxane	6,7	0,308	10	2,5
PS	toluène	10,5	0,308	120	10,9

[a] Longueur d'une unité monomère. [b] nombre d'unités monomère. [c] Distance entre extrémités du bloc polymère considéré.

En considérant que les longueurs trouvées pour chacun des blocs polymères dans différents solvants sont les mêmes dans le toluène, la distance entre extrémités de chaînes pour le copolymère PEO_{45}-*b*-PAA_{10}-*b*-PS_{120} est donc d'environ 20 nm.

En utilisant l'équation 3.14, il est alors possible d'estimer de manière très approximative le temps de diffusion rotationnelle des chaînes polymères à 20°C ou 60°C [1]. Les temps calculés sont respectivement de 600 et 300 ns, ce qui est environ 100 fois supérieur aux durées de vie de fluorescence des chaînes de copolymères fluorescentes dans le toluène. Les calculs d'anisotropie seront donc *a priori* valides.

3.4.2 Effet de la température

Les temps de diffusion rotationnelle évoqués précédemment ne tiennent pas compte des mouvements locaux des chaînes polymères.

Les BDPMA au cœur des NPFs polymères sont *a priori* immobiles puisque dans un cœur "gelé" de PS. En effet, les mesures sont toujours réalisées à une température bien inférieure à la température de transition vitreuse du PS ($T_g^{PS} \approx 100$°C). Dans le cas des

1. Viscosité du toluène à 20°C : 575 μPa.s et à 60°C : 375 μPa.s [303]

chaînes dans le toluène, le problème est plus complexe. En effet, les mouvements locaux des chaînes de PS ont des temps caractéristiques extrêmement rapides, de l'ordre de 0,1-0,5 ns [304, 305]. La rapidité de ces mouvements dépend entre autres de la viscosité du solvant dans lequel est dispersée la chaîne polymère et de la température.

Afin d'évaluer l'impact des mouvements locaux des chaînes polymères sur la dépolarisation de la lumière, des mesures d'anisotropie ont été réalisées à quatre températures, dans l'eau pour les NPFs ou dans le toluène pour les chaînes seules. L'échantillon étudié est celui dans lequel la concentration en fluorophores est la plus forte, c'est à dire celui pour lequel la dépolarisation de la lumière devrait être la plus rapide.

Anisotropies stationnaires

Dans un premier temps, des mesures d'anisotropies stationnaires ont été réalisés sur les NPFs possédant 3 BDPMA par chaîne. Ces mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre de fluorescence équipé de polariseurs d'excitation et d'émission motorisés.

TABLEAU 3.8 – Valeurs moyennes des anisotropies d'émission de fluorescence stationnaires (λ_{exc} = 495 nm) des NPFs comprenant 3 BDPMA par chaîne, enregistrées dans l'eau et le toluène, pour des températures variant entre 5 et 60°C.

	T			
solvant	5°C	20° C	37°C	60°C
eau	-0,011	-0,013	-0,010	-0,009
toluène	-0,020	-0,023	-0,022	-0,012

Que ce soient les nanoparticules dans l'eau ou les chaînes polymères dans le toluène, les valeurs des anisotropies stationnaires sont nulles à toutes les températures (TABLEAU 3.8). Cela signifie que les transferts d'énergie sont efficaces quelle que soit la température. Cette méthode ne permet néanmoins pas d'avoir connaissance de la vitesse de ces transferts d'énergie.

Anisotropies résolues en temps

Des mesures d'anisotropies résolues en temps permettent d'avoir accès aux temps caractéristiques des transferts d'énergie entre fluorophores. Les mesures sont réalisées sur le même montage que les déclins de fluorescence. Les polariseurs d'excitation et d'émission sont tournés manuellement.

Les déclins d'anisotropie de fluorescence des NPFs possédant 3 BDPMA par chaîne, dans l'eau et le toluène, sont présentés FIGURE 3.10 pour quatre températures allant de 5 à 60°C.

Dans l'eau, les déclins d'anisotropie sont très rapides, traduisant des transferts d'énergie efficaces. Il n'est pas possible d'analyser quantitativement ces déclins car ils sont conte-

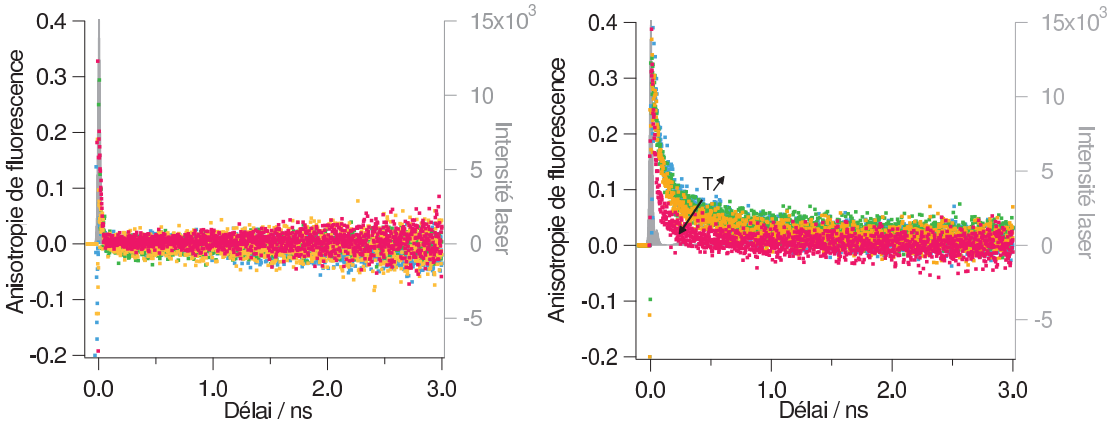


FIGURE 3.10 – Anisotropies résolues en temps des NPFs possédant 3 BDPMA par chaîne à différentes températures : 5°C (···), 20°C (···), 37°C (···), 60°C (···) (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm). Gauche : dans l'eau. Droite : dans le toluène.

nus dans l'impulsion laser. Néanmoins, visuellement, il semble que la température n'ait pas d'influence sur ces déclins d'anisotropie. Ce résultat confirme ce qui a été annoncé précédemment, à savoir que les BDPMA sont dans un cœur gelé de PS.

Dans le toluène, les déclins d'anisotropie sont en moyenne moins rapides que dans l'eau, ce qui était prévisible dans la mesure où les fluorophores sont moins proches. Lorsque la température passe de 5°C à 60°C, le déclin d'anisotropie est beaucoup plus rapide. Il y a donc un effet de la température sur les mesures d'anisotropie de fluorescence des chaînes dans le toluène. Cela signifie que la dépolarisation de la lumière au sein des chaînes polymères est due d'une part aux transferts d'énergie entre fluorophores, et d'autre part à l'agitation thermique.

Dans la suite, l'influence de la concentration en BDPMA sur les mesures d'anisotropie de fluorescence sera étudiée. Les déclins d'anisotropie des chaînes polymères ont été mesurés dans le toluène à 20°C. Il faut donc garder en mémoire qu'une partie de la dépolarisation de la lumière sera due aux mouvements vibrationnels des chaînes polymères.

3.4.3 Effet de la concentration en BDPMA sur l'anisotropie de fluorescence

Les mesures d'anisotropie résolues en temps renseignent sur l'efficacité de transfert entre fluorophores au sein d'une matrice figée. Nous nous proposons donc d'évaluer si l'efficacité de transfert augmente avec la concentration en BDPMA au cœur des NPFs.

Anisotropies de fluorescence stationnaire

Les valeurs moyennes d'anisotropies d'émission et d'excitation de fluorescence stationnaires des NPFs dans l'eau sont globalement nulles, quelle que soit la concentration en

BDPMA (Figure 3.11, Tableau 3.9). Les mesures d'anisotropie d'excitation étant très bruitées et ayant un pic d'excitation très marqué, la moyenne des anisotropies d'excitation a été calculée pour des longueurs d'ondes comprises entre 450 et 532 nm.

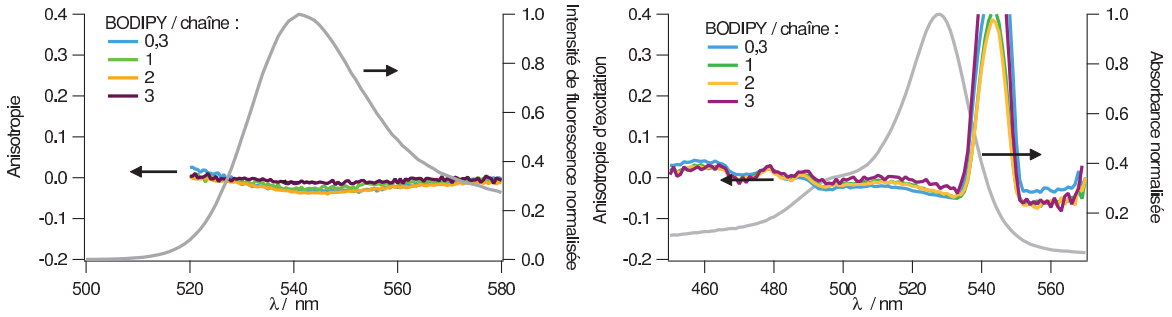


Figure 3.11 – Anisotropies stationnaires des NPFs à différents taux de BDPMA par chaîne (0,3 -, 1,1 -, 2,1 -, 3,0 -), enregistrées dans l'eau à 20°C. Gauche : émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm). Droite : excitation de fluorescence (λ_{emF} = 543 nm). Les spectres en gris sont les spectres normalisés d'émission de fluorescence (gauche) et d'absorption (droite) des NPFs dans l'eau.

Les anisotropies d'émission ou d'excitation de fluorescence des chaînes dans le toluène ne sont pas présentées car elles sont similaires à celles des NPFs dans l'eau. Les valeurs de ces anisotropies sont également globalement nulles quelle que soit la concentration en BDPMA (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 – Valeurs moyennes des anisotropies stationnaires d'émission (λ_{exc} = 495 nm) et d'excitation (λ_{emF} = 543 nm) de fluorescence, dans l'eau et le toluène, à 20°C, pour les particules à différents taux en BDPMA.

		eau		toluène	
Exp.	n_{BDPMA}	$< A_F >$	$< A_{exc} >^a$	$< A_F >$	$< A_{exc} >^a$
CG38C	0,3	-0,016	-0,005	+0,014	-0,002
CG174B	1,1	-0,014	-0,003	-0,019	-0,009
CG178B	2,1	-0,021	-0,005	-0,025	-0,015
CG144B	3,0	-0,006	+0,003	-0,002	-0,002

[a] Valeurs moyennes calculées sans tenir compte du pic d'excitation.

Les anisotropies stationnaires sont nulles, aussi bien dans l'eau que dans le toluène. Les transferts d'énergie entre BDPMA au sein des nanoparticules sont donc efficaces dans tous les cas et la concentration en BDPMA n'en est pas un critère discriminant.

Il s'agit maintenant d'estimer la vitesse de ce transfert d'énergie entre BDPMA. Pour cela, des mesures d'anisotropie d'émission de fluorescence résolues en temps ont été réalisées.

Anisotropie de fluorescence résolue en temps

Les déclins d'anisotropie des NPFs dans l'eau et des chaînes dans le toluène sont présentés sur la FIGURE 3.12.

Que ce soit dans l'eau ou dans le toluène, lorsque la concentration en BDPMA au cœur des NPFs augmente, les déclins d'anisotropie sont plus rapides.

Dans l'eau, à partir de 1 BDPMA par chaîne polymère, les déclins d'anisotropie sont extrêmement rapides, de l'ordre de la picoseconde. Il n'est pas possible d'en extraire un temps caractéristique de transfert d'énergie (ajustement des courbes par des exponentielles, calculs de durées de vie moyennes) car ils sont à la limite de résolution de l'appareil : ils sont contenus dans l'impulsion laser. Pour l'échantillon le plus dilué en BDPMA (0,3 par chaîne), le temps de demi-vie du déclin d'anisotropie (τ pour A = 0,2) a pu être estimé à 3×10^{-2} ns. En comparant cette durée de vie à la demi-vie de fluorescence des NPFS ($\tau_{1/2} = 5$ ns), le nombre de transferts d'énergie ou sauts effectués entre fluorophores avant d'émettre de la fluorescence est d'environ 150-200, sachant que pour cet échantillon, il y a environ 530 BDPMA par NPF. Cette étude n'a pas pu être effectuée pour les autres échantillons, encore une fois à cause de la limite de résolution de l'appareil. Il faudrait utiliser des appareils de spectroscopie ultra-rapide de type pompe-sonde pour arriver à mesurer de tels temps.

Néanmoins, d'une manière qualitative, il peut être observé que plus la concentration en BDPMA augmente au sein des NPFs, plus les transferts d'énergie sont efficaces.

Les déclins dans le toluène sont plus lents que ceux dans l'eau, ce qui était prévisible car les BDPMA sont beaucoup moins proches. Le déclin d'anisotropie des chaînes contenant moins d'un BDPMA (0,3) correspond certainement à une dépolarisation de la lumière due aux mouvements vibrationnels de la chaîne. Ces déclins ne peuvent pas être ajustés par des doubles exponentielles décroissantes, même en fixant une des durées de vie vers 0,1-0,5 ns (mouvements vibrationnels de la chaîne polymère). Une analyse par durées de vies moyennes n'a pas non plus donné des résultats satisfaisants à cause du bruit sur la mesure. Qualitativement, les mêmes observations que précédemment peuvent être faites, à savoir un transfert d'énergie d'autant plus efficace lorsque la concentration en BDPMA augmente au sein d'une chaîne polymère.

Le transfert d'énergie entre BDPMA est donc efficace au sein des nanoparticules et il est d'autant plus rapide que les BDPMA sont proches. Cette propriété peut être mise à profit lors de l'élaboration de senseurs. En effet, si une molécule peut inhiber la fluorescence d'un fluorophore (en surface des NPFs par exemple), par effet d'antenne une série de fluorophores seront alors éteints (au cœur des NPFs). Ce type de senseur présente un meilleur contraste que ceux où les fluorophores au cœur des NPFs resteraient allumés quel que soit l'état de la molécule inhibante.

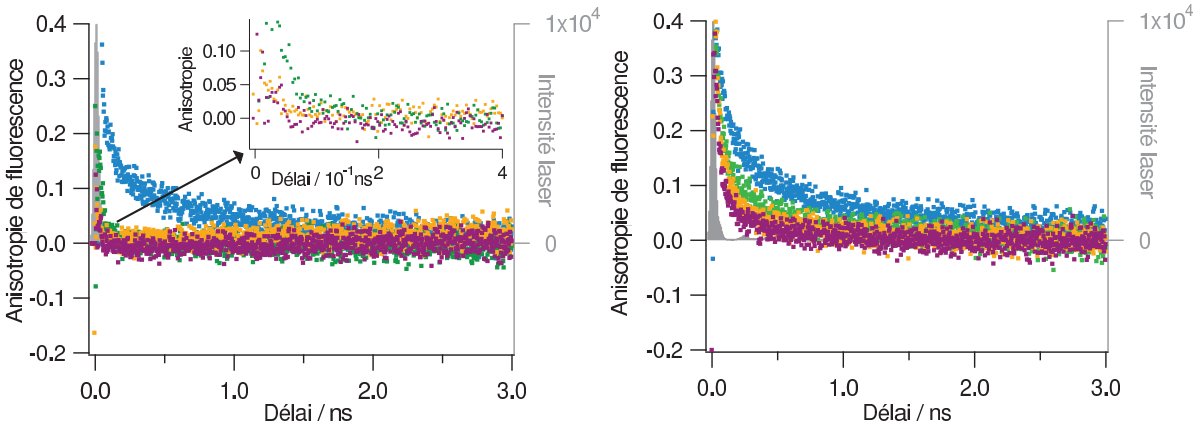


FIGURE 3.12 – Anisotropies résolues en temps des nanoparticules à différents taux de BDPMA par chaîne (0,3 • • •, 1,1 • • •, 2,1 • • •, 3,0 • • •) (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm) et impulsion laser (-). Gauche : dans l'eau. Droite : dans le toluène.

3.5 Conclusion

Le fluorophore BDPMA possède des propriétés spectroscopiques particulièrement adaptées pour la fabrication de NPFs destinées à l'imagerie *in vitro* ou à l'élaboration de senseurs. Lorsqu'il est concentré dans des NPFs à cœur PS et à couronne hydrophile PEO-*b*-PAA, il y a formation d'agrégats peu ou pas fluorescents. Ces agrégats ont un impact sur la durée de vie de fluorescence des NPFs ainsi que sur leur rendement quantique. Néanmoins, bien que le rendement quantique de fluorescence diminue lorsque la concentration en BDPMA augmente, la brillance, elle, augmente. Pour des NPFs comprenant 3 BDPMA par chaîne, la brillance est même 100 à 1000 fois supérieure à celle des QDs.

Ces agrégats de BDPMA avaient été présupposés lors de la synthèse des NPFs. En effet, une étude cinétique de la copolymérisation du BDPMA avec le styrène avait mis en évidence que le fluorophore était très rapidement incorporé dans la chaîne de copolymères et qu'il était réparti graduellement de la couronne vers le cœur des objets. Ces agrégats peuvent également être dûs à la proximité des chaînes polymères au cœur des NPFs.

Dans l'idée de garder le même nombre de fluorophores par particule mais d'en augmenter encore plus la brillance, deux possibilités peuvent être envisagées :

- homogénéiser la répartition des fluorophores le long de la chaîne polymère ;
- utiliser des fluorophores dits encombrés, ayant une tendance limitée à s'agréger à l'état solide.

Le chapitre suivant présentera ces deux approches à travers la synthèse de nouveaux monomères dérivés BODIPY et la synthèse des NPFs correspondantes.

Enfin, des études d'anisotropie de fluorescence stationnaires et résolues en temps ont permis de montrer que les transferts d'énergie entre fluorophores étaient efficaces et très rapides. Cette propriété est intéressante lors de l'élaboration de senseurs.

Chapitre 4 : Modification du cœur fluorescent

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que lorsque la concentration en BDPMA augmente, le rendement quantique et la durée de vie moyenne de fluorescence des NPFs diminuent (§3.3). Cet effet a été attribué à la présence d'agrégats de BDPMA peu ou pas fluorescents au cœur des NPFs. Ces agrégats proviennent peut-être de la répartition du BDPMA dans les chaînes polymères. En effet, lors de la polymérisation, le BDPMA est incorporé plus rapidement que le styrène dans le copolymère (§2.6.2), induisant probablement un gradient de fluorophores.

Il est courant d'observer une diminution du rendement quantique de fluorescence en phase condensée de BODIPY [193]. Les deux principales raisons de cette extinction de fluorescence sont, d'une part, le faible déplacement de Stokes des BODIPY favorisant les homotransferts d'énergie (type Förster ou Dexter), d'autre part, la planéité du noyau émissif favorisant les interactions de type π-π en phase condensée [306]. Deux stratégies principales peuvent être envisagées pour diminuer ces interactions entre molécules au sein des NPFs, tout en gardant une concentration en BODIPY importante. La première consiste à augmenter l'encombrement stérique sur les substituants introduits sur le noyau émissif. La seconde consiste à augmenter la distance intermoléculaire entre fluorophores.

Ces deux approches ont été abordées afin d'augmenter la brillance des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BODIPY).

Dans un premier temps, nous verrons la synthèse de monomères fluorescents porteurs de groupements aromatiques et leur incorporation au cœur des NPFs. Ces monomères, en plus d'être encombrés, ont une émission de fluorescence décalée vers le rouge ce qui peut être intéressant pour d'éventuelles applications en biologie. Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. O'Shea de l'université College de Dublin, des dérivés polymérisables Aza-BODIPY, ayant également une émission de fluorescence décalée vers le rouge, ont été incorporés dans les NPs polymères.

La seconde partie abordera la modulation de la distribution des monomères de BODIPY dans les chaînes polymères par modification de leur rapport de réactivité vis-à-vis du styrène. Cela est rendu possible en modifiant la fonction polymérisable portée par les monomères BODIPY.

4.1 Modification sur les positions 3 et 5 du BODIPY

Une des stratégies pouvant être employées afin de diminuer la formation d'agrégats consiste à travailler avec des BODIPY possédant des groupements encombrés. Ces groupements peuvent être insérés :

- en positions 2 et 6 par couplage de type Suzuki ou Sonogashira sur le pyrrole [307] ;
- sur le bore en remplaçant les liaisons bore-fluor par des liaisons bore-carbone [308, 309] ;
- sur la position méso [310] en variant la nature de l'aldéhyde impliqué dans la synthèse de BODIPY ;
- en positions 3 et 5 du pyrrole par couplage de Suzuki [311] ou par synthèse de pyrroles en utilisant par exemple la synthèse de Trofimov [44, 45].

Ce dernier cas de substitution a été développé au laboratoire dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Trofimov de l'Institut de Chimie d'Irkoutsk en Russie. Plusieurs séries de BODIPY ont ainsi été synthétisées [45, 312] et leurs propriétés à l'état solide étudiées [193, 313, 314, 315]. Étonnamment, la nature (saturée ou insaturée) des groupements portés par le BODIPY semble avoir peu d'influence sur les propriétés émissives à l'état solide. Des résultats ont montré qu'il ne fallait pas seulement considérer la faculté des groupements à réaliser des interactions de type π-π, mais qu'il fallait également prendre en compte l'angle formé entre le noyau BODIPY et les substituants.

Ces modifications sur le pyrrole n'ont pas comme seule conséquence d'augmenter la fluorescence des BODIPY à l'état solide : elles décalent également l'émission de fluorescence vers le rouge par extension de conjugaison du système π (Figure 4.1). Ces propriétés sont intéressantes pour l'imagerie de biologie *in vivo* comme cela a été évoqué précédemment.

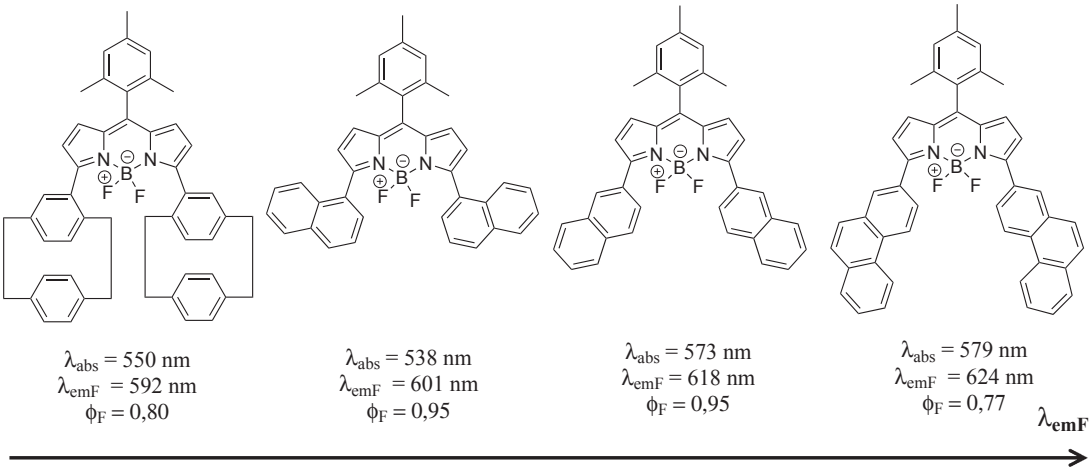


Figure 4.1 – Influence de l'extension de conjugaison en positions 3 et 5 sur les propriétés spectroscopiques du BODIPY en solution.

Il existe peu d'exemples de BODIPY encombrés incorporés dans des NPs polymères. Méallet-Renault, Larpent et coll. ont incorporé des trimésityle-BODIPY dans des latex de PS (D = 15 nm) par une méthode de gonflement [316]. Il n'a pas été possible de doper les latex par plus de 40 molécules, sans doute à cause de leur taille, mais aussi du fort taux de réticulation des latex. Les latex obtenus présentent sensiblement les mêmes propriétés spectroscopiques (λ_{abs} = 545 nm, λ_F = 559 nm, τ = 7 ns) que les fluorophores en solution. Par la même méthode, Rurack et coll. ont incorporé des BODIPY fusionnés à des groupements phénanthrènes dans des latex de PS [180].

4.1.1 Synthèse des monomères encombrés dérivés de BODIPY

Lors de l'élaboration de nouveaux monomères, il faut veiller à ce que les composés ne puissent pas être engagés dans des réactions radicalaires parasites. Or, il est connu que les positions 2 et 6 du BODIPY (sur le pyrrole) peuvent facilement être polymérisées [61], il ne faut donc pas laisser ces positions libres. L'introduction de substituants sur ces positions devrait également défavoriser la formation d'agrégats. Trois monomères, plus ou moins encombrés et ayant un système π plus ou moins étendu ont ainsi été sélectionnés (Figure 4.2).

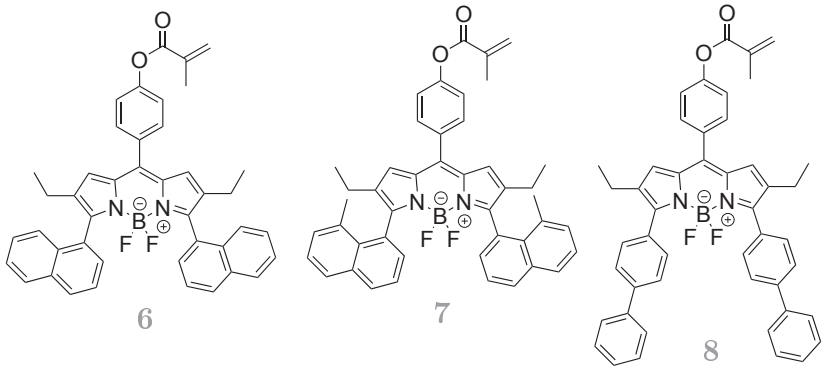
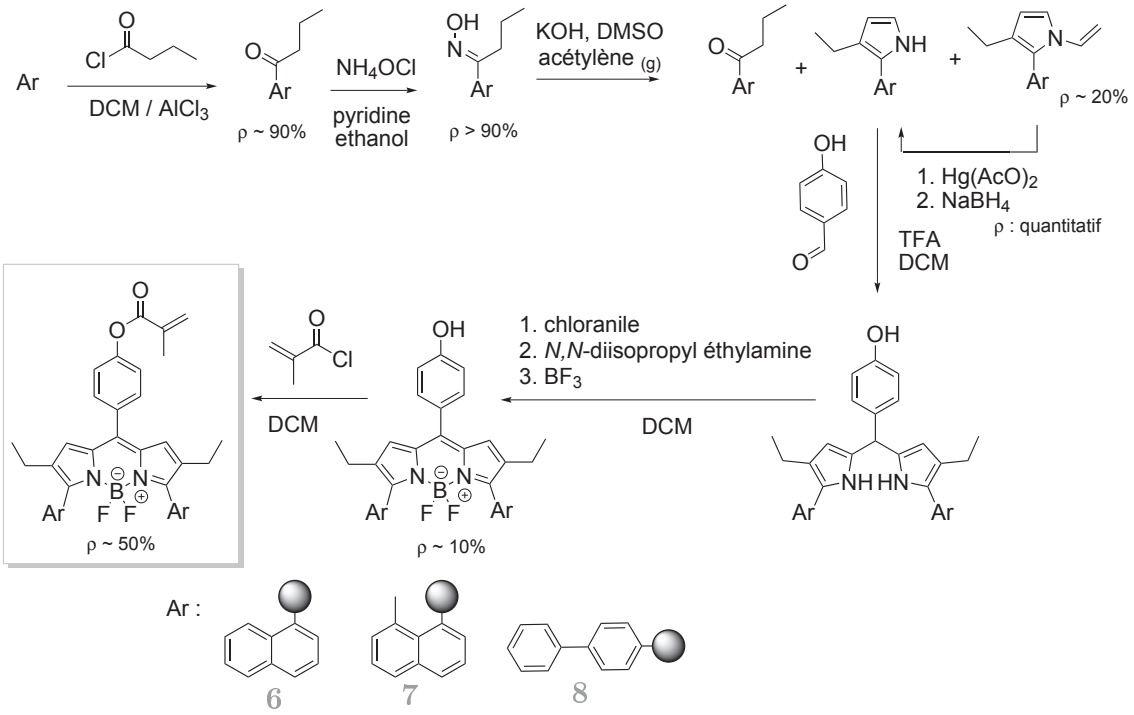


Figure 4.2 – Modifications sur les positions 3 et 5 du BODIPY : nouveaux monomères encombrés ($BDPMA_{Ar}$).

La synthèse de ces monomères est réalisée en cinq étapes (Schème 4.1). Afin de protéger au maximum la fonction polymérisable, celle-ci est introduite en dernier sur des BODIPY encombrés à fonction phénol. L'obtention de ces BODIPY phénols est réalisée à partir de pyrroles fonctionnalisés par des aromatiques. Ces derniers sont obtenus par une réaction de Trofimov qui nécessite la préparation de l'oxime de l'aromatique considéré puis sa réaction avec de l'acétylène (gazeux).

Dans un premier temps, un aromatique est fonctionnalisé en cétone *via* une réaction de Friedel et Craft à l'aide du chlorure de propionyle. Puis, la cétone est convertie en oxime selon une méthode classique de synthèse. Ces deux étapes se font avec un rendement global d'environ 80 %.



Schème 4.1 – Synthèse des nouveaux monomères BODIPY modifiés en positions 3 et 5.

Tableau 4.1 – Rendements des différentes étapes de synthèse des nouveaux monomères encombrés dérivés BODIPY présentées Schème 4.1.

Ar	cétone	oxime	*N*-vinyl pyrrole	pyrrole[a]	BDP-OH	BDP-MA
6	93	>95	26	46	$\sim$4	$\sim$50
7	86	90	12	$>$95	$\sim$10	$\sim$50
9	72	95	20	95	16	$\sim$30

[a] Pyrrole obtenu par déprotection du *N*-vinyl pyrrole.

La synthèse du pyrrole est ensuite réalisée par une réaction de Trofimov [44] : l'oxime est placée dans une solution très basique de KOH dans le DMSO puis le milieu réactionnel est chauffé à 120°C. Une fois la température stabilisée, un flux d'acétylène est installé pendant environ 5h. À l'issue de la réaction, trois produits sont généralement recueillis après une chromatographie sur gel d'alumine : le pyrrole, le *N*-vinyl pyrrole ainsi que la cétone de départ. Dans notre cas, le pyrrole et la cétone ont toujours été obtenus à l'état de traces, alors que les *N*-vinyl pyrroles ont été obtenus avec des rendements d'environ 20 % (Tableau 4.1). À l'avenir, il pourrait être intéressant de réduire le temps de la réaction de Trofimov afin d'éviter la formation du *N*-vinyl pyrrole qui est un produit de surréaction (réaction de l'acétylène sur le pyrrole). Ce dernier est néanmoins utile puisqu'il peut facilement être déprotégé en pyrrole par l'acétate de mercure avec des rendements quasiment quantitatifs.

La synthèse des BODIPY ainsi que l'estérification en dérivé méthacrylate de phényle se font dans les mêmes conditions que pour le BDPMA. Malheureusement, les rendements de synthèse de ces nouveaux BODIPY sont tous faibles ($\rho \approx 10$ %, Tableau 4.1) et il n'a donc pas été possible d'obtenir ces dérivés monomères en grandes quantités. De plus, ces monomères, bien que purifiés sur plaques préparatives et n'ayant qu'une seule tache fluorescente en CCM, présentent des traces de graisses détectées en RMN du ^{1}H et du ^{13}C. Il n'a pas été possible d'éliminer ces graisses et les BODIPY ne sont donc pas totalement purs. Cependant, ils ne contiennent qu'une seule espèce fluorescente très majoritaire et sont donc utilisés tels quels. Remarquons que les monomères BODIPY présentant des groupements aromatiques naphtalènes (**6**) ou méthylnaphtalènes (**7**) sont obtenus sous deux formes atropoisomères [1], observées en RMN du ^{1}H, ^{13}C et ^{19}F.

4.1.2 Caractéristiques spectroscopiques

Les caractéristiques spectroscopiques dans le toluène des monomères encombrés naphtalène **6**, méthylnaphatlène **7** et biphényle **8** sont résumées dans le Tableau 4.2 et sur la Figure 4.3.

Les longueurs d'onde d'émission de fluorescence varient de 591 à 614 nm dans le toluène. Le composé **7** présente un déplacement de Stokes plus important que son analogue **6**. Cela signifie donc qu'il y a une plus grande réorganisation géométrique à l'état excité pour **7** que pour **6**. Tous ces composés présentent un rendement quantique plus faible que le BDPMA et des durées de vie plus courtes. Une comparaison des constantes de vitesse non radiatives k_{nr} montre que cette valeur est plus élevée pour ces BDPMA$_{\mathrm{Ar}}$ que pour le BDPMA (alors que les k_r sont du même ordre de grandeur). Une explication possible à ce phénomène est la libre rotation du groupement phényle en position méso pour ces composés, contrairement au BDPMA (méthyles en positions 1 et 7 bloquant les rotations). Une autre voie de désactivation non radiative peut venir du fait que les longueurs d'onde

1. Type d'isomérie due à la gène stérique de la libre rotation d'un groupement autour d'une liaison σ.

TABLEAU 4.2 – Caractéristiques spectroscopiques, enregistrées dans le toluène à 20°C, des différents monomères $BDPMA_{Ar}$.

monomère	Ar[a]	λ_{abs} nm	λ_F nm	Φ_F	τ[b] ns	k_r $\times 10^8 s^{-1}$	k_{nr} $\times 10^8 s^{-1}$
BDPMA	-	528	540	0,69	4,9	1,41	0,63
6	naphtalène	555	591	0,52	3,2	1,63	1,50
7	méthylnaphtalène	558	600	0,53	3,1	1,71	1,52
8	biphényle	572	614	0,51	2,1	2,43	2,33

[a] Nature des groupements aromatiques introduits en positions 3 et 5 des $BDPMA_{Ar}$. [b] Durée de vie de fluorescence mesurée avec $\lambda_{exc} = 495$ nm et λ_F pris au maximum d'émission de fluorescence pour chaque monomère. Les déclins suivent une fonction monoexponentielle décroissante ($\chi^2 < 1{,}2$).

d'émission de fluorescence de ces composés sont décalées vers les plus grandes longueurs d'onde. En effet, un décalage bathochrome induit nécessairement un rapprochement des niveaux énergétiques S_0 et S_1 et la probabilité des désactivations par conversion interne entre les sous-niveaux énergétiques est donc augmentée.

Trois nouveaux monomères ayant la même fonction polymérisable que le BDPMA ont donc été synthétisés. Ces monomères sont dit encombrés puisqu'ils possèdent des groupements aromatiques en positions 3 et 5 des pyrroles. L'émission de fluorescence de ces nouveaux monomères varie de 591 à 614 nm dans le toluène.

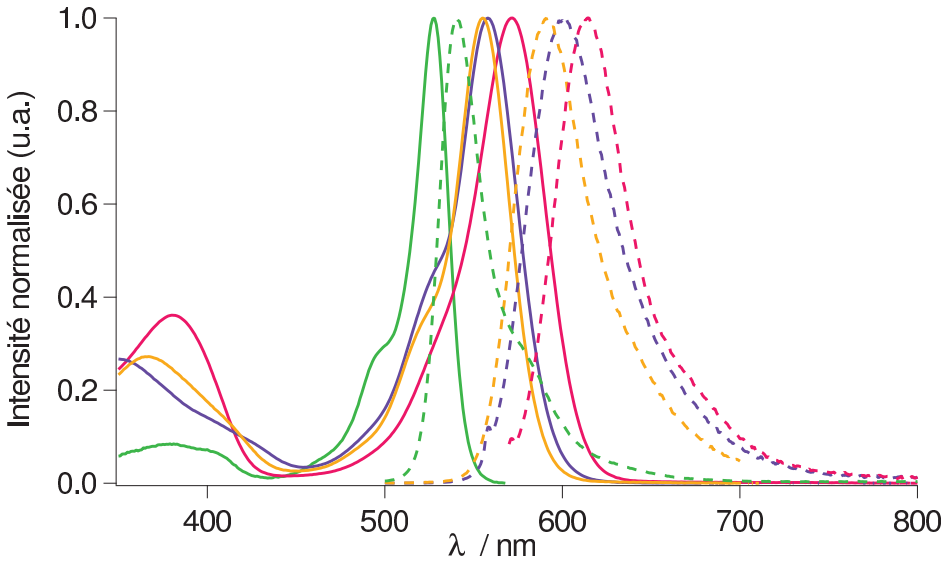


FIGURE 4.3 – Spectres d'absorption (traits continus) et d'émission de fluorescence (traits pointillés) des $BDPMA_{Ar}$ ($C \approx 10^{-6}$M) (**6** : naphtalène -, **7** : méthylnaphtalène -, **8** : biphényle -) et du BDPMA (-), enregistrés dans le toluène.

4.1.3 Synthèse des nanoparticules fluorescentes

Les BODIPY encombrés à fonction polymérisable méthacrylate de phényle ont été employés dans la synthèse de nanoparticules fluorescentes. Étant donné les faibles quantités de produits disponibles, ces synthèses sont menées à 0,2 mol % de $BDPMA_{Ar}$ par rapport au styrène, en utilisant le protocole habituel de polymérisation en miniémulsion "one-pot" (conditions du TABLEAU 2.18). Différentes NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_{Ar}$) ont donc été synthétisées. Les résultats de chaque synthèse sont résumés dans le TABLEAU 4.3.

TABLEAU 4.3 – Résultats expérimentaux des synthèses de NPFs à différents cœurs BODIPY polymérisables encombrés. Les synthèses sont réalisées dans les conditions du système optimisé "one-pot" (TABLEAU 2.18), en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC ($[M]_0/[RAFT]_0$ = 160, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[M]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[BDPMA_{Ar}]_0 = [M]_0 \times 0{,}002$) et arrêtées après 4h.

Exp.	$BDPMA_{Ar}$	$\chi_S^{0\ a}$ %	$\chi_{BDP}^{0\ b}$ %	$\chi_S^{f\ a}$ %	$\chi_{BDP}^{f\ b}$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M_{n\ CES}^{PS}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG167C	**6**	20	43	37	70	8,5	5,3	1,37	55 (0,18)
CG112C	**7**	37	49	79	83	12,9	10,9	1,26	60 (0,13)
CG103C	**8**	28	66	99	91	15,9	11,9	1,30	57 (0,14)
CG144B	BDPMA	24	58	99	98	16,4	21,6	1,25	65 (0,08)

[a] Conversion molaire en styrène (0 : à l'issue de la polymérisation en masse et f : à la fin de la polymérisation), déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte par sonication (25 %). [b] Conversion molaire en monomère BODIPY (0 : à l'issue de la polymérisation en masse et f : à la fin de la polymérisation), déterminée par CES en utilisant une détection UV-vis. réglée sur la longueur d'onde d'absorption maximale de chaque monomère fluorescent.

Toutes les NPFs obtenues ont des diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 60 nm, c'est-à-dire similaires à celui des NPFs à cœur BDPMA. Dans l'ensemble, il y a incorporation complètes des $BDPMA_{Ar}$ aux chaînes polymères comme le prouve la détection par UV-vis. en CES (FIGURE 4.4). Pour toutes ces synthèses, à l'issue de la polymérisation en masse (70 min), les $BDPMA_{Ar}$, comme le BDPMA, ont une conversion supérieure à celle du styrène. Ces nouveaux dérivés BODIPY monomères, ayant la même fonction polymérisable que le BDPMA, semblent donc également être incorporés au début de la chaîne polymère. Néanmoins, toutes les polymérisations n'atteignent pas les mêmes taux de conversion que celles réalisées en présence de BDPMA : les conversions molaires globales, quasiment identiques à celles du styrène, varient de 37 à 99 % lorsqu'on passe du $BDPMA_{Ar}$ **6** à **8**.

Le monomère **8** à groupements biphényles atteint un taux de conversion élevé (χ_{BDP} > 90 %) et ne semble par perturber la polymérisation ($\chi_{globale}$ = 99 %). En revanche, le monomère **6** (naphtalène) plafonne à 70 % de conversion et pour cette synthèse la

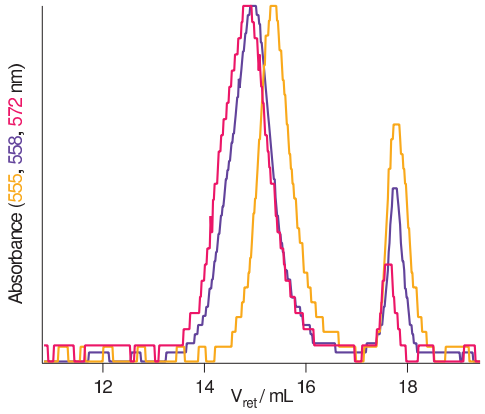


FIGURE 4.4 – Chromatogrammes d'exclusion stérique pour les polymères issus des NPFs à différents cœurs fluorescents dérivés BODIPY encombrés, détection par absorbance : **6** : naphtalène - (λ_{abs} = 555 nm), **7** : méthylnaphtalène - (λ_{abs} = 558 nm), **8** : biphényle - (λ_{abs} = 572 nm).

polymérisation du styrène s'arrête à 37 % de conversion. Cette synthèse a été réalisée une seconde fois pour vérifier cet effet et les mêmes résultats ont été obtenus. Enfin, le monomère **7** (méthylnaphtalène) atteint un taux de conversion élevé (83 %) et retarde légèrement la polymérisation du styrène (79 %).

Il semble donc que, selon la nature des groupements aromatiques présents sur les $BDPMA_{Ar}$, la copolymérisation du styrène avec les $BDPMA_{Ar}$ soit plus ou moins retardée. Cet effet est ressenti alors que seulement 0,2 mol % de ces monomères ont été utilisés. Le groupement phényle en position méso de ces monomères est plus libre de rotation que sur le BDPMA à cause de l'absence de groupement méthyles en positions 1 et 7 des pyrroles. Il se peut qu'il y ait, pour ces monomères, une légère conjugaison entre la fonction polymérisable et le noyau BODIPY (dépendant de l'angle formé entre le phényle en position méso et le noyau émissif). Par ailleurs, les aromatiques encombrés sont également plus ou moins conjugués avec le pyrrole. On pourrait donc penser à un effet de la structure générale des $BDPMA_{Ar}$, ayant une propension à stabiliser les radicaux propageants. Le monomère **6** aux groupements naphtalène est certainement le plus retardateur à cause de la forte tendance à stabiliser les électrons de cet aromatique. Remarquons tout de même que des agents RAFT portant un groupement naphtalène en positions R ou Z ont été utilisés avec succès dans des polymérisations radicalaires en solution sans qu'un effet de retard n'ait été constaté [317, 318].

Bien que ces NPFs n'aient pas des conversions molaires en styrène et en monomères fluorescents très élevées, elles ont tout de même été étudiées en spectroscopie de fluorescence.

4.1.4 Propriétés spectroscopiques des NPFs

Les propriétés spectroscopiques de ces nanoparticules à cœur $BDPMA_{Ar}$ ont été analysées afin de voir si les propriétés du monomère étaient conservées ou modifiées après la polymérisation. Ces caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4.4.

Tableau 4.4 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différents cœurs fluorescents à base de $BDPMA_{Ar}$ ([$BDPMA_{Ar}$] ≈ 0,2 mol %) enregistrées dans l'eau à 20°C.

exp.	Ar[a]	λ_{abs} nm	λ_F nm	Φ_F	$\overline{\tau}$ ns	k_r $\times 10^8 s^{-1}$	k_{nr} $\times 10^8 s^{-1}$
CG38C	BDPMA	529	544	0,56	5,8	0,97	0,76
CG167C	naphtalène : **6**	556	598	0,48	4,1	1,17	1,27
CG112C	méthylnaphtalène : **7**	558	601	0,42	6,2	0,68	0,94
CG103C	biphényle : **8**	570[c]	613[c]	0,42[c]	n.a.[c]	-	-

[a] Nature de l'aromatique introduit en positions 3 et 5 des monomères BODIPY. [b] Durée de vie moyenne calculée à l'aide de l'équation 3.2. [c] L'échantillon se dégrade, les valeurs renseignées ont été mesurées environ une semaine après la synthèse de NPFs. Le déclin n'ayant pas été enregistré avant dégradation, il n'a pas pu être analysé.

Les particules à cœur $BDPMA_{Ar}$ naphtalène **6** présentent les mêmes bandes d'absorption et d'émission de fluorescence que le monomère (Figure 4.5). Le rendement quantique de fluorescence n'est que très peu diminué dans la matrice polymère (de 8 % contre 20 % pour le BDPMA dans des concentrations comparables). Le déclin de fluorescence de ces NPFs dans l'eau présente une composante très rapide au début puis une composante longue. La durée de vie de fluorescence moyenne de ces NPFs dans l'eau est de 4,1 ns, supérieure à celle du monomère en solution.

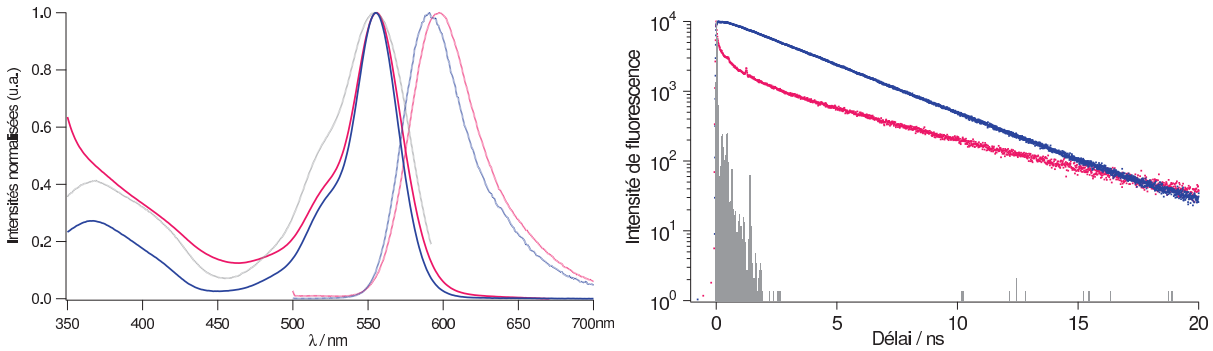


Figure 4.5 – Spectres des NPFs à cœur $BDPMA_{Ar}$ portant des groupements naphtalènes (**6**) enregistrés dans l'eau (-) et du monomère correspondant (**6**) enregistrés dans le toluène (-). Gauche : spectres d'absorption (traits continus), d'émission de fluorescence (traits pointillés, λ_{exc} = 495 nm) et d'excitation des NPFs (-, λ_F = 591 nm). Droite : déclins de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 591 nm) et impulsion laser.

Pour les particules à cœur $BDPMA_{Ar}$ méthylnaphtalène **7** dans l'eau, les mêmes bandes d'absorption et d'émission de fluorescence sont observées que pour le monomère dans le toluène (FIGURE 4.6). Le rendement quantique de fluorescence est diminué de 20 % environ dans la matrice polymère (similaire au BDPMA). Ces NPFs dans l'eau ont en revanche une durée de vie moyenne de fluorescence de 6,2 ns, ce qui est deux fois supérieur à celle du monomère dans le toluène (3,1 ns). Ce déclin peut être ajusté par une fonction biexponentielle décroissante (χ^2 = 1,06). Les durées de vie trouvées sont τ_1 = 3,1 ns (a_1 = 0,27) et τ_2 = 6,5 ns (a_2 = 0,73). La première pourrait correspondre à des agrégats de BODIPY et la seconde à des BODIPY isolés dont la durée de vie de fluorescence est augmentée dans la matrice polymère (comparativement à la solution).

Dans les cas des BODIPY **6** et **7**, les constantes de temps radiatives et non radiatives ont diminué lorsque l'on passe de la solution à la matrice de polymère (TABLEAU 4.2, TABLEAU 4.4). Cela signifie que les molécules restent plus longtemps à l'état excité lorsqu'elles sont incorporées au PS. Cela peut s'expliquer par le fait que les fluorophores dans la matrice polymère ne peuvent plus subir de chocs dûs au solvant (une des voies de désactivation non radiative classique). De plus, les fluorophores dans la matrice rigide peuvent plus difficilement tourner (typiquement selon l'axe autour du phénol) qu'en solution et ainsi se désactiver de leur état excité par cette voie. Enfin, contrairement au BDPMA pour lequel k_{nr} augmente lors du passage au polymère, le fait que le k_{nr} diminue pour ces BODIPY encombrés signifie probablement qu'il y a moins d'agrégats peu ou pas fluorescents formés au sein du cœur des NPFs.

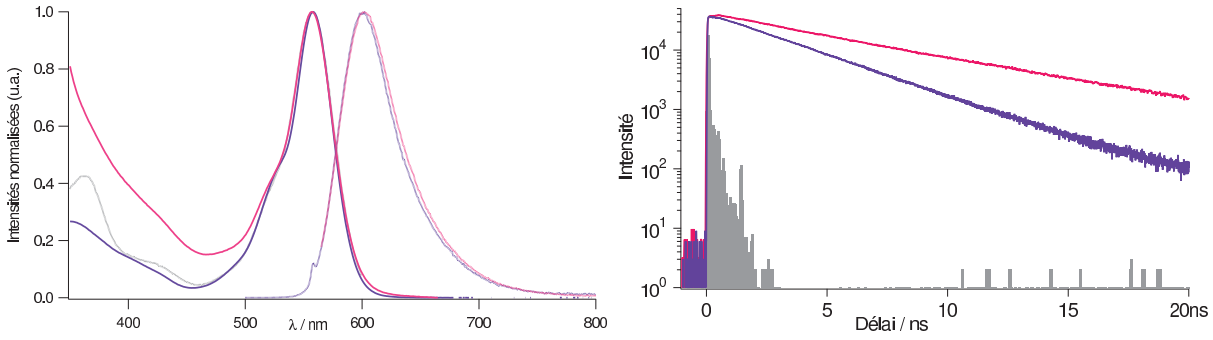


FIGURE 4.6 – Spectres des NPFs à cœur $BDPMA_{Ar}$ portant des groupements méthylnaphtalènes (**7**) enregistrés dans l'eau (-) et du monomère correspondant (**7**) enregistrés dans le toluène (-). Gauche : spectres d'absorption (traits continus), d'émission de fluorescence (traits pointillés, λ_{exc} = 558 nm) et d'excitation des NPFs (-, λ_F = 597 nm). Droite : déclins de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 597 nm) et impulsion laser.

Les particules à cœur $BDPMA_{Ar}$ biphényle (**8**) ne présentent en revanche pas les mêmes bandes caractéristiques que le monomère dans le toluène (FIGURE 4.7, gauche) : sur le spectre d'absorption, une bande à 553 nm est visible. Afin de vérifier l'hypothèse d'un épaulement vibrationnel de la bande $S_0 \rightarrow S_1$ et d'écarter la possibilité d'une seconde espèce absorbante, des spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés en excitant

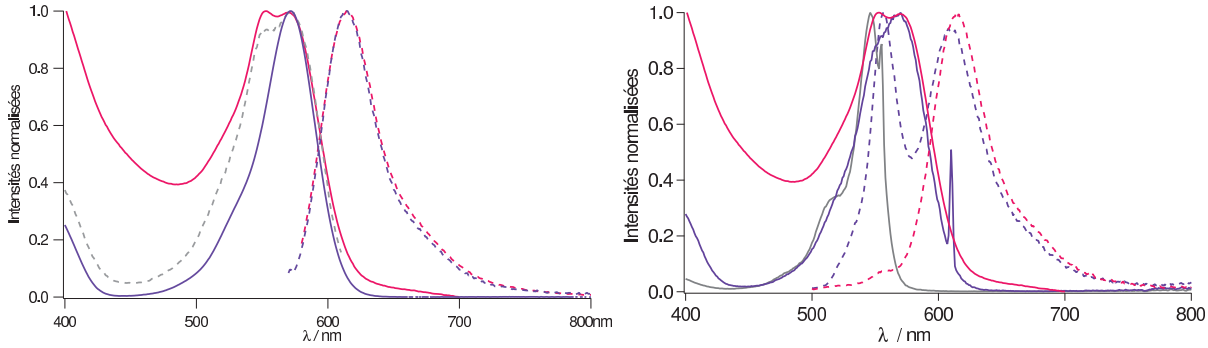


FIGURE 4.7 – Spectres des NPFs à cœur $BDPMA_{Ar}$ biphényle **8**. Gauche : spectres d'absorption (-), d'émission de fluorescence (···, λ_{exc} = 530 nm) et d'excitation (···, λ_F = 615 nm) des NPFs dans l'eau et spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (···) du monomère correspondant **8** dans le toluène. Spectres des NPFs enregistrés une semaine après la synthèse. Droite : spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (··· , λ_{exc} = 495 nm) des NPFs dans l'eau, spectres d'émission (··· , λ_{exc} = 495 nm) et d'excitation (-, λ_F = 555 nm, -, λ_F = 610 nm) de fluorescence des chaînes de copolymères dans le toluène. Spectres enregistrés un mois après la synthèse des NPFs.

les particules à 570 nm et à 550 nm. Dans les deux cas, l'émission de fluorescence est identique à celle du monomère dans le toluène. Enfin, un spectre d'excitation a été réalisé, en prenant comme longueur d'onde d'émission de fluorescence 615 nm. Le spectre d'absorption avec son épaulement est retrouvé. Le fait que l'épaulement soit légèrement moins important dans le spectre d'excitation que dans le spectre d'absorption est certainement dû à l'absence de fond de diffusion dans ce dernier. Il s'agit donc bien d'un épaulement vibrationnel.

Le rendement quantique de fluorescence de ces NPFs est environ 20 % inférieur à celui du fluorophore dans le toluène (TABLEAU 4.4). En mesurant ce rendement quantique un mois après la réalisation de la synthèse, nous nous sommes aperçu qu'il avait chuté de 0,42 à 0,28. De plus, des spectres d'émission de fluorescence des NPFs enregistrés dans l'eau (λ_{exc} = 495 nm) montrent l'apparition d'une bande de fluorescence vers 556 nm, alors que les spectres d'absorption n'ont pas évolué (FIGURE 4.7, droite). Les chaînes de copolymère ont alors été analysées dans le toluène afin de dissocier les éventuels agrégats de $BDPMA_{Ar}$ présents dans les NPFs. Un spectre d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm) a été enregistré et montre l'apparition d'une bande à 557 nm d'une intensité similaire à la bande principale à 614 nm. Il existe donc *a priori* une autre espèce fluorescente au cœur de ces NPFs. Afin de caractériser cette espèce, un spectre d'excitation a été enregistré (λ_F = 555 nm). Ce spectre prouve la présence d'une espèce absorbant à 546 nm et émettant à 557 nm dans le toluène. De plus, l'allure des spectres d'émission et d'excitation de fluorescence laissent penser qu'il s'agit d'un dérivé BODIPY. Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence sont décalées d'environ 20 nm vers les plus fortes longueurs d'onde comparé au BODIPY PM567 (TABLEAU 1.2) ou au BDPMA (TABLEAU 3.1). Cette espèce pourrait donc être un BODIPY clivé en position 8 mais

possédant toujours les groupement biphényles en positions 3 et 7. Enfin, cette espèce, de couleur de fluorescence verte, a été observée par CCM en déposant les NPFs sur plaque de silice (éluant : DCM). Cette espèce migre sur plaque de silice, contrairement au $BDPMA_{Ar}$ copolymérisé avec le styrène, ce qui pourrait confirmer un clivage en position méso. Cette espèce n'était pas présente dans le monomère au moment de la synthèse des NPFs. Une photo-oxydation du $BDPMA_{Ar}$ pourrait en être la cause.

4.1.5 Conclusion

Trois nouveaux monomères $BDPMA_{Ar}$ encombrés ont été copolymérisés au cœur des NPFs. Les NPFs obtenues émettent de 598 à 613 nm avec des rendements quantiques de fluorescence de l'ordre de 0,40 (Figure 4.8). Néanmoins, selon la nature de l'aromatique porté par le noyau BODIPY, certains problèmes ont été rencontrés :

- avec des groupements naphtalène, la copolymérisation est retardée. Cet effet a été attribué à la capacité de ce monomère à stabiliser les radicaux ;
- avec des groupements biphényle, le $BDPMA_{Ar}$, bien que copolymérisé au styrène, se dégrade au cours du temps. Aucune explication n'a été trouvée à ce jour.

Le composé le plus prometteur semble donc être le $BDPMA_{Ar}$ présentant des groupements méthylnaphtalène.

Une autre famille de fluorophores peut être intéressante pour l'imagerie *in vivo* : il s'agit des Aza-BODIPY. Leur copolymérisation au cœur des NPFs est abordée dans le paragraphe suivant.

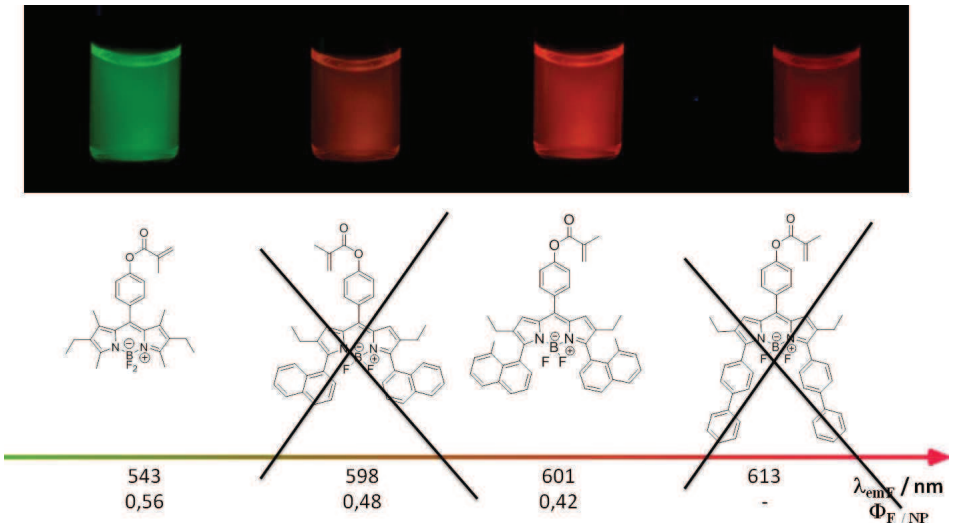
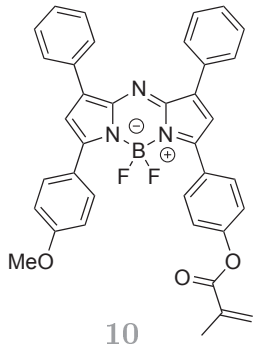


Figure 4.8 – Photographies des différentes NPFs dans l'eau (C = 0, 035 wt %, λ_{exc} = 365 nm) et longueurs d'onde d'émission et rendements quantiques de fluorescence respectifs.

4.2 Utilisation d'Aza-BODIPY

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. O'Shea de l'University College Dublin en Irlande, des Aza-BODIPY ont été testés dans nos NPFs. Les Aza-BODIPY sont des BODIPY dont la position méso est occupée, non pas par un carbone, mais par un azote (§1.2.3). Ces BODIPY sont très intéressants pour l'imagerie médicale car ils émettent vers le rouge, proche infra-rouge. Le doctorant Marco Grossi a ainsi pu venir au PPSM tester un nouveau monomère à fonction méthacrylate. La synthèse de ce monomère asymétrique est réalisée à partir d'un Aza-BODIPY présentant deux phénols en position 3 et 5 [55, 319]. Le bisphénol est désymétrisé par une synthèse de Williamson avec un équivalent de iodométhane. Le méthoxyphénol intermédiaire est estérifié par le chlorure de méthacryloyle. Ce BODIPY présente donc la même fonction polymérisable que le BDPMA. Ce composé a une émission de fluorescence dans le proche infra-rouge (703 nm) et un rendement quantique d'environ 35 %.



10

λ_{abs} = 672 nm / λ_F = 703 nm
Φ_F = 0,35

FIGURE 4.9 – Structure et principales propriétés spectroscopiques dans le chloroforme de l'Aza-BODIPY à fonction méthacrylate, synthétisé en Irlande dans l'équipe du Pr. O'Shea.

Des NPFs à cœur Aza-BODIPY **10** ont été synthétisées dans les conditions classiques "one-pot" (TABLEAU 2.18). Les paramètres des différentes expériences sont résumés dans le TABLEAU 4.5.

La première synthèse (MG1) a été réalisée dans des conditions classiques de synthèse des NPFs en présence de 2 mol % d'Aza-BODIPY. Malheureusement, à l'issue de la polymérisation en masse, les taux de conversion du styrène et de l'Aza-BDOIPY sont nuls. L'inversion de phase est tout de même réalisée mais à la fin de la polymérisation en miniémulsion, les taux de conversion sont toujours nuls.

Avec l'hypothèse que le monomère Aza-BODIPY **10** pouvait retarder la polymérisation, son pourcentage molaire a été divisé par trois (MG2). À l'issue de la polymérisation en masse, la conversion en styrène est toujours nulle. La quantité d'AIBN a alors été triplée par rapport à ce qui avait été introduit au départ et la polymérisation en masse poursuivie durant une nuit (MG2 bis). Un solide bleu est obtenu, avec une conversion

TABLEAU 4.5 – Conditions et résultats expérimentaux des synthèses des NPs à cœur Aza-BODIPY **10**, réalisées dans les conditions classiques "one-pot" (TABLEAU 2.18) en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC ($[M]_0/[RAFT]_0 = 160$, $[M]_0 = 1{,}3$ mol/L_{eau}).

Exp	BODIPY[a] mol %	$[RAFT]_0/[I]_0^b$	t[c] min	$\chi^d_{S,\,0}$ %	couleur$^e_0$	$\chi^d_{S,\,f}$ %	couleur^e_f
MG1	2	3	70	0	vert	0	vert
MG2	0,7	3	70	0	vert	-	-
MG2 bis	0,7	0,5	nuit	80	bleu	-	-
MG4	0,1	3	180	31[e]	vert	99[e]	bleu

[a] Pourcentage molaire en Aza-BODIPY **10** par rapport au styrène. [b] Rapports molaires en macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC et en AIBN au début de la polymérisation. [c] Durée de l'étape de polymérisation en masse. [d] Conversions molaires en styrène déterminées par gravimétrie à l'issue de la polymérisation en masse (0) et à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f). [e] Couleur des suspensions de NPs à l'issue de la polymérisation en masse (0) et à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f).

molaire en styrène de 80%. La polymérisation du styrène en présence de 0,7 mol% de monomère Aza-BODIPY **10** est donc possible mais est bien plus lente qu'en présence de BDPMA. De plus, les propriétés spectroscopiques de l'Aza-BODIPY semblent altérées puisque sa couleur est passée du vert au bleu.

TABLEAU 4.6 – Résultats expérimentaux de la synthèse de NPs à cœur Aza-BODIPY **10** (MG4).

éch.[a]	χ^b_S %	χ^c_{BODIPY} %	$M_{n,\,th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\,SEC}$ kg/mol	IP	D_z (σ) nm
0	31	80	7,0	7,4	1,66	72 (0,19)
f	99	93	15,7	21,4	1,49	71 (0,09)

[a] Échantillon à l'issue de la polymérisation en masse (0) ou à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f). [b] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte de masse due à l'étape de sonication (25 %). [c] Conversion molaire en Aza-BODIPY déterminée par CES en utlisant une détection UV-vis. ($\lambda_{abs} = 450$ nm).

Une dernière expérience a donc été menée en utilisant seulement 0,1 mol % d'Aza-BODIPY **10** (MG4). Après trois heures de polymérisation en masse, la conversion en styrène est de 31%. Dans cette phase organique, la même quantité d'AIBN que celle introduite au départ a été ajoutée afin de forcer la polymérisation. À l'issue de l'inversion de phase, la couleur de la suspension passe de vert à bleu. Après une nuit, la conversion finale en styrène est de 99% et les objets mesurent 70 nm de diamètre ($\sigma = 0{,}09$) (TA-

bleau 4.6). Des clichés de MET (Figure 4.10) confirment ces diamètres et la présence d'objets sphériques. Néanmoins, les NPs semblent légèrement plus polydisperses que celles obtenues en présence de BDPMA.

La copolymérisation de l'Aza-BODIPY avec le styrène a été vérifiée par CES en utilisant une détection UV-vis. (Tableau 4.6 et Figure 4.11). Les chromatogrammes prouvent que l'Aza-BODIPY est bien incorporé dans les chaînes polymères (Figure 4.11). L'Aza-BODIPY se polymérise bien plus rapidement que le styrène (80% de conversion en 290 min, contre 31% de conversion pour le styrène) et sa conversion à la fin de la polymérisation en miniémulsion est élevée (93 %). En revanche, le contrôle de la polymérisation est beaucoup moins bon qu'en présence de BDPMA. À l'issue de la polymérisation en masse et de la polymérisation en miniémulsion, les pics de CES sont multimodaux.

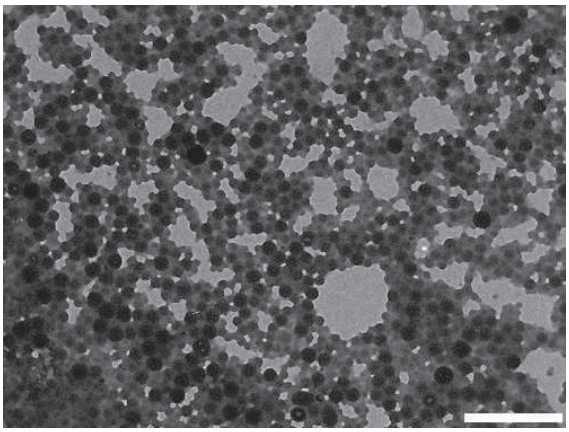


Figure 4.10 – Cliché de MET de NPs à cœur Aza-BODIPY **10** (exp. MG4). Barre d'échelle : 500 nm.

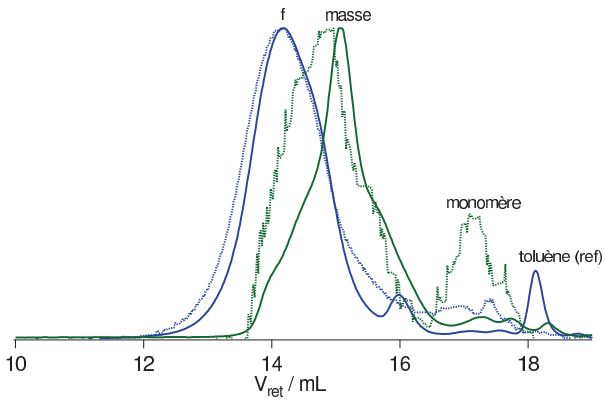


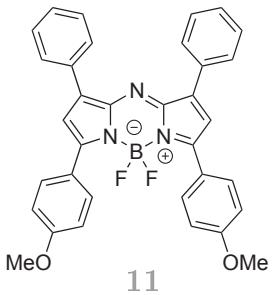
Figure 4.11 – Chromatogrammes d'exclusion stérique enregistrés dans le THF pour les polymères issus des NPFs à cœur Aza-BODIPY **10** (MG4) à l'issue de la polymérisation en masse (-) et à la fin de la polymérisation en miniémulsion (-). Détection RI (-) et UV-vis. (•••, λ = 450 nm).

Ces NPs ont été analysées par spectroscopie d'absorption et de fluorescence. Malheureusement, les spectres d'absorption obtenus n'étaient pas exploitables en raison d'un fort

fond de diffusion. De plus, aucune émission de fluorescence n'a pu être détectée ($\lambda_{exc} = \lambda_{abs}$ max).

Enfin, une dernière expérience avec cet Aza-BODIPY a été menée, à savoir ajouter l'Aza-BODIPY après l'étape de polymérisation en masse. Dans ce cas, le styrène atteint 15% de conversion après 70 min, puis le BODIPY est ajouté et l'inversion de phase faite. La conversion en styrène est de 27% après 2h et n'évolue plus pendant 24h. Le diamètre des particules est de 72 nm, mais la suspension est très polydisperse. Concernant la spectroscopie, le spectre visible présente une bande d'absorption à 610 et un épaulement à 688 nm. Aucune émission de fluorescence n'a pu être mesurée.

Afin de comprendre d'où venaient les problèmes rencontrés durant ces polymérisations, un autre Aza-BODIPY ne présentant pas de fonction polymérisable a été testé (Figure 4.12). Le composé **11** a, lui aussi, les positions 2 et 6 libres sur les groupements pyrroles. Ainsi, il doit pouvoir être possible de déterminer si les problèmes viennent de la structure du BODIPY ou de la fonction polymérisable.



11

Figure 4.12 – Aza-BODIPY non polymérisable, synthétisé en Irlande.

Le composé **11** a ainsi été utilisé dans une synthèse "one-pot" classique. À l'issue de la polymérisation en masse, la conversion en styrène est nulle. L'inversion de phase a tout de même été faite mais les gouttes obtenues étaient polydisperses. Après 12h de polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène est toujours nulle.

Les problèmes rencontrés avec ces Aza-BODIPY sont donc certainement dûs à leur structure. Nous pensons que cela provient des positions 2 et 6 libres sur les unités pyrroles, pouvant intervenir dans des réactions radicalaires [61].

4.3 Modification de la fonction polymérisable

Dans le chapitre 2, nous avons vu que le BDPMA est très rapidement incorporé dans les chaînes polymères. Ce gradient de BDPMA est certainement en partie à l'origine des agrégats peu ou pas fluorescents présents au cœur des NPFs mis en évidence dans le chapitre 3.

Un moyen de prédire la répartition des monomères dans une copolymérisation est de raisonner avec leurs rapports de réactivité. Les rapports de réactivité r_A et r_B d'une paire de monomères sont définis comme étant le rapport des constantes de vitesse des différentes équations de propagation (modèle terminal ici) :

$$\sim M_A^\bullet + M_A \rightarrow \sim M_A M_A^\bullet \quad k_{AA} \tag{4.1}$$

$$\sim M_A^\bullet + M_B \rightarrow \sim M_A M_B^\bullet \quad k_{AB} \tag{4.2}$$

$$\sim M_B^\bullet + M_B \rightarrow \sim M_B M_B^\bullet \quad k_{BB} \tag{4.3}$$

$$\sim M_B^\bullet + M_A \rightarrow \sim M_B M_A^\bullet \quad k_{BA} \tag{4.4}$$

où :	$\sim M_i^\bullet$	représente une chaîne de polymère en croissance terminant avec le radical du monomère i (A ou B)
	k_{AA} et k_{BB}	constantes de vitesse d'homopolymérisations
	k_{AB} et k_{BA}	constantes de vitesse de polymérisations croisées
et :		$r_A = k_{AA}/k_{AB}$
		$r_B = k_{BB}/k_{BA}$

En polymérisation radicalaire, pour une paire de monomères dont les rapports r_A et r_B sont tous les deux très inférieurs à 1, ces deux monomères auront une tendance à l'alternance. En revanche, si r_A et r_B sont supérieurs à 1, il y aura tendance à la formation de copolymères à blocs.

Le BDPMA présente une fonction polymérisable de type méthacrylate de phényle. Les rapports de réactivité entre le styrène et un méthacrylate de phényle sont renseignés dans le Polymer Handbook et sont respectivement de $r_{MA\phi/S} = 0,51$ et $r_{S/MA\phi} = 0,25$ [302]. Cela traduit une tendance à l'alternance des deux monomères, tout en ayant une réactivité plus grande pour le méthacrylate de phenyle (MAϕ), c'est à dire le BDPMA. Cette réactivité accrue du BDPMA par rapport au styrène amène à une répartition en gradient des fluorophores au sein des chaînes de PEO-*b*-PAA-*b*-P(S-*co*-BDPMA) et de fait au cœur des nanoparticules.

Dans le but d'augmenter le rendement quantique de fluorescence des nanoparticules, une des stratégies consiste à répartir de façon plus homogène les fluorophores le long des chaînes de copolymères. Ainsi, en utilisant des monomères fluorescents ayant des réactivités similaires au styrène, il devrait être possible de diminuer le gradient de fluorophores. En comparant dans la littérature les rapports de réactivité du styrène vis-à-vis de monomères classiques, nous pouvons retenir quatre fonctions polymérisables d'intérêt, résumées dans le Tableau 4.7.

Tableau 4.7 – Rapports de réactivités théoriques entre le styrène (monomère A) et des monomères modèles (B) (valeurs moyennes issues de [302]).

fonction polymérisable (B)	abréviation	r_A	r_B
méthacrylate de phényle	MAϕ	0,25	0,50
acrylate de phényle	Aϕ	-	-
méthacrylate d'éthyle	MAEt	0,60	0,30
acrylate d'éthyle	AEt	0,80	0,20
styrène	S	1,0	1,0

Pour tous ces monomères, pour une copolymérisation avec le styrène, les rapports r_A et r_B sont inférieurs ou égaux à 1 et trois types de répartition peuvent espérer être obtenues (dans le cas où les compositions initiales en monomères seraient équimolaires) :

- une répartition statistique du fluorophore le long de la chaîne dans le cas d'un monomère dérivé styrène ($r_A = r_B = 1$) ;
- une tendance à l'alternance des monomères avec un gradient de fluorophore plus concentré vers l'extrémité de chaîne dans le cas des dérivés fluorophores à fonction acrylate d'éthyle ou méthacrylate d'éthyle ($r_B < r_A < 1$) ;
- une tendance à l'alternance des monomères avec un gradient de fluorophore plus concentré vers le début des chaînes dans le cas des dérivés fluorophores à fonction méthacrylate de phényle ($r_A < r_B < 1$).

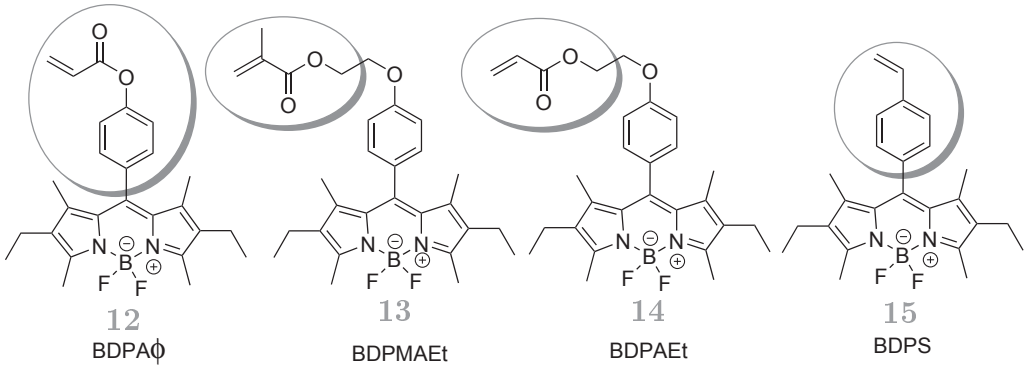


Figure 4.13 – Nouveaux BODIPY à différentes fonctions polymérisables utilisés dans cette étude.

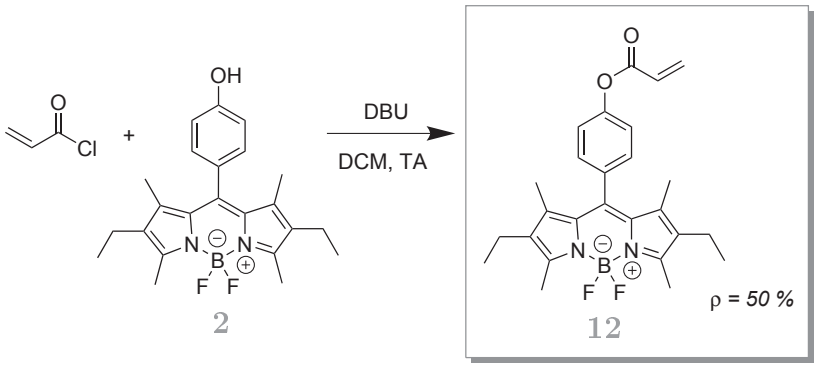
En travaillant avec des dérivés monomères BODIPY ayant une fonction soit méthacrylate d'éthyle, soit acrylate d'éthyle, soit styrène, trois répartitions du BODIPY peuvent être attendues, et donc *a priori* trois comportements spectroscopiques différents. Une autre fonction polymérisable, dont le rapport de réactivité avec le styrène n'est pas tabulée dans le polymer Handbook, est également intéressante à tester. Il s'agit de l'analogue du méthacrylate de phényle : l'acrylate de phényle. À titre indicatif, le styrène et l'acrylate de 2-carboxyphényle ont des rapports de réactivité de $r_A = 0{,}49 \pm 0{,}04$ et $r_B = 0{,}61 \pm 0{,}06$

[320]. Ce monomère pourrait donc avoir une réactivité intermédiaire entre un monomère à fonction méthacrylate de phényle et méthacrylate d'éthyle.

Quatre nouveaux monomères ont ainsi été retenus (FIGURE 4.13). Ces monomères sont tous des dérivés du krypto-BODIPY ayant un noyau benzénique en position méso.

4.3.1 Synthèse de nouveaux dérivés BODIPY à fonctions polymérisables différentes

La synthèse du monomère à fonction acrylate de phényle (Aϕ) **12** est similaire à celle du BDPMA(SCHÈME 4.2). Il s'agit de réaliser une estérification du BODIPY phénol **2** par le chlorure d'acryloyle en milieu organique basique (ρ = 50 %).



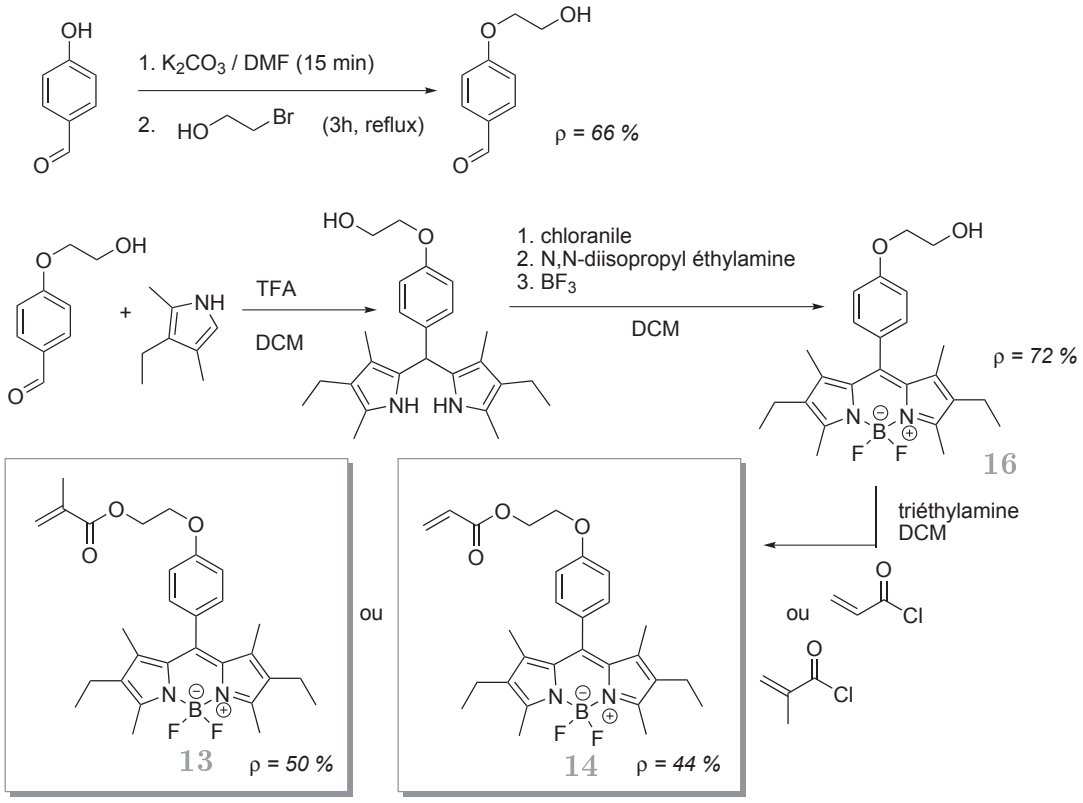
SCHÈME 4.2 – Synthèse du BODIPY à fonction acrylate de phényle.

Les synthèses des monomères à fonction méthacrylate d'éthyle (MAEt) **13** et acrylate d'éthyle (AEt) **14** sont similaires et sont réalisées en trois étapes (SCHÈME 4.3) :

- synthèse du 4-(2-hydroxyéthoxy)benzaldéhyde par une réaction de Williamson entre le 4-hydroxybenzaldéhyde et le 2-bromoéthanol [321],
- synthèse du dérivé BODIPY **16** à partir de l'aldéhyde précédent,
- estérification du BODIPY **16** avec du chlorure de méthacryloyle pour donner le monomère **13** ou avec du chlorure d'acryloyle pour donner le monomère **14**.

Il est à noter qu'il n'a pas été possible d'obtenir le BODIPY **16** directement à partir du BODIPY phénol **2** par cette même réaction de Williamson (K_2CO_3 dans le DMF ou K_2CO_3 dans le THF) car dans tous les cas une dégradation du BODIPY est observée. Dans ce cas d'une déprotonation du BODIPY phénol **2** par le DBU dans le THF, la déprotonation du phénol a bien lieu, mais aucune substitution nucléophile n'est observée. Enfin, le méthacrylate de 2-bromoéthyle a été synthétisé, puis la substitution nucléophile sur le BODIPY **2** avec du K_2CO_3 dans le DMF a été faite, mais n'ont ainsi été obtenus que des produits de dégradation.

La synthèse du BODIPY à fonction styrène (S) est quant à elle plus difficile à réaliser. En effet, l'obtention du chlorure de 4-vinylbenzoyle, nécessaire à la formation du BODIPY styrénique, nécessite quatre étapes (SCHÈME 4.4) :



Schème 4.3 – Synthèse des BODIPY monomères à fonction acrylate ou méthacrylate

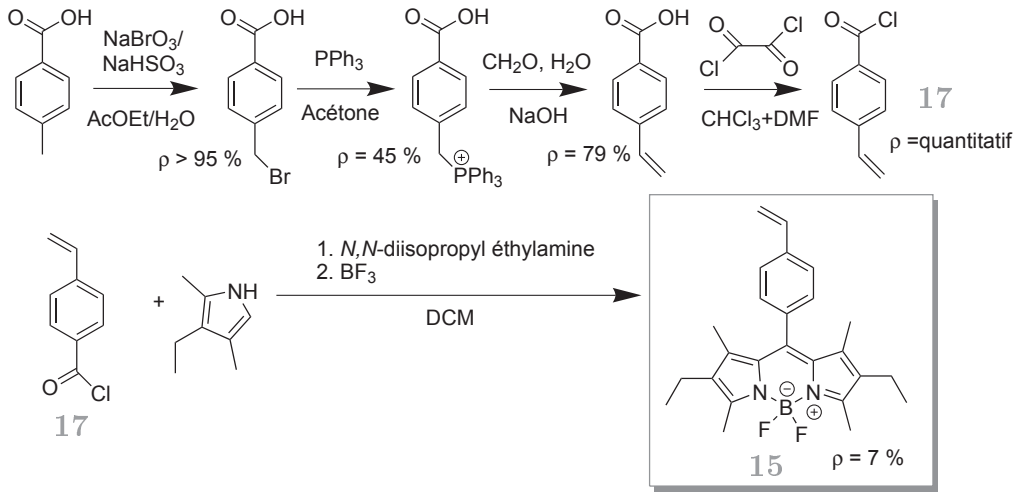
- bromation de l'acide 4-méthylbenzoïque pour obtenir l'acide 4-bromométhylbenzoïque,
- obtention du sel de triphénylphosphonium par substitution nucléophile de la triphénylphosphine sur l'acide 4-bromométhylbenzoïque (réaction d'Arbuzov),
- addition nucléophile de l'ylure de phosphore sur du formaldéhyde, formant ainsi l'oxyde de triphénylphosphine ainsi que l'acide 4-vinylbenzoïque (réaction de Wittig),
- chloration de l'acide 4-vinylbenzoïque à l'aide du chlorure d'oxalyle afin d'obtenir le chlorure de 4-vinylbenzoyle.

Le rendement total de ces quatre étapes (34 %) est satisfaisant.

Enfin, à partir du chlorure de 4-vinylbenzoyle, le BODIPY dérivé styrène **15** est obtenu en 3 étapes "one-pot", par une synthèse classique de BODIPY (Schème 4.4). Malheureusement, le rendement de cette dernière étape est faible (7 %).

La synthèse d'un dérivé styrène a également été réalisée en procédant à une estérification entre le BODIPY phénol **2** et le chlorure de 4-vinylbenzoyle. Malheureusement, aucun produit n'a pu être isolé.

Tous ces nouveaux dérivés BODIPY sont obtenus sous forme de solides orange foncé. Ils sont solubles dans les solvants chlorés, l'acétone et le toluène et partiellement solubles dans les alcools.



Schème 4.4 – Synthèse du BODIPY à fonction styrène

4.3.2 Propriétés spectroscopiques des monomères

Les caractéristiques spectroscopiques de ces quatre nouveaux monomères sont présentées sur la Figure 4.14 et dans le Tableau 4.8.

Tous ces nouveaux composés présentent sensiblement les mêmes caractéristiques spectroscopiques, à savoir :

- un maximum d'absorption vers 527-528 nm ;
- un coefficient d'extinction molaire élevé ($\approx 70 \times 10^3$ $M^{-1}.cm^{-1}$) ;
- un maximum d'émission de fluorescence vers 539-540 nm ;
- un rendement quantique de fluorescence élevé (≈ 70 %) ;
- une durée de vie de fluorescence variant entre 4 et 5 ns ;

Seul le dérivé styrène se distingue légèrement des autres par sa durée de vie de fluorescence un peu plus courte et sa constante de vitesse non radiative légèrement plus élevée.

Ces propriétés similaires étaient attendues dans la mesure où le cœur fluorescent des BODIPY n'a pas été modifié, pas même la géométrie du substituant en position méso. Cela va nous permettre de pouvoir facilement comparer les propriétés spectroscopiques des nanoparticules dont ils constitueront le cœur fluorescent.

Tableau 4.8 – Caractéristiques spectroscopiques des monomères BODIPY présentant différentes fonctions polymérisables, mesurées dans le toluène à 20°C.

monomère	fonction	λ_{abs}	λ_{emF}	Φ_F	ε	τ	k_r	k_{nr}
		nm	nm		10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$	ns	$\times 10^8$ s^{-1}	$\times 10^7$ s^{-1}
1	MAϕ	528	540	0,69	73	4,9	1,41	6,33
12	Aϕ	528	540	0,74	79	4,8	1,54	5,42
13	MAEt	527	538	0,75	70	4,8	1,56	5,21
14	AEt	527	538	0,71	74	4,7	1,49	6,38
15	S	527	539	0,71	68	4,1	1,73	7,07

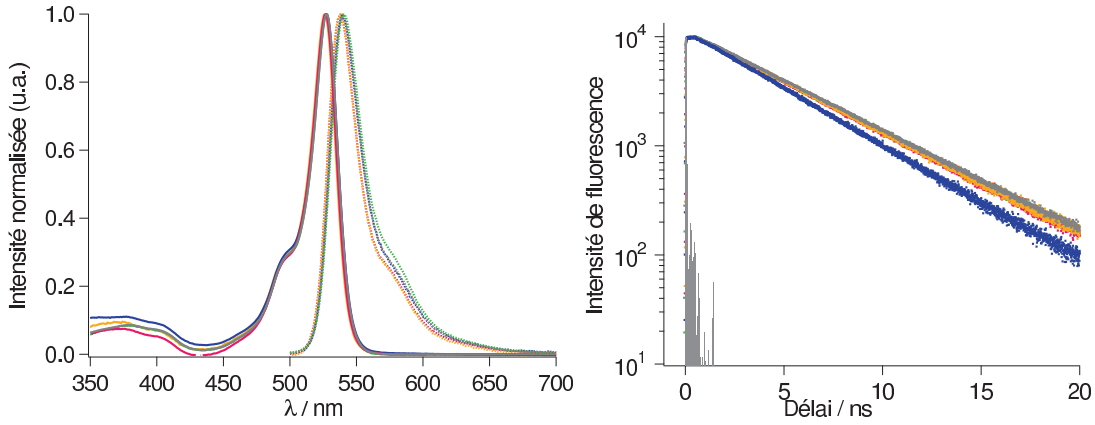


FIGURE 4.14 – Spectres des monomères dérivés BODIPY à différentes fonctions polymérisables enregistrés dans le toluène à 20°C ([BODIPY] $\approx 10^{-6}$M) : BDPMA (-), acrylate de phényle (-), méthacrylate d'éthyle (-), acrylate d'éthyle (-) et styrène (-). Gauche : spectres d'absorption (traits continus) et d'émission de fluorescence (traits pointillés). Droite : déclins de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 540 nm) et impulsion laser (-).

4.3.3 Synthèse des nanoparticules fluorescentes

Les monomères dérivés BODIPY présentant différentes fonctions polymérisables ont été copolymérisés avec du styrène dans les conditions du procédé "one-pot" décrites dans le chapitre 2 (TABLEAU 2.18). Toutes ces nanoparticules sont constituées d'une couronne hydrophile PEO-*b*-PAA et d'un cœur hydrophobe P(S-*co*-BODIPY) contenant en moyenne 3 BODIPY par chaîne. Les résultats expérimentaux sont présentés dans le TABLEAU 4.9.

Les NPFs obtenues ont sensiblement le même diamètre (D $\approx$ 70 nm) et sont relativement monodisperses ($\sigma < 0{,}2$). Toutes les conversions en styrène et en monomères BODIPY atteignent des valeurs élevées, supérieures à 90 %. L'expérience menée en présence de monomère BODIPY styrène a subi une évaporation en styrène de 50 % (observé par RMN du ^{1}H). À la fin de la polymérisation, seuls 6 % de styrène n'ont pas réagi, la conversion a été modifiée en conséquence. Cela explique le fait que cette expérience présente des masses molaires théoriques et expérimentales inférieures à celles des autres.

Les monomères BODIPY sont tous bien incorporés aux chaînes polymères comme le montre la détection UV-vis. de la CES (FIGURE 4.15). Dans l'ensemble, les indices de polymolécularité des chaînes de copolymères sont bons ($< 1{,}5$) et les chromatogrammes monomodaux.

Ces quatre nouveaux monomères BODIPY à différentes fonctions polymérisables sont donc compatibles avec une polymérisation radicalaire contrôlée RAFT en miniémulsion. Des cinétiques de polymérisation en présence de ces différents monomères ont été étudiées afin de déterminer leur répartition au sein des chaînes polymères.

TABLEAU 4.9 – Résultats expérimentaux des synthèses de NPFs à cœurs BODIPY présentant différentes fonctions polymérisables. Les synthèses sont réalisées dans les conditions du système optimisé "one-pot" (TABLEAU 2.18) en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC ($[M]_0/[RAFT]_0 = 160$, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[M]_0 = 1{,}3$ mol/L_{eau}, $[BODIPY]_0 = [M]_0 \times 0{,}02$) et arrêtées après 4h.

Exp	BODIPY[a]	n^b_{BODIPY}	χ^c_S %	χ^d_{BODIPY} %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ CES}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG144B	MAϕ	3,0	99	98	16,4	21,0	1,25	65 (0,08)
CG19D	Aϕ	2,9	95	95	16,1	16,1	1,50	60 (0,13)
CG21D	MAEt	3,2	100	98	17,3	19,0	1,40	85 (0,21)
CG30D	AEt	3,2	99	95	15,3	16,8	1,26	90 (0,05)
CG32D	S	3,1	94[e]	92	12,6	13,9	1,46	75 (0,20)

[a] Fonction polymérisable portée par le monomère BODIPY. [b] Nombre moyen de monomères BODIPY par chaîne polymère. [c] Conversion molaire en styrène déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte en styrène due à l'étape de sonication. [d] Conversion molaire en monomère BODIPY déterminée par CES en utilisant une détection UV-vis. ($\lambda = 528$ nm). [e] Cette expérience présente une perte de styrène de 50% par évaporation certainement due à l'étape de sonication.

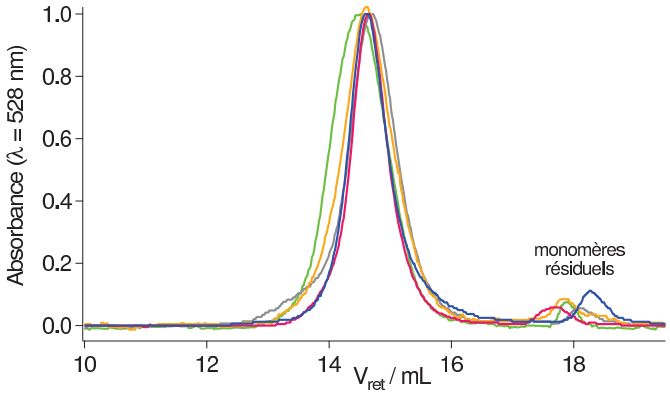


FIGURE 4.15 – Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF pour les polymères issus des NPFs à cœur BODIPY présentant différentes fonctions polymérisables (détection UV-vis. $\lambda = 528$ nm) : BDPMA (-), acrylate de phényle (-), méthacrylate d'éthyle (-), acrylate d'éthyle (-) et styrène (-).

4.3.4 Détermination de la répartition des monomères BODIPY le long des chaînes polymères

Méthodes de détermination des rapports de réactivité en copolymérisation radicalaire

La répartition des monomères BODIPY dans les chaînes de P(S-*co*-BODIPY) peut être déterminée à l'aide des équations de composition. Pour cela, il faut s'intéresser à la cinétique de la réaction de copolymérisation. À partir des différentes voies possibles de copolymérisation décrites par le modèle terminal (équations 4.2-4.4), la vitesse de disparition des monomères A et B est donnée par :

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_{AA}[A^\bullet][A] + k_{BA}[B^\bullet][A] \tag{4.5}$$

$$-\frac{d[B]}{dt} = k_{BB}[B^\bullet][B] + k_{AB}[A^\bullet][B] \tag{4.6}$$

$$\left(\frac{-\frac{d[A]}{dt}}{-\frac{d[B]}{dt}}\right) = \frac{d[A]}{d[B]} = \frac{[A]}{[B]} \times \frac{k_{AA}[A^\bullet] + k_{BA}[B^\bullet]}{k_{AB}[A^\bullet] + k_{BB}[B^\bullet]} \tag{4.7}$$

En faisant l'hypothèse d'un état quasi-stationnaire pour chacune des deux espèces radicalaires, on obtient :

$$\frac{d[A^\bullet]}{dt} = \frac{d[B^\bullet]}{dt} = 0 \Longrightarrow k_{BA}[B^\bullet][A] = k_{AB}[A^\bullet][B] \tag{4.8}$$

Le rapport des vitesses de disparition des monomères A et B ($d[A]/d[B]$) donne alors la composition instantanée du copolymère qui peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{d[A]}{d[B]} = \frac{r_A\frac{[A]}{[B]} + 1}{r_B\frac{[B]}{[A]} + 1} \tag{4.9}$$

L'exploitation de cette équation est facilitée en introduisant les fractions molaires instantanées :

- la composition du mélange des monomères est donnée par :

$$f_A = 1 - f_B = \frac{[A]}{[A] + [B]} \tag{4.10}$$

- et la composition instantanée du copolymère par :

$$F_A = 1 - F_B = \frac{d[A]}{d[A] + d[B]} = \frac{r_A f_A^2 + f_A f_B}{r_A f_A^2 + 2 f_A f_B + r_B f_B^2} \tag{4.11}$$

Pour un couple de monomères A et B pour lesquels r_A et r_B sont connus, le tracé des "courbes d'incorporation" ou diagrammes de Mayo-Lewis appelés "diagrammes carrés" ($F_A = f(f_A)$) permet de prédire la composition du copolymère lors de sa formation (dans le cas du modèle terminal ici).

Nous avons voulu déterminer les rapports de réactivité des couples styrène et monomères BODIPY afin de connaître au mieux la composition des copolymères formés. Ces valeurs seront comparées avec la littérature pour des monomères classiques.

Différentes méthodes existent pour déterminer les rapports de réactivité. Elles consistent généralement à linéariser l'équation de composition à faible conversion. La plus ancienne, la méthode de Mayo-Lewis [322], est peu utilisée car l'incertitude sur les rapports de réactivité est grande. De la même manière, la méthode de Fineman-Ross [323], conduit à des incertitudes sur les rapports de réactivité car elle ne pondère pas les deux monomères de la même manière ce qui risque de poser un problème dans notre cas où un des monomères est en très faible proportion. Nous avons donc choisi la méthode de Kelen et Tüdös qui utilise le même principe mais permet une correction du biais introduit par la méthode de Fineman-Ross. Le changement de variable proposé est le suivant [324] :

$$\eta = \left[r_A + \frac{r_B}{\alpha}\right]\xi - \frac{r_B}{\alpha} \tag{4.12}$$

Dans le cas de copolymérisations à hautes conversions ($> 10\%$), la méthode de Kelen-Tüdös étendue est plus appropriée [325], et les coefficients de l'équation précédente sont :

$$\eta = \frac{z(Y-1)}{\alpha \times z^2 + Y} \quad \text{et} \quad \xi = \frac{Y}{\alpha \times z^2 + Y} \tag{4.13}$$

avec :

$$z = \frac{ln(1-x_A)}{ln(1-x_B)} \tag{4.14}$$

$$Y = \frac{[A]_0 - [A]}{[B]_0 - [B]} \tag{4.15}$$

$$\alpha = \sqrt{(Y/z^2)_{\min} \times (Y/z^2)_{\max}} \tag{4.16}$$

où :

x_A, x_B	conversions individuelles en monomères A et B
Y	composition du copolymère à la conversion x
α	paramètre de normalisation

En pratique, pour un couple monomères A/B, différentes synthèses sont réalisées à concentration variable en monomère B. Puis le tracé de $\eta = f(\xi)$ permet de déterminer les rapports de réactivité.

La méthode de Jaacks [326], dans laquelle la détermination des rapports de réactivité est simplifiée en utilisant un excès d'un des deux monomères (A par exemple) par rapport à l'autre, peut être utilisée dans notre cas. La propagation a alors presque exclusivement lieu entre un site actif $A^\bullet$ ($S^\bullet$) et une unité monomère A (S) ou B (BODIPY). La propagation à partir du site actif $B^\bullet$ est alors négligeable et on a :

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_{AA}[A^\bullet][A] \quad \text{et} \quad -\frac{d[B]}{dt} = k_{AB}[A^\bullet][B] \tag{4.17}$$

$$\Longrightarrow \frac{d[A]}{d[B]} = r_A\frac{[A]}{[B]} \tag{4.18}$$

L'équation de copolymérisation peut alors s'écrire sous la forme :

$$ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = r_A \times ln\left(\frac{[B]}{[B]_0}\right) \tag{4.19}$$

Le rapport de réactivité r_A est ainsi déterminé en traçant $ln([A]/[A]_0)$ en fonction de $ln([B]/[B]_0)$, pour une même polymérisation analysée à différents taux de conversions.

Détermination des rapports de réactivité du BDPMA copolymérisé avec le styrène

Nous avons utilisé les méthodes de Kelen-Tüdös étendue et de Jaacks pour déterminer les rapports de réactivité du BDPMA et du styrène. Pour la méthode de Kelen-Tüdös étendue, quatre copolymérisations en masse du styrène avec des taux variables en BDPMA ont été réalisées (0,9-2,6 mol %), en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC. Toutes ces copolymérisations sont arrêtées après 60-70 min (soit à 20 % de conversion en styrène environ) et les conversions individuelles en monomères A et B déterminées (styrène : gravimétrie et BDPMA : CES détection UV-vis.). Ensuite, le tracé $\eta = f(\xi)$ permet de déterminer le rapport de réactivité du styrène vis-à-vis du BDPMA (Figure 4.16). On trouve : $r_{S/BDPMA} = 0{,}29 \pm 0{,}02$. Le rapport de réactivité du BDPMA vis-à-vis du styrène ne peut pas être déterminé avec précision à cause des trop faibles pourcentages en BDPMA utilisés.

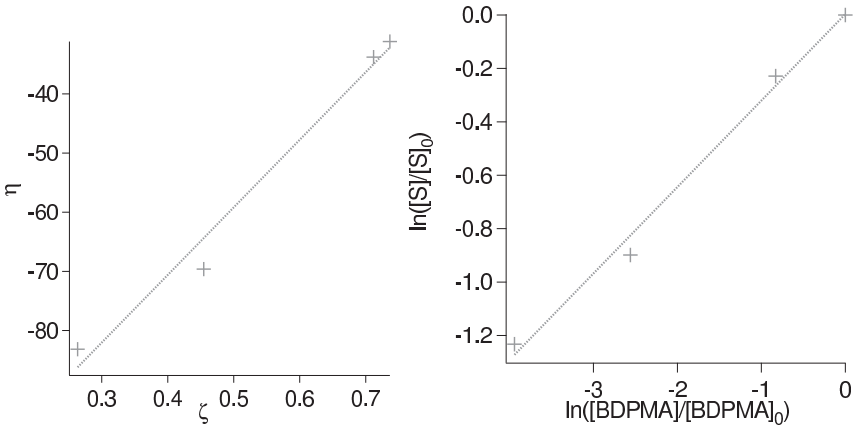


Figure 4.16 – Détermination expérimentale des rapports de réactivité du styrène copolymérisé au BDPMA. Gauche : méthode de Kelen-Tüdös étendue, points expérimentaux (+) et ajustement par l'équation 4.12 (···) . Droite : méthode de Jaacks (synthèse réalisée à 1,9 mol % de BDPMA), points expérimentaux (+) et ajustement par l'équation 4.19 (···).

Pour la méthode de Jaacks, une seule cinétique de polymérisation est nécessaire. Nous l'avons appliquée à une copolymérisation du styrène avec le BDPMA en miniémulsion dans les conditions classiques du procédé "one-pot" (Figure 4.16). Le rapport de réactivité du styrène vis-à-vis du BDPMA trouvé est de $0{,}32 \pm 0{,}02$.

Les deux rapports de réactivité $r_{S/BDPMA}$ déterminés par la méthode de Jaacks et la méthode de Kelen-Tüdös sont similaires et du même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature (Tableau 4.7). Ces valeurs semblent fiables dans la mesure où elles ont été déterminées par deux méthodes indépendantes.

Ces résultats montrent que le BDPMA a un comportement similaire au méthacrylate de phényle en terme de réactivité vis-à-vis du styrène.

Détermination du rapport de réactivité du BODIPY à fonction acrylate de phényle copolymérisé avec le styrène

Le rapport de réactivité d'un acrylate de phényle avec le styrène n'est pas connu, bien que des rapports de réactivité avec d'autres types de monomères à fonction acrylate de phényle aient été reportés (*cf.* 4.3.4). Le $r_{S/BDP\phi A}$ a donc été déterminé par la méthode de Kelen-Tüdös dans les mêmes conditions que pour le méthacrylate de phényle. On trouve : $r_{S/BDP\phi A} = 0{,}37 \pm 0{,}03$ (Figure 4.17). Ce rapport de réactivité est supérieur à celui du BDPMA mais du même ordre de grandeur. On peut donc supposer une répartition des BODIPY à fonction acrylate de phényle dans la chaîne de copolymère similaire à celle obtenue avec le BDPMA.

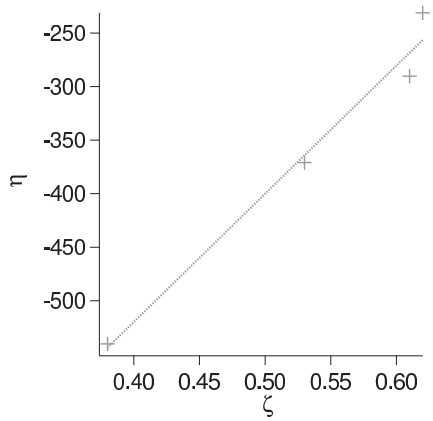


Figure 4.17 – Détermination expérimentale des rapports de réactivité du styrène copolymérisé au BODIPY à fonction acrylate de phényle. Méthode de Kelen-Tüdös étendue, points expérimentaux (+) et ajustement par l'équation 4.12 (···).

Répartition des monomères BODIPY dans les chaînes de PEO-*b*-PAA-*b*-P(S-*co*-BODIPY)-TTC

Différentes cinétiques de copolymérisations du styrène avec les nouveaux monomères BODIPY ont été étudiées. Pour chaque synthèse, des prélèvements à intervalles réguliers sont réalisés et les conversions molaires individuelles en styrène et monomère BODIPY sont calculées. Ainsi, il est possible de déterminer à chaque instant la composition moyenne du copolymère.

Si les rapports de réactivité du couple styrène/BODIPY sont connus, le tracé de la composition du mélange des monomères, de la composition instantanée du copolymère, et de la composition moyenne du copolymère formé en fonction de la conversion est possible. Ces courbes permettent une représentation simple de l'incorporation des fluorophores au fur et à mesure de la polymérisation.

Ainsi, pour le BDPMA nous avons tracé ces courbes en prenant comme rapport de réactivité $r_{S/BDPMA} = 0{,}31$, soit une moyenne des $r_{S/BDPMA}$ déterminés par les méthodes de Kelen-Tüdös étendue et de Jaacks. Le rapport de réactivité $r_{BDPMA/S}$ a une très faible influence sur la composition du copolymère formé car la concentration relative en BDPMA par rapport au styrène est très faible. Typiquement, pour un $r_{S/BDPMA}$ fixé et $r_{BDPMA/S}$ variable de 0,2 à 1, la composition du copolymère formé est quasiment identique. Nous avons donc pris un $r_{BDPMA/S}$ de 0,50, *i.e.* celui correspondant à la valeur donnée dans la littérature pour $r_{MA\phi/S}$.

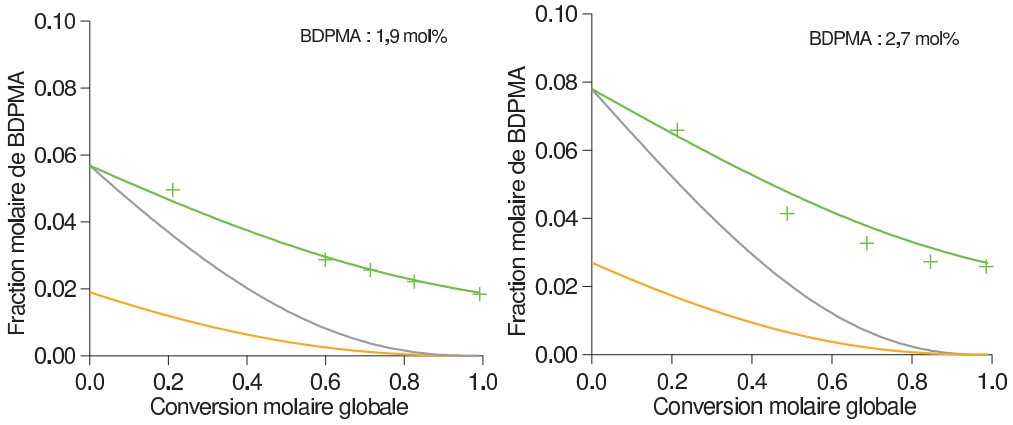


FIGURE 4.18 – Évolution de la composition du mélange des monomères (-), de la composition instantanée du copolymère (-) et de la composition moyenne en copolymère théorique (-) et expérimentale (+) en BDPMA en fonction de la conversion molaire globale (avec $r_{S/BDPMA} = 0{,}31$ et $r_{BDPMA/S} = 0{,}5$). Polymérisations en miniémulsion dans les conditions du procédé "one-pot" en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC et à des pourcentages molaires en BDPMA comparé au styrène de : 1,9 % (gauche) et 2,7 % (droite).

Quelle que soit la concentration en BDPMA utilisée, la composition moyenne du copolymère suit la prédiction théorique (FIGURE 4.18). À l'aide du tracé de ces courbes, il apparaît clairement qu'il existe un gradient de BDPMA le long de la chaîne P(S-*co*-BDPMA). En effet, la composition instantanée du copolymère (F_A) montre que celui-ci, aux faibles conversions molaires globales, présente le plus fort pourcentage de BDPMA. Ce pourcentage diminue au fur et à mesure de la polymérisation pour à la fin tendre vers 0, c'est à dire vers un copolymère constitué quasi uniquement de styrène.

Les mêmes tracés ont été effectués pour les copolymérisations du styrène avec les quatre autres monomères à différentes fonctions polymérisables (FIGURE 4.19). Pour le BODIPY à fonction acrylate de phényle, le rapport de réactivité $r_{BDP\phi A/S}$ n'a pas pu être déterminé par la méthode de Kelen-Tüdös. Il a donc arbitrairement été choisi à 0,5 (et tout comme pour le BDPMA, ce rapport n'influe quasiment pas sur la composition du copolymère formé à cause de la faible proportion en monomère BODIPY). Pour le BODIPY à fonction méthacrylate d'éthyle, les points expérimentaux ne coïncidaient pas avec les rapports de réactivités théoriques rapportés pour le monomère méthacrylate d'éthyle (TABLEAU 4.7).

Le rapport $r_{S/BDPMAEt}$ a alors été déterminé expérimentalement par la méthode de Kelen-Tüdös, mais seulement sur deux points. L'incertitude sur cette mesure est donc grande. On trouve $r_{S/BDPMAEt} = 0{,}3$. En utilisant cette valeur de rapport de réactivité, la composition moyenne du copolymère formé théorique coïncide avec l'expérience (FIGURE 4.19).

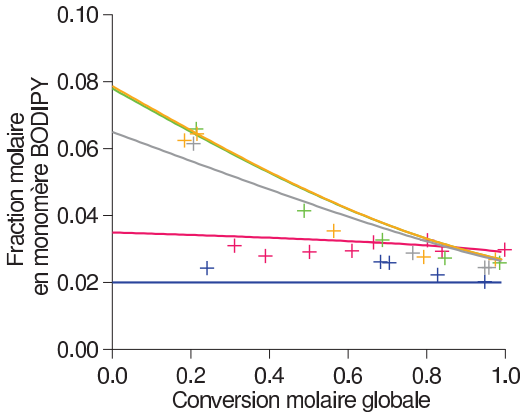


FIGURE 4.19 – Évolution de la composition moyenne du copolymère en monomère BODIPY, théorique (-) et expérimentale (+), en fonction de la conversion molaire globale. Polymérisations en miniémulsion dans les conditions du procédé "one-pot" en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC et de différents monomères BODIPY : BDPMA (-, $r_{S/BDPMA} = 0{,}31$, $r_{BDPMA/S} = 0{,}5$), acrylate de phényle (-, $r_{S/BDP\phi A} = 0{,}37$, $r_{BDP\phi A/S} = 0{,}5$), méthacrylate d'éthyle (-, $r_{S/BDPMAEt} = 0{,}3$, $r_{BDPMAEt/S} = 0{,}5$), acrylate d'éthyle (-, $r_{S/BDPAEt} = 0{,}8$, $r_{BDPAEt/S} = 0{,}2$) et styrène (-, $r_{S/BDPS} = r_{BDPS/S} = 1$).

Hormis pour le BODIPY à fonction méthacrylate d'éthyle, les compositions moyennes expérimentales en monomères BODIPY des copolymères sont en adéquation avec ce qui peut être prédit théoriquement en considérant les rapports de réactivité de la littérature pour des monomères équivalents simples. Cela signifie que le groupement BODIPY ne modifie que très peu ces valeurs de rapports de réactivité.

Deux catégories de monomères se distinguent clairement. La première, comprenant le BDPMA et les monomères BODIPY à fonction méthacrylate d'éthyle et acrylate de phényle, correspond à des monomères introduits très rapidement dans la chaîne polymère. Pour ces trois monomères, un gradient de BODIPY existe certainement dans la chaîne de P(S-*co*-BODIPY). La seconde catégorie regroupe les BODIPY à fonctions styrène et acrylate d'éthyle. Ces deux monomères sont introduits continuellement dans la chaîne de P(S-*co*-BODIPY). Les monomères BODIPY sont répartis de manière homogène au sein de ces deux types de copolymères.

Dans le cas du BODIPY à fonction acrylate d'éthyle, les rapports de réactivité théoriques sont de $r_{S/AEt} = 0{,}80$ et $r_{AEt/S} = 0{,}20$. Nous pourrions donc penser qu'il y a une dérive de composition de BODIPY vers la fin de la chaîne de copolymère. Ce n'est pas le cas car les monomères ont une tendance à l'alternance et qu'il y a très peu de BODIPY ($\approx$ 2 mol %). Lorsqu'un styrène est incorporé à la chaîne de copolymère, il est alors pré-

férentiellement succédé par un monomère BODIPY, consommant rapidement ce type de monomère.

Des copolymères présentant des gradients de BODIPY et d'autres ayant une répartition homogène de BODIPY ont été synthétisés. L'effet de cette répartition sur les propriétés spectroscopiques des NPFs va à présent être étudié.

4.3.5 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs

Les caractéristiques spectroscopiques des NPFs ayant différents BODIPY polymérisables au cœur ont été analysées et sont résumées dans le Tableau 4.10. Toutes les NPFs avaient été synthétisées dans les mêmes conditions et avec des quantités de BODIPY similaires afin de rendre leurs caractéristiques comparables (*cf.* Tableau 4.9).

Tableau 4.10 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à cœur BODIPY possédant différentes fonctions polymérisables, enregistrées dans l'eau.

Exp	fonction[a]	n^b_{BODIPY}	λ_{abs} nm	λ_F nm	Φ_F	$\overline{\tau}^c$ ns	k_r $\times 10^7$ s^{-1}	k_{nr} $\times 10^8$ s^{-1}
CG144B	MAϕ	3,0	529	544	0,20	2,8	7,14	2,86
CG19D	Aϕ	2,9	529	544	0,35 ($\pm$0,03)[d]	3,6	9,72	1,81
CG21D	MAEt	3,2	528	542	0,28 ($\pm$0,02)[d]	2,7	10,4	2,67
CG30D	AEt	3,2	528	544	0,23 ($\pm$0,03)[d]	2,6	8,85	2,96
CG32D	S	3,1	527	542	0,34 ($\pm$0,02)[d]	3,1	11,0	2,13

[a] Fonction polymérisable portée par le monomère BODIPY. [b] Nombre moyen de monomères BODIPY par chaîne de copolymère. [c] Durée de vie moyenne calculée à l'aide de l'équation 3.2 (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm). [d] Valeur moyenne du rendement quantique mesurée sur deux lots de NPFs similaires et, entre parenthèses, écart à la moyenne pour ces deux expériences.

Les maxima d'absorption et d'émission de fluorescence des NPFs dans l'eau sont similaires entre eux et à ceux des monomères correspondants dans le toluène (Figure 4.20). Un léger déplacement bathochrome (4 nm) est observé sur les spectres d'émission de fluorescence des NPFs comparativement aux spectres des monomères. Ce déplacement avait déjà été observé sur les NPFs à cœur BDPMA. Les rendements quantiques des nanoparticules sont compris entre 20 et 35% et les durées de vie moyennes de fluorescence entre 2,6 et 3,6 ns (Tableau 4.10).

Deux types de comportements se distinguent. D'une part, les NPFs à cœur BODIPY styrène ou acrylate de phényle présentent les rendements quantiques de fluorescence les plus élevés et les durées de vie de fluorescence les plus longues. Ce sont elles également qui ont les constantes de vitesse non radiatives les plus faibles ($\approx 2 \times 10^7$ s^{-1}).

D'autre part, les NPFs à cœur BODIPY acrylate d'éthyle ou BDPMA présentent les rendements quantiques de fluorescence les plus faibles et des durées de vie de l'ordre de 2,6-2,8 ns. Leurs constantes de vitesse non radiatives sont les plus élevées ($\approx 3\times 10^7$ s^{-1}).

Les NPFs à cœur BODIPY méthacrylate d'éthyle ont un comportement intermédiaire, avec un rendement quantique de fluorescence de 0,28 et une durée de vie de 2,7 ns. En ce qui concerne la constante de vitesse non radiative, elle se rapproche plus de celle du second groupe de NPFs, les moins fluorescentes.

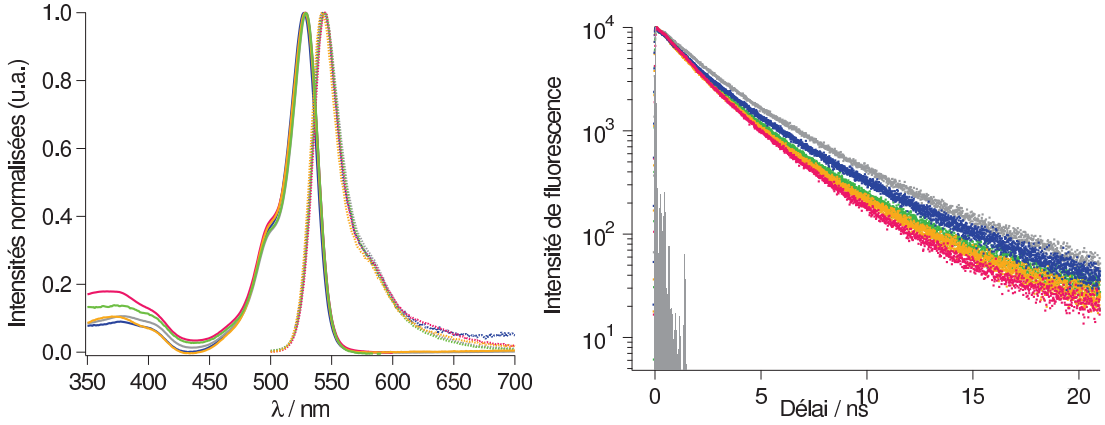


FIGURE 4.20 – Spectres enregistrés dans l'eau des NPFs à différents cœur BODIPY polymérisable : BDPMA (-), acrylate de phényle (-), méthacrylate d'éthyle (-), acrylate d'éthyle (-) et styrène (-). Gauche : spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, $\cdots$). Droite : déclins de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, λ_F = 543 nm) et impulsion laser.

Précédemment, nous avons vu que les différents monomères BODIPY n'étaient pas répartis de la même manière au cœur des NPFs. Les BODIPY styrène et acrylate d'éthyle sont répartis de manière homogène le long de la chaîne polymère, alors que les BODIPY métacrylate d'éthyle, acrylate d'éthyle et BDPMA sont répartis sous forme de gradients. Ces résultats ne coïncident malheureusement pas avec les observations spectroscopiques, excepté pour le BDPMA et le BODIPY styrène. Notre raisonnement ne tient compte que des agrégats de BODIPY intra-chaîne et non inter-chaîne. Il se peut que selon la géométrie du BODIPY monomère, les chaînes n'adoptent pas la même conformation au cœur des NPFs. Il est donc difficile de trouver une corrélation entre la réactivité des BODIPY et les propriétés spectroscopiques des NPFs.

Néanmoins, en gardant la même structure de cœur du BODIPY et en changeant seulement sa fonction polymérisable, il est possible de moduler l'efficacité de fluorescence des NPFs. Les monomères BODIPY les plus simples à synthétiser sont ceux à fonctions méthacrylate de phényle et acrylate de phényle. En passant du premier au second, le rendement quantique de fluorescence et donc la brillance des NPFs sont multipliés par 1,5 (ϵ des monomères similaires). Ce second BODIPY paraît donc le plus prometteur en terme d'efficacité de synthèse et de fluorescence.

4.4 Conclusion sur l'utilisation de différents monomères au cœur des NPFs

Dans ce chapitre, nous avons utilisé deux stratégies afin de réduire les agrégats peu ou pas fluorescents au cœur des NPFs.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des BODIPY dit encombrés, possédant des groupements aromatiques en positions 3 et 5 des pyrroles. Selon la nature de l'aromatique introduit, la copolymérisation avec le styrène est plus ou moins perturbée, avec un retard fortement marqué pour le BODIPY portant des naphtalènes. Il n'a pas été possible de concentrer ces fluorophores au cœur des NPFs car les synthèses des monomères présentent de trop faibles rendements. En terme de spectroscopie, ces BODIPY et leurs NPFs associées émettent de 598 à 613 nm. Le BODIPY portant des groupements biphényles semble néanmoins se dégrader dans le temps. Le composé le plus prometteur semble donc être le BODIPY présentant des groupements méthylnaphtalènes. Dans le futur, pour tester avec plus de certitudes l'effet de BODIPY encombrés sur la formation d'agrégats, il faudrait améliorer la synthèse de ce monomère fluorescent afin d'en incorporer des quantités conséquentes ($\approx$ 2 %) au cœur des NPFs.

Des Aza-BODIPY ont également été incorporés ou copolymérisés au cœur des NPs polymères. Dans tous les cas, ces BODIPY retardent la polymérisation du styrène. Cet effet a été attribué au fait que les positions 2 et 6 sont libres sur les pyrroles, positions connues pour pouvoir réagir de manière radicalaire.

Il n'est donc pas possible de copolymériser n'importe quel dérivé BODIPY avec le styrène afin d'élaborer des NPFs. La nature du BODIPY joue un rôle déterminant dans le succès des copolymérisations et doit donc être choisie avec attention.

Enfin, la nature de la fonction polymérisable portée par des krypto-BODIPY a été modifiée afin d'en moduler la réactivité lors d'une copolymérisation radicalaire avec le styrène. Quatre nouveaux BODIPY ont ainsi pu être copolymérisés au styrène afin de réaliser des NPFs. Ces BODIPY présentant des réactivités différentes vis-à-vis du styrène, leur répartition de long de la chaîne P(S-*co*-BODIPY) varie de l'un à l'autre. Deux types de répartitions de monomères BODIPY ont été obtenus : une dérive le long de la chaîne de copolymère ou une répartition homogène. Des études spectroscopiques ont été réalisées sur ces NPFs mais il est difficile de dégager une corrélation entre la répartition des BODIPY et l'efficacité de fluorescence des NPFs (et donc la formation d'agrégats peu ou pas fluorescents). Seuls le BDPMA, le plus réactif et donnant les moindres rendements quantiques de fluorescence de NPFs, et le BODIPY styrène, le mieux répartis dans la chaîne de copolymère et ayant un des meilleurs rendements quantiques de fluorescence des NPFs, ont eu un comportement attendu. Néanmoins, le BODIPY analogue du BDPMA mais portant une fonction acrylate de phényle présente les meilleurs rendements quantiques et durées de vie de fluorescence et est simple à synthétiser. Il semble donc être

le BODIPY le plus prometteur.

Dans le chapitre suivant, nous modifierons la nature de la couronne hydrophile des NPFs, tout en gardant au cœur le BDPMA, BODIPY servant de référence dans toute cette étude.

Chapitre 5 : Modification de la couronne hydrophile des NPFs

Les particules présentées dans les chapitres précédents sont toutes constituées d'une couronne à base de PEO_{45}-*b*-$PAA_{\approx 10}$. L'intérêt de cette couronne doublement hydrophile est que, d'une part, elle peut permettre une post-fonctionnalisation des particules par un couplage peptidique entre les acides carboxyliques et une amine, et que, d'autre part, elle permet éventuellement l'utilisation des NPFs en milieu biologique grâce au PEO. Dans ce système, la partie PAA est située entre le PEO et le cœur de P(S-*co*-BDPMA) des NPFs. Lors de la réalisation de marqueurs fluorescents, il peut être intéressant de fonctionnaliser la surface des NPFs avec des molécules cibles en biologie, reconnaissant un site hôte spécifique. Dans le cas des couronnes de type PEO-*b*-PAA, le bloc de PEO situé à l'extrémité de la couronne peut éventuellement rendre inaccessibles les molécules greffées.

C'est ainsi que nous avons choisi de développer trois nouveaux types de couronnes hydrophiles, toutes à base d'acide acrylique et de PEO, mais dont les architectures sont différentes :

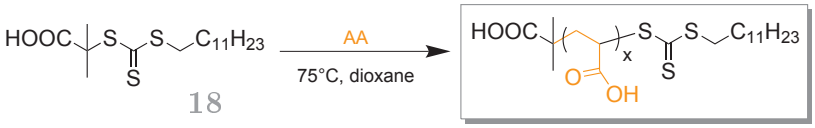
- à base d'acide acrylique pur, afin de rendre accessibles toutes les molécules greffées ;
- à base d'acrylate de poly(oxyde d'éthylène) (APEO - M_n = 454 g/mol, 7-8 unités d'EO par monomère) pur, sachant qu'une fonction acide se trouve à l'extrémité de chaque chaîne de PAPEO (portée par le TTCA). Ainsi, la fonction acide carboxylique est située en extrémité de la couronne ;
- à base d'acide acrylique copolymérisé à de l'APEO, afin d'avoir une répartition homogène des acides à la surface des particules et une certaine furtivité grâce aux groupements APEO.

Dans ce chapitre, la synthèse de ces trois types de macro-agents RAFT sera abordée, ainsi que leur utilisation dans la synthèse de NPFs en miniémulsion RAFT. Les caractéristiques désirées pour ces nouvelles NPs sont les mêmes que dans les chapitres précédents, à savoir un diamètre hydrodynamique inférieur à 100 nm et un bon contrôle de la polymérisation. Une fois les conditions des différentes synthèses optimisées, les propriétés spectroscopiques et de surface des NPFs obtenues seront comparées. Enfin, des tests préliminaires d'incubation de cellules cancéreuses avec ces différentes NPFs seront présentés.

5.1 Couronnes à base de PAA

5.1.1 Synthèse des macro-agents RAFT à base de PAA

Dans un premier temps, nous avons voulu obtenir des macro-agents RAFT constitués d'homopolymères d'acide acrylique. Ces polymères sont synthétisés par une polymérisation RAFT en milieu homogène dans le dioxane en présence de l'agent de transfert TTCA **18** et d'acide acrylique non purifié (Schème 5.1). La polymérisation est réalisée à 75°C et amorcée par l'ACPA.



18

Schème 5.1 – Synthèse des macro-agents RAFT PAA-TTC.

Un suivi cinétique de l'homopolymérisation de l'AA a tout d'abord été réalisé afin de pouvoir par la suite synthétiser des macro-agents RAFT ayant le nombre d'unités AA désirés (Figure 5.1). La polymérisation atteint 70 % en 5h et un temps de retard d'environ 70 min est observé.

Une analyse par CES des différents prélèvements réalisés lors du suivi cinétique permet de confirmer le contrôle de la polymérisation (Figure 5.1) : l'évolution des masses molaires moyennes en nombre expérimentales suit celle des masses molaires moyennes en nombre théoriques ; et les indices de polymolécularité sont toujours inférieurs à 1,2.

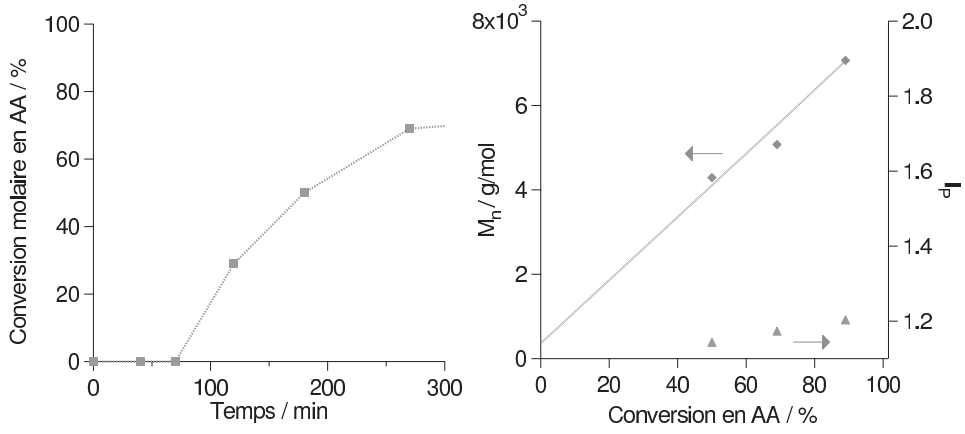


Figure 5.1 – Cinétique d'homopolymérisation de l'AA ($[M]_0/[TTCA]_0$ = 100, ■). Synthèse réalisée dans le dioxane à 75°C, avec [AA] = 2,06 M et un rapport $[TTCA]_0/[ACPA]_0$ = 15. Gauche : évolution de la conversion molaire en acide acrylique déterminée par RMN du ^1H dans le $CDCl_3$ en fonction du temps. Droite : évolution des masses molaires moyennes en nombre déterminées par CES (♦) et théoriques (···) et des indices de polymolécularité (▲) en fonction de la conversion molaire en acide acrylique.

Deux macro-agents ayant deux longueurs de blocs d'AA différentes ont été synthétisés (Tableau 5.1). Chacun des macro-agents RAFT présente une masse molaire moyenne en nombre théorique et expérimentale similaire et un indice de polymolécularité faible (≈ 1,1-1,2).

En revanche, le nombre d'unités AA présent dans chaque homopolymère est très différent. Le premier macro-agent RAFT possède en moyenne 3 unités d'AA seulement. Ce nombre d'unités AA a été choisi afin d'obtenir des systèmes très similaires à ceux développés par Hawkett et coll. (macro-agents RAFT PAA_5-*b*-PS_{20}-TTC-C_4) [273], pour la polymérisation du styrène en miniémulsion. De plus, si les acides carboxyliques présents en surface sont accessibles, des molécules greffées seraient alors localisées très près de la surface hydrophobe des particules. Le second macro-agent RAFT possède quant à lui en moyenne 35 unités d'AA et une M_n de 2,9 kg/mol. Cette masse molaire est très similaire à celle des macro-agents RAFT PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$-TTC utilisés précédemment ($M_n \approx 3{,}1$ kg/mol).

Tableau 5.1 – Conditions et résultats expérimentaux des synthèses de macro-agents RAFT PAA_x-TTC. Synthèses réalisées dans le dioxane à 75°C, amorcées par l'ACPA, avec $[AA]_0$ = 2,06 mol/$L_{diox.}$ et un rapport $[TTCA]_0/[ACPA]_0 = 15$.

Exp	$[AA]_0/[TTCA]_0$	t min	χ^a_{AA} %	n^b_{AA}	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ SEC}$ kg/mol	I_P
CG125C	8	135	39	3	0,58	0,62	1,19
CG85C	80	130	46	35	2,9	3,4	1,13

[a] Moyenne des conversions en AA déterminées par RMN du ^1H dans le $CDCl_3$ et par gravimétrie. [b] Nombre moyen d'unités AA dans le macro-agent RAFT formé.

Les macro-agents RAFT sont purifiés par deux précipitations dans le *n*-pentane puis séchés sous vide en chauffant à environ 50°C pendant deux jours. Des poudres jaunes sont obtenues.

Deux macro-agents RAFT linéaires, ayant des blocs hydrophiles de masses molaires très différentes et ayant de faibles I_P ont été synthétisés. Ils peuvent à présent être employés dans la polymérisation en miniémulsion du styrène.

5.1.2 Utilisation des macro-agents RAFT PAA-TTC pour la polymérisation en miniémulsion du styrène

Macro-agents RAFT PAA_3-TTC

Le macro-agent RAFT PAA_3-TTC est soluble dans le styrène. Il est donc possible de procéder à une polymérisation par le procédé "one-pot", c'est-à-dire en procédant à une

étape de polymérisation en masse en présence de styrène et de macro-agent RAFT PAA_3-TTC, puis à une étape d'inversion de phase afin d'obtenir des gouttelettes de styrène stabilisées par des macro-agents RAFT PAA_3-*b*-PS_x-TTC. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles évoquées dans le Tableau 2.18, seul le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ est modifié, tout en gardant constante la concentration molaire en styrène.

Deux polymérisations du styrène en miniémulsion ont été réalisées en présence de ce macro-agent RAFT (Tableau 5.2).

Tableau 5.2 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène réalisées dans les conditions "one-pot" à 80°C en présence de macro-agent RAFT PAA_3-TTC, arrêtées après 4h ($[S]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 3, $[OH^-]/[AA]$ = 1,3, pH > 12).

Exp	$[S]_0$ / $[TTCA]_0$	t_0^a min	$\chi^b_{S,\,0}$ %	$DP_n^{PS,c}$	$\chi^b_{S,\,f}$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M_{n\ SEC}^{PS}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG129C	200	90	20	15	100	14,0	16,3	1,36	95 (0,10)
CG133C	285	70	5	11	100	23,4	27,5	1,62	90 (0,08)

[a] Durée de la polymérisation en masse. [b] Conversions molaires en styrène déterminées par gravimétrie et corrigées de la perte en styrène par évaporation. [c] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse.

La première expérience (CG129C) a été réalisée dans des conditions très similaires à celles utilisées lors des synthèses en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC. À l'issue de la polymérisation en masse, le bloc hydrophobe présente 15 unités styrène. Une suspension blanche, très laiteuse, est obtenue après l'ajout d'eau et l'étape de sonication. À la fin de la polymérisation en miniémulsion, le styrène atteint 100 % de conversion (conversion corrigée de la perte en styrène due à l'étape de sonication) (Tableau 5.2). Le chromatogramme d'exclusion stérique au temps final montre un pic relativement fin (I_P = 1,36) et symétrique correspondant aux copolymères formés (Figure 5.2). Il n'y a pas de macro-agent RAFT résiduel, traduisant un bon réamorçage de ce dernier et une localisation du groupement TTC certainement dans la même phase que le styrène tout au long de la polymérisation.

L'analyse du diamètre des particules par DDL montre des objets de 90 nm environ, assez monodisperses. En revanche, les clichés de MET montrent des objets sphériques mais assez polydisperses, comparativement aux NPs obtenues avec le système optimisé à base de macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA. De plus, quelques rares très grosses particules sphériques sont observées (D $\approx$ 1 μm).

Hawkett et coll. ont travaillé sur la polymérisation en miniémulsion du styrène en présence de macro-agent RAFT très similaire PAA_5-*b*-PS_{20}-TTC-C_4, à environ 10 % de taux de solide [273]. Pour un rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ de 56, les particules obtenues mesurent

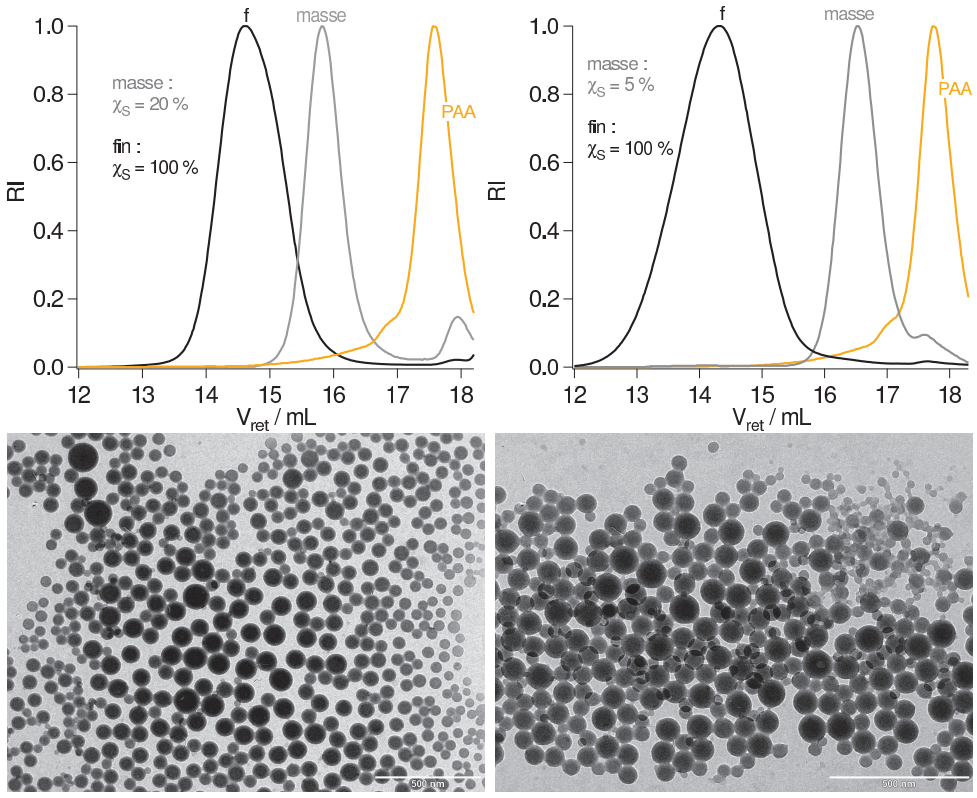


FIGURE 5.2 – Polymérisations en miniémulsion du styrène par le procédé "one-pot" en présence de macro-agent RAFT PAA_3-TTC en utilisant des rapports $[S]_0/[RAFT]_0 = 200$ (CG129C, gauche) ou = 285 (CG133C, droite), en formant un copolymère amphiphile PAA_3-*b*-PS_{15} (gauche) ou PAA_3-*b*-PS_{11} (droite) à l'issue de la première étape de polymérisation en masse. Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF des expériences à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT PAA_3-TTC. Bas : clichés de MET des NPs, barres d'échelle : 500 nm.

105 nm de diamètre et l'I_P est de 1,19. Alors que pour des rapports de 278 et 561, les particules mesurent respectivement 65 et 73 nm de diamètre et les I_P sont de 2,19 et 2,09. L'augmentation de l'I_P avec le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ est due à la diminution de la concentration en macro-agent RAFT dans le milieu. L'augmentation du diamètre des NPs lorsque le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ diminue est moins intuitif et a été attribué, dans des travaux ultérieurs de la même équipe, à la trop forte concentration en macro-agent RAFT dans le milieu, permettant alors la formation d'agrégats en phase aqueuse [275]. Aux plus forts rapports $[S]_0/[RAFT]_0$, les clichés de MET montrent des particules sphériques et monodisperses.

En nous basant sur ces travaux, nous avons alors choisi d'augmenter légèrement le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$, initialement de 200, à 285 (exp CG133C, Tableau 5.2), afin d'obtenir des NPs plus homogènes en taille. À l'issue de la polymérisation en masse, le bloc PS présente 11 unités. L'inversion de phase est réalisée. À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène est de 100 %. Le chromatogramme d'exclusion stérique (Figure 5.2) montre un déplacement des pics vers les plus fortes masses molaires lorsque la conversion augmente. Pour ce copolymère à blocs, l'indice de polymolécularité est supérieur à celui de l'expérience précédente et vaut 1,62. Les particules ont sensiblement le même diamètre et présentent la même polydispersité, que ce soit en DDL ou en MET. Augmenter le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ n'aura pas permis d'améliorer la distribution en taille des NPs et, au contraire, amène à un moins bon contrôle de la polymérisation du styrène. Il n'aura donc pas été possible d'obtenir des résultats similaires à Hawkett et coll. [273], pour la polymérisation en miniémulsion du styrène, en présence de macro-agents RAFT PAA_5-*b*-PS_{20}-TTC-C_4, en terme d'homogénéité de diamètres de NPs.

Le contrôle de la polymérisation du styrène en miniémulsion par le procédé "one-pot" est possible en présence de macro-agents RAFT court PAA_3-TTC en utilisant un rapport $[S]_0/[RAFT]_0 = 200$. En revanche, il n'a pas été possible de synthétiser des NPs à couronne PAA_3 et à cœur PS présentant des critères satisfaisant en terme d'homogénéité de taille des NPs. Aucune NP fluorescente n'a donc été synthétisée dans ces conditions.

Dans la suite, un macro-agent RAFT présentant une masse molaire de bloc hydrophile plus grande a été utilisé. Il devrait ainsi permettre la formation de NPs d'un plus petit diamètre.

Macro-agents RAFT PAA_{35}-TTC

Des macro-agents RAFT PAA_{35}-TTC ont été employés pour la polymérisation en miniémulsion du styrène. Ceux-ci présentent une masse molaire moyenne en nombre de 2,9 kg/mol, ce qui est très similaire aux macro-agents RAFT PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$-TTC utilisés précédemment ($M_n \approx 3{,}1$ kg/mol). De part cette plus forte masse molaire de bloc hydrophile, ces macro-agents RAFT devraient *a priori* assurer une meilleure stabilité colloïdale

aux NPs que les macro-agents RAFT PAA_3-TTC.

Luo, Zhu et coll. ont utilisé des macro-agents RAFT similaires de type PAA_{27}-*b*-PS_5-TTC-C_{12} pour la polymérisation en émulsion du styrène [327].

La transposition du procédé "one-pot" à une polymérisation en présence de macro-agents RAFT PAA_{35}-TTC n'est pas aussi triviale que pour les macro-agents RAFT PAA_3-TTC. En effet, ceux-ci ne sont pas solubles dans le styrène, même sous leur forme protonée. Il n'est donc pas possible de procéder à une synthèse en miniémulsion "one-pot". Afin d'augmenter le caractère tensioactif des macro-agents RAFT, un bloc hydrophobe de PS leur a été ajouté avant toute utilisation en miniémulsion. Cette extension est réalisée en polymérisant le styrène dans le dioxane à 80°C en présence de macro-agent RAFT PAA_{35}-TTC. Deux copolymères amphiphiles ont ainsi été synthétisés, l'un de 19 unités styrène, l'autre de 35 unités. Ces copolymères sont solubles dans le styrène. La synthèse des NPs est alors réalisée dans un procédé en deux étapes, similaires à celui évoqué §2.3.3 : il s'agit de dissoudre le macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_x-TTC dans une solution de styrène et d'AIBN, puis d'ajouter l'eau basique ($[OH^-]/[AA] = 1{,}3$ comme dans le procédé "one-pot") et de soniquer le mélange. La dispersion est alors dégazée puis placée dans un bain thermostaté à 80°C afin de procéder à la polymérisation en miniémulsion.

Trois polymérisations du styrène en miniémulsion ont ainsi été réalisées en présence de l'un ou l'autre de ces copolymères amphiphiles (Tableau 5.3).

Tableau 5.3 – Conditions et résultats expérimentaux polymérisations en miniémulsion du styrène à 80°C en présence de macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_x-TTC, arrêtées après 6h ($[S]_0 \approx 1$ mol/$L_{tot.}$, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[OH^-]/[AA] = 1{,}3$, pH > 12).

Exp	$DP_n^{PS\,a}$	$[S]_0$	$\chi_{S,\,f}$	$M_{n\,th}$	$M_{n\,SEC}^{PS}$	I_P	D_z
	x	$[RAFT]_0$	%	kg/mol	kg/mol		nm
CG94C	19	165	90	20,4	27,8	1,84	65 (0,06)
CG118C	19	600	24	20,1	28,9	2,10	70[b]
CG148C	35	175	43	18,9	22,7	2,04	150 (0,11)

[a] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS du macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_x-TTC. [b] Diamètres hydrodynamiques pour des échantillons filtrés sur 450 μm.

La première polymérisation en miniémulsion en présence de macro-agents RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC a été réalisée avec un rapport $[S]_0/[RAFT]_0 = 165$. À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène déterminée par gravimétrie est de 90 %. Cette conversion n'est pas corrigée de la perte en styrène due à l'étape de sonication, puisque bien supérieure aux 70-75 % habituellement rencontrés. Le chromatogramme d'exclusion stérique (Figure 5.3) présente un pic principal relativement fin. Néanmoins, un épaulement aux plus forts volumes de rétention est observable, correspondant certai-

nement à une population de polymère dont la polymérisation n'est pas contrôlée. De plus, un épaulement est visible au volume de rétention correspondant au macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC. Le réamorçage de ce dernier n'est donc certainement pas totalement efficace.

La mesure par DDL montre des objets monodisperses de 65 nm de diamètre (Tableau 5.3). Ces diamètres et l'homogénéité des NPs sont confirmées par les clichés de MET (Figure 5.3). Ces clichés montrent par ailleurs que les objets ont une morphologie sphérique. Des NPs plus petites qu'en présence de macro-agent RAFT PAA_3-*b*-PS_{15}-TTC ont donc pu être obtenues. Ceci est certainement dû à une meilleure stabilité électrostatique et stérique offerte par ce macro-agent RAFT d'une masse molaire de bloc hydrophile plus de 10 fois supérieure. Néanmoins, le réamorçage de ce macro-agent RAFT est moins bon.

La même expérience a été réalisée en utilisant cette fois-ci un rapport $[S]_0/[RAFT]_0 = 600$ afin de voir l'impact sur le diamètre des objets et le contrôle de la polymérisation. À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène est faible, de 24 % seulement (non corrigée). Le chromatogramme d'exclusion stérique (Figure 5.3) présente un pic asymétrique ayant un épaulement vers le macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC ($I_P > 2$). Tout comme dans l'expérience précédente, le macro-agent RAFT ne semble pas totalement réamorcer la polymérisation.

Les particules obtenues sont bien plus polydisperses que dans le cas précédent et il est nécessaire de les filtrer avant toute analyse de DDL afin que les objets de plus grand diamètre et plus diffusants ne perturbent pas l'analyse. La majorité des NPs filtrées mesurent alors environ 70 nm de diamètre. Le cliché de MET (Figure 5.3) présente des particules sphériques mais polydisperses.

Il n'a donc pas été possible d'améliorer les caractéristiques colloïdales des NPs stabilisées par des macro-agents RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC en augmentant le rapport $[S]_0/[RAFT]_0$.

Étant donné les problèmes de réamorçage rencontrés avec le macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC, un second macro-agent RAFT ayant un bloc PS plus grand a alors été synthétisé (PAA_{35}-*b*-PS_{35}-TTC). Cela devrait permettre un meilleur ancrage des copolymères amphiphiles à l'interface des gouttelettes de styrène et ainsi permettre un meilleur contrôle de la polymérisation.

La polymérisation en miniémulsion est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant un rapport $[S]_0/[RAFT]_0 = 175$. Ce rapport avait permis l'obtention de NPs monodisperses. Après 6h, la conversion en styrène n'est que de 43 % (non corrigée). Le chromatogramme d'exclusion stérique montre un pic relativement symétrique, mais présentant un indice de polymolécularité élevé (=2). Il ne semble pas cette fois-ci y avoir de résidus de macro-agent RAFT. Le groupement TTC de ce macro-agent RAFT étant attaché à une chaîne PS de plus forte masse molaire, ce dernier est peut-être mieux

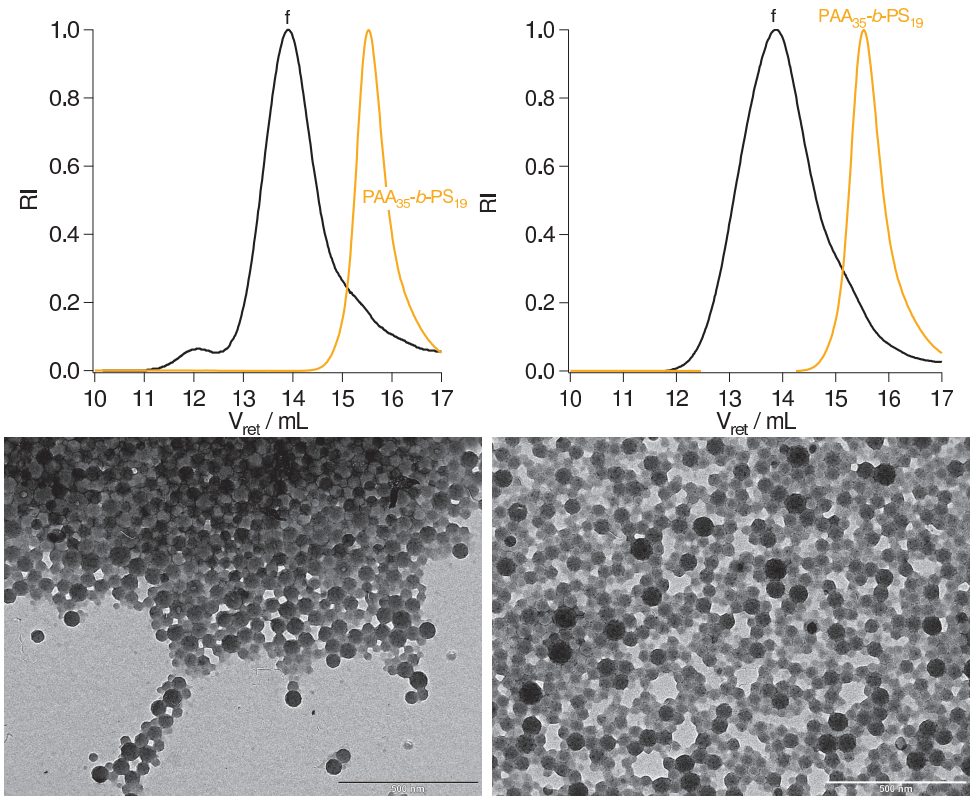


FIGURE 5.3 – Polymérisations en miniémulsion en présence de macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{19}-TTC, en utilisant un rapport $[S]_0/[RAFT]_0$ = 165 (gauche, CG94C) ou = 600 (droite, CG118C). Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF des expériences à la fin de la polymérisation en miniémulsion ainsi que du macro-agent RAFT. Bas : clichés de MET des NPs, barres d'échelle : 500 nm.

ancré à la surface des NPs que dans les cas précédents.

En revanche, les particules obtenues mesurent plus de 100 nm de diamètre, ce qui n'est pas intéressant d'un point de vue application des objets en biologie. Elles n'ont pas été analysées par MET à cause de leur forte taille et de la faible conversion en styrène.

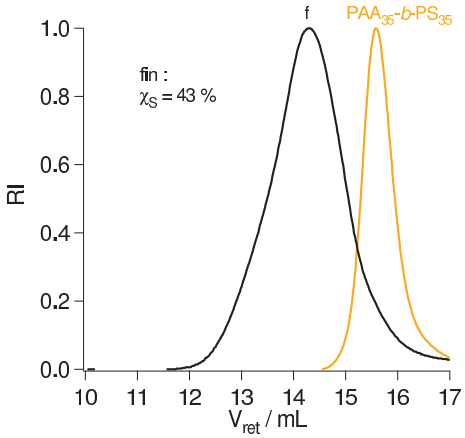


FIGURE 5.4 – Chromatogramme d'exclusion stérique dans le THF de copolymères PAA_{35}-*b*-PS synthétisés à partir de macro-agents RAFT PAA_{35}-*b*-PS_{35} par une polymérisation RAFT en miniémulsion (exp CG148C).

La polymérisation en miniémulsion du styrène en présence de macro-agent RAFT PAA_{35}-*b*-PS_x-TTC est possible. En revanche, il n'a pas été possible de trouver un système satisfaisant que ce soit en terme de taille et monodispersité des objets, tout en ayant un bon contrôle de la polymérisation.

Deux types de NPs à couronnes PAA_3 ou PAA_{35} ont été synthétisées. Dans le premier cas, le contrôle de la polymérisation est bon mais les NPs obtenues sont assez polydisperses. Dans le second cas, des NPs monodisperses ont pu être obtenues mais le contrôle de la polymérisation et le réamorçage des macro-agents RAFT est médiocre. Il n'a donc pas été envisagé de synthétiser des NPs fluorescentes en présence de macro-agents RAFT de type PAA_x-TTC.

5.2 Couronnes à base de PAPEO

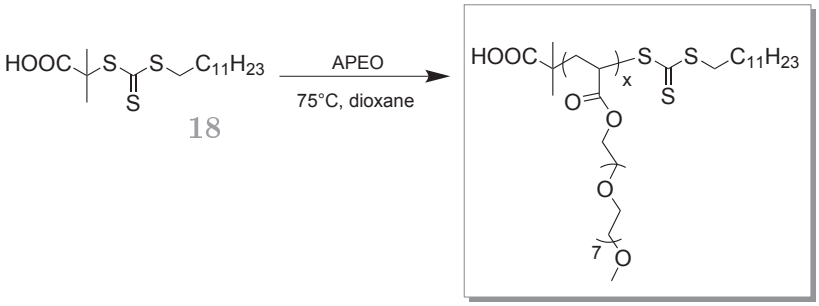
Il existe peu d'exemples dans la littérature de copolymères à bloc de type PAPEO-*b*-PS. On peut relever la synthèse de ce type de copolymères par polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxides en milieu homogène [328] ou par une méthode RAFT en émulsion [219, 285]. Réaliser la synthèse de ce type de copolymère par une méthode en miniémulsion est donc une nouveauté en terme de chimie des polymères.

Nous verrons ainsi la synthèse d'un macro-agent RAFT de type PAPEO-TTC en milieu homogène, puis son utilisation pour la synthèse de NPs cœur couronne de type PAPEO/PS par une polymérisation RAFT en miniémulsion.

Synthèse d'un macro-agent RAFT PAPEO-TTC

La synthèse d'homopolymères de type PAPEO par polymérisation radicalaire contrôlée a été rapportée en présence d'agents de transfert de type dithiobenozates [329] ou trithiocarbonates [219, 285] dans des solvants organiques.

Un macro-agent RAFT à base de poly(acrylate de PEO) a été synthétisé à partir de l'agent RAFT moléculaire TTCA **18** dans le dioxane à 75°C (Schème 5.2). Les conditions de la synthèse sont résumées dans le Tableau 5.4. Aucun suivi cinétique d'homopolymérisation n'a été réalisé pour ce macro-agent RAFT, mais la conversion est suivie *in situ* durant la polymérisation. La polymérisation est plus rapide que dans le cas d'une homopolymérisation de l'acide acrylique réalisée dans les mêmes conditions. Ce phénomène a déjà été rapporté et a été attribué à la présence d'une moins forte concentration en inhibiteurs de polymérisation dans l'APEO que dans l'AA [219].



Schème 5.2 – Synthèse du macro-agent RAFT PAPEO-TTC.

La polymérisation est arrêtée après 2h20, soit à 91 % de conversion. Le polymère est purifié par deux précipitations dans le *n*-pentane puis séché sous vide en chauffant à 50°C pendant deux jours et l'absence de monomère et solvant résiduels vérifiée par RMN du ^{1}H. Un liquide légèrement visqueux et jaune est obtenu. Le macro-agent RAFT obtenu présente en moyenne 11 unités d'acrylate de PEO et a une masse molaire de 5,4 kg/mol. Les masses molaires moyennes en nombre expérimentales et théoriques sont identiques, bien que la calibration conventionnelle utilisée en CES soit de type PS, et l'indice de polymolécularité faible (1,17).

Ce macro-agent RAFT de masse molaire contrôlée et purifié peut donc être employé pour la synthèse de NPs en miniémulsion.

5.2.1 Utilisation du macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC dans une polymérisation en miniémulsion

Le macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC est soluble dans le styrène, il peut donc être employé dans un procédé "one-pot" de polymérisation du styrène en miniémulsion. Trois synthèses ont été réalisées, toutes ayant un rapport $[M]_0/[RAFT]_0 = 200$.

Pour la première synthèse, la polymérisation en masse est arrêtée après 1h30 et la conversion du styrène est de 26 % après émulsification. Le bloc hydrophobe de PS com-

Tableau 5.4 – Conditions et résultats expérimentaux des synthèses du macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC. Synthèse réalisée dans le dioxane à 75°C, amorcées par l'ACPA, avec $[APEO]_0$ = 2,06 mol/$L_{diox.}$ et un rapport $[TTCA]_0/[ACPA]_0$ = 15.

Exp	$[APEO]_0/[TTCA]_0$	t min	χ^a_{APEO} %	n^b_{APEO}	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ SEC}$ kg/mol	I_P
CG159C	12	140	91	11	5,4	5,4	1,17

[a] Conversion en APEO déterminée par RMN du ^1H dans le $CDCl_3$ (§7.1.3). [b] Nombre moyen d'unités APEO dans le macro-agent RAFT formé.

prend alors 40 unités. L'inversion de phase est réalisée en ajoutant à la phase organique de l'eau légèrement basique ($[OH^-]/[RAFT]$ = 1,3) afin de pouvoir déprotoner l'unité acide présente à l'extrémité de la chaîne du macro-agent RAFT.

Tableau 5.5 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène (*co*-BDPMA) réalisées dans les conditions "one-pot" à 80°C en présence de macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC, arrêtées après 4h ($[M]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[M]_0/[RAFT]_0$ = 200, $[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 3, $[OH^-]/[RAFT]$ = 1,3, pH > 12).

Exp	n^a_{BDPMA}	t^b_0 min	$DP^{PS,c}_n$	$\chi^d_{S,f}$ %	$\chi^e_{BDPMA,f}$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ CES}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG162C	0	90	40	97	-	20,6	21,5	1,29	95 (0,03)
CG166C	0	150	65	75	-	17,0	15,7	1,37	90 (0,10)
CG172C	1,3	150	51	84	98	19,4	18,3	1,43	110 (0,18)

[a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] Durée de la polymérisation en masse. [c] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse. [d] Conversion molaire en styrène à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f) déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte de 25 % de styrène due à l'étape de sonication. [e] Conversion molaire en BDPMA déterminée par CES en utilisant la détection UV-vis. (λ = 528 nm).

À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène est élevée (97 %). Le chromatogramme d'exclusion stérique (Figure 5.5) présente un pic fin (I_P = 1,29), déplacé vers les plus fortes masses molaires. Une légère traînée est observée au niveau du macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC, certainement due à un réamorçage non total de celui-ci. Les masses molaires moyennes en nombre expérimentales et théoriques sont très proches. Le contrôle de la polymérisation du styrène en miniémulsion en présence de macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC est donc possible dans ces conditions.

L'analyse par DDL montre des objets monodisperses avec un diamètre légèrement inférieur à 100 nm (Tableau 5.5). Le diamètre et l'homogénéité des NPs sont confirmés par

les clichés de MET (FIGURE 5.5). En revanche, la morphologie des objets est surprenante : en effet, la quasi totalité des NPs présente une cavité. Il s'agit certainement de petites capsules de copolymères comprenant de l'eau en leur cœur. Cette morphologie atypique a déjà été observée lors de l'utilisation de macro-agents RAFT de type PEO-dithiobenzoate et ont été attribuées au PEO pouvant faire des doubles émulsions [270]. Cette structure peut éventuellement être gênante pour la réalisation de NPs fluorescentes.

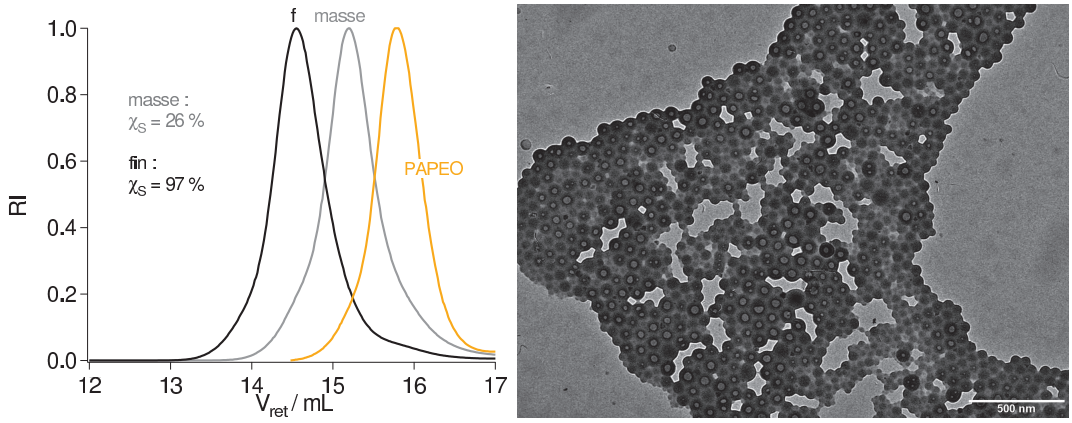


FIGURE 5.5 – Polymérisation en miniémulsion du styrène par le procédé "one-pot" en présence de macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC (exp CG162C). Gauche : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC. Droite : cliché de MET, barre d'échelle : 500 nm).

Nous avons alors légèrement modifié les conditions de polymérisation précédentes en poursuivant la polymérisation en masse durant 2h30 au lieu des 1h30 précédentes (TABLEAU 5.5). Ainsi, le bloc hydrophobe de PS devrait être plus grand. Cette différence de caractère tensioactif entre macro-agents RAFT de type $PAPEO_{11}$-*b*-PS_x-TTC peut conduire à un meilleur contrôle de la polymérisation et à une modification de la morphologie des objets (chapitre 2).

Une première expérience a été réalisée dans ces conditions en l'absence de BDPMA. Le bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse possède 65 unités. L'inversion de phase est réalisée et la polymérisation en miniémulsion démarrée. À la fin de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène est de 75 %. Le chromatogramme d'exclusion stérique (FIGURE 5.6) présente un pic assez fin, déplacé vers les plus fortes masses molaires. Il ne semble pas y avoir de macro-agent RAFT résiduel, contrairement au cas précédent en présence de macro-agents RAFT $PAPEO_{11}$-*b*-PS_{40}-TTC.

La DDL détecte des objets d'un diamètre similaire au cas précédent (D = 90 nm). Ces diamètres sont confirmés par les clichés de MET (FIGURE 5.6). Encore une fois, une partie des particules obtenues présente une cavité au cœur, mais leur nombre semble inférieur au cas précédent.

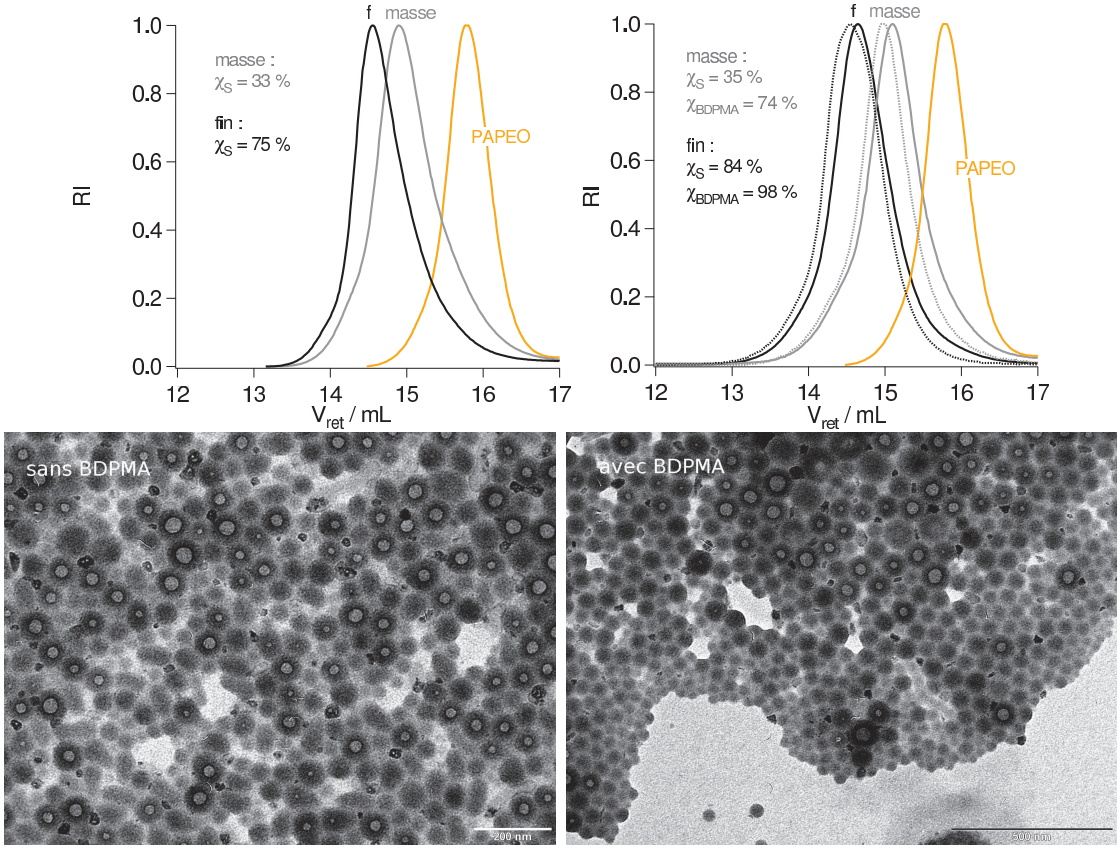


FIGURE 5.6 – Polymérisation en miniémulsion du styrène par le procédé "one-pot" en présence de macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC, en l'absence (exp CG166C, gauche) ou en présence de BDPMA (CG172C, droite). Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF (détection RI : - et UV-vis., λ = 528 nm : $\cdots$) à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT $PAPEO_{\mathbf{11}}$-TTC. Bas : clichés de MET, barres d'échelle : gauche : 200 nm, droite : 500 nm.

Des NPs fluorescentes ont alors été synthétisées dans les mêmes conditions. À l'issue de la polymérisation en masse, le BDPMA atteint 74 % de conversion, contre 35 % pour le styrène (FIGURE 5.6). Le bloc hydrophobe de P(S-*co*-BDPMA) est alors composé de 51 unités. L'inversion de phase est réalisée et la polymérisation en miniémulsion démarrée. À la fin de la polymérisation en miniémulsion, la conversion en styrène (corrigée) est de 84 % et celle en BDPMA de 98 %. Le BDPMA peut donc être copolymérisé au styrène dans ces conditions. L'incorporation du BDPMA au styrène est vérifiée par CES en utilisant la détection UV-vis. (λ = 528 nm) (FIGURE 5.6). Le chromatogramme d'exclusion stérique est fin et il ne semble pas y avoir de macro-agent RAFT $PAPEO_{11}$-TTC résiduel.

Les objets observés en DDL semblent légèrement plus gros que dans le cas précédent sans utilisation de BDPMA (D = 110 nm contre 90 nm) et les clichés de MET sont similaires (NPs sphériques, pleines ou contenant une cavité).

La synthèse de NPFs en présence de macro-agents RAFT de type $PAPEO_{11}$-TTC par un procédé "one-pot" est donc possible. Les NPs obtenues sont constituées de chaînes triblocs dont la polymérisation est contrôlée. En revanche, elles sont légèrement polydisperses en taille et en morphologie. Leurs caractéristiques spectroscopiques seront étudiées en détail dans la suite.

5.3 Couronnes à base de P(AA-*co*-APEO)

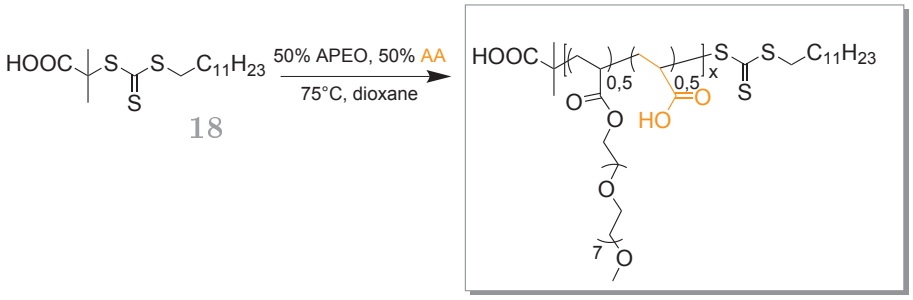
Tout comme les copolymères amphiphiles à base de PAPEO, il existe peu d'exemples dans la littérature de synthèse de copolymères de type P(AA-*co*-APEO)-*b*-PS [219, 285]. Des systèmes analogues à base d'acide méthacrylique (AMA) ou de méthacrylate de méthoxy poly(oxyde d'éthylène) sont plus largement renseignés [286, 330, 331, 332, 333].

La synthèse de NPs de styrène par une polymérisation en miniémulsion en présence de macro-agents RAFT de type P(AA-*co*-APEO)-TTC est donc nouvelle.

5.3.1 Synthèse des macro-agents RAFT P(AA-*co*-APEO)-TTC

Nous avons choisi de synthétiser des copolymères présentant le même nombre d'unités acide acrylique et acrylate de PEO. Les macro-agents RAFT P(AA-*co*-APEO) sont obtenus à partir de l'agent RAFT moléculaire TTCA. Ils sont synthétisés dans le dioxane à 75°C (SCHÈME 5.3) dans des conditions similaires à celles des macro-agents RAFT PAPEO-TTC ou PAA-TTC.

Aucun suivi cinétique de copolymérisation n'a été réalisé, les conversions en monomères étant suivies *in situ* durant la polymérisation en effectuant des prélèvements. Les cinétiques sont dans l'ensemble comparables à celles de l'homopolymérisation du PAPEO et plus rapides que l'homopolymérisation de l'AA, comme cela a déjà été rapporté [219].



SCHÈME 5.3 – Synthèse des macro-agents RAFTP($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_x$.

Trois macro-agents RAFT ayant différentes longueurs de blocs P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_x$ ont été synthétisés (TABLEAU 5.6). Ces macro-agents RAFT sont purifiés par deux précipitations dans le *n*-pentane à froid puis séchés sous vide à chaud pendant deux jours. L'absence de traces de monomères résiduels et de solvants est vérifiée par RMN du ^{1}H. Les macro-agents RAFT sont obtenus sous la forme d'une huile de couleur jaune.

TABLEAU 5.6 – Conditions et résultats expérimentaux des synthèses de macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_x$. Synthèses réalisées dans le dioxane à 75°C, amorcées par l'ACPA, avec $[AA]_0 = [APEO]_0 = 1{,}03$ mol/$L_{diox.}$ et un rapport $[TTCA]_0/[ACPA]_0 = 15$.

Exp	$[M]_0^a/[TTCA]_0$	t min	$\chi_M^{a,\,b}$ %	n_{AA}^c	n_{APEO}^c	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M_{n\ SEC}^{PS}$ kg/mol	I_P
CG174C	15	110	81	6	6	3,5	3,5	1,21
CG158C	25	140	86	11	11	6,2	6,0	1,16
CG140C	43	140	77	16	17	9,2	8,1	1,20

^{a} M correspond aux monomères AA et APEO. ^{b} Conversions en monomères déterminées par RMN du ^{1}H dans le $CDCl_3$. ^{c} Nombre moyen d'unités AA et APEO dans le copolymère formé.

Les macro-agents RAFT synthétisés présentent de bons indices de polymolécularité ($\leq$ 1,20). La détection UV-vis. réglée sur l'absorbance du groupement TTC (λ = 433 nm) montre que le groupement RAFT est bien présent dans les copolymères. Ces macro-agents RAFT peuvent donc être utilisés dans une polymérisation RAFT en miniémulsion du styrène (et du BDPMA).

5.3.2 Utilisation des macro-agents RAFT en miniémulsion

Ces trois types de macro-agents RAFT ont été utilisés pour la polymérisation en miniémulsion dans un premier temps du styrène seul, puis dans un second temps, du styrène copolymérisé au BDPMA. Le même procédé "one-pot" que celui employé pour la synthèse des particules à couronne PEO-*b*-PAA a été utilisé, à savoir une première extension de bloc PS par une polymérisation en masse du styrène en présence de macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_x$-TTC, puis une inversion de phase en ajoutant de

l'eau basique et une sonication afin de former les gouttes de monomères stabilisées par les copolymères amphiphiles $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_x$-*b*-PS-TTC. Les rapports $[M]_0/[RAFT]_0$ sont du même ordre de grandeur que ceux utilisés dans les précédentes polymérisations en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$-TTC. Le rapport $[OH^-]/[AA]$ est également le même qu'auparavant (1,3), à savoir un léger excès de soude par rapport au unités AA afin de déprotoner toutes les unités acides.

Pour les NPFs, nous avons choisi de travailler avec en moyenne 2 BDPMA par chaîne car cette quantité paraissait être un bon compromis entre brillance et quantité de BDPMA (chapitre 3). Cette partie présente individuellement la synthèse de NPs obtenues à partir des trois macro-agents RAFT évoqués précédemment.

Macro-agents RAFT $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{12}$-TTC

Nous présenterons d'abord l'utilisation des macro-agents RAFT $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{12}$-TTC (M_n = 3,5 kg/mol) car ce sont eux qui, en terme de masses molaires, sont les plus semblables aux macro-agents RAFT PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$-TTC ($M_n \approx$ 3,1 kg/mol).

Les conditions et résultats expérimentaux des synthèses de NPs en l'absence ou en présence de BDPMA sont résumés dans le Tableau 5.7.

Tableau 5.7 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène (*co*-BDPMA) réalisées dans les conditions "one-pot" à 80°C en présence de macro-agent RAFT $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{12}$-TTC ($[M]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 3, $[OH^-]/[AA]$ = 1,3, pH > 12).

Exp	n^a_{BDPMA}	$DP_n^{PS,b}$	$\chi^c_{S,f}$ %	$\chi^d_{BDPMA,f}$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ CES}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG175C	0	38	97	-	18,9	18,7	1,29	90 (0,07)
CG183C	1,8	27	100	97	18,2	19,6	1,29	85 (0,19)

L'expérience CG175C est réalisée avec un rapport $[M]_0/[RAFT]_0$ = 200 et la CG183C avec un rapport de 170. Les polymérisations en masse sont arrêtées après 70-80 min et les polymérisations en miniémulsion après 4h. [a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse. [c] Conversion molaire finale en styrène déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte de 25 % de styrène. [d] Conversion molaire finale en BDPMA déterminée par CES en utilisant la détection UV-vis. (λ = 528 nm).

Les polymérisations en masse sont arrêtées après 70-80 min. Les tailles de bloc PS sont respectivement de 38 et 27 unités en absence ou en présence de BDPMA. Ces longueurs respectives des deux blocs sont donc similaires à celles employées avec les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC ($\approx$ 20-30).

À la fin de la polymérisation en miniémulsion, la polymérisation des chaînes est contrô-

lée (FIGURE 5.7) avec des $I_P \approx 1{,}3$. Les masses molaires moyennes en nombre expérimentales et théoriques sont semblables. De plus, les chromatogrammes ne montrent pas de macro-agent RAFT résiduel. La polymérisation semble donc contrôlée et le réamorçage des macro-agents RAFT efficace.

Les NPs finales mesurent environ 85 nm de diamètre et sont relativement monodisperses. Néanmoins, les clichés de MET présentent des objets d'un diamètre comparable mais ayant une cavité (FIGURE 5.7). Celles-ci sont visibles, que ce soit en présence ou en absence de BDPMA, et sont certainement constituées d'eau. Ces morphologies sont similaires à celles des NPs synthétisées en présence de $PAPEO_{11}$ et pour lesquelles le bloc PS valait entre 40 et 65 unités au moment de l'inversion de phase.

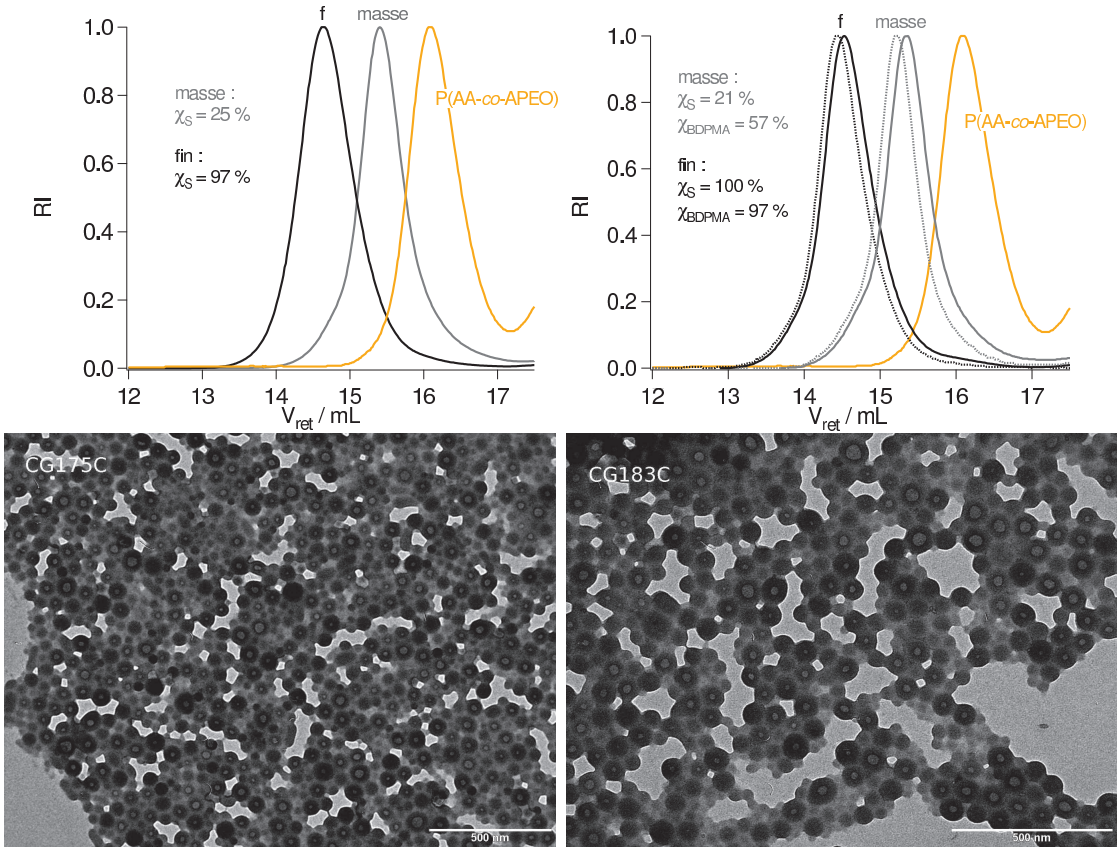


FIGURE 5.7 – Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF (détection RI : - et UV-vis., $\lambda = 528$ nm : $\cdots$) des expériences CG175C (gauche) et CG183C (droite) à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT $P(AA_{\mathbf{0,5}}\text{-}co\text{-}APEO_{\mathbf{0,5}})_{\mathbf{12}}$-TTC. Bas : clichés de MET des NPs CG175C (gauche) et CG183C (droite), barres d'échelle : 500 nm.

L'utilisation de macro-agents RAFT $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{12}$-TTC en miniémulsion par un procédé "one-pot" mène à la formation de NPs d'un diamètre nanométrique. La polymérisation est contrôlée tout au long de la synthèse et le réamorçage par les macro-agents RAFT est bon. Des NPFs à base de BDPMA peuvent être obtenues avec les mêmes

caractéristiques. Néanmoins, les NPs obtenues ont une morphologie de capsules contenant de l'eau.

Macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-TTC

Les macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-TTC ont une masse molaire quasiment deux fois plus grande que les macro-agents RAFT précédents ($M_n = 6{,}2$ kg/mol). Ils ont également été employés dans un procédé "one-pot" avec inversion de phase afin d'obtenir des NPs auto-stabilisées. Les conditions et résultats expérimentaux de ces synthèses sont résumés dans le Tableau 5.8.

Tableau 5.8 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène (*co*-BDPMA) réalisées dans les conditions "one-pot" à 80°C en présence de macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-TTC, arrêtées après 4h ($([M]_0 = 1{,}3$ mol/L_{eau}, $[M]_0/[RAFT]_0 = 200$, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[OH^-]/[AA] = 1{,}3$, pH > 12).

Exp	n^a_{BDP}	t^b_0 min	$\chi^c_{S,0}$ %	$DP_n^{PS,d}$	$\chi^c_{S,f}$ %	$\chi^e_{BDP,f}$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M^{PS}_{n\ CES}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG160C	0	90	32	46	97	-	20,9	21,6	1,55	85 (0,19)
CG169C	0	150	45	69	85	-	19,7	17,1	1,35	70 (0,12)
CG171C	2,0	150	41	66	97	97	22,4	18,5	1,40	85 (0,10)

[a] Nombre moyen d'unités BDPMA par chaîne polymère. [b] Durée de la polymérisation en masse. [c] Conversion molaire en styrène à la fin de la polymérisation en masse (0) et à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f) déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte de 25 % de styrène. [d] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse. [e] Conversion molaire en BDPMA déterminée par CES en utilisant la détection UV-vis. ($\lambda = 528$ nm).

Dans le chapitre 2, nous avons vu que la balance hydrophile/hydrophobe des macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-*b*-PS était un paramètre extrêmement important pour la réalisation de NPs polymères par une polymérisation contrôlée et à morphologie sphérique homogène.

Ainsi, une première synthèse de NPs a été réalisée en arrêtant la polymérisation en masse après 1h30. Le degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS est de 46. Ce bloc a volontairement été choisi plus long car la masse molaire de la partie hydrophile est plus élevée que dans toutes les expériences réalisées auparavant. L'inversion de phase est réalisée dans les mêmes conditions que d'habitude. À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, des NPs mesurant 85 nm de diamètre et relativement monodisperses sont obtenues (Tableau 5.8). Les clichés de MET présentent des objets sphériques mais relativement polydisperses.

Le chromatogramme d'exclusion stérique des chaînes de copolymère à la fin de la po-

lymérisation en masse montre un épaulement du pic vers les plus fortes masses molaires. À la fin de la polymérisation en miniémulsion, le pic n'est pas symétrique et présente une traînée vers les plus faibles masses molaires. Ce problème pourrait s'expliquer de deux manières : soit un problème de polymérisation est survenu lors de la synthèse du macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-*b*-PS_{46}-TTC (le pic à la fin de la polymérisation en masse est asymétrique), soit le réamorçage du macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-*b*-PS_{46}-TTC est mauvais. Cet effet avait déjà été observé dans le chapitre 2 lorsque la masse molaire du bloc hydrophobe était trop faible par rapport à celle du bloc hydrophile. Le macro-agent RAFT n'était alors pas ancré à l'interface entre le milieu aqueux et les gouttes de styrène.

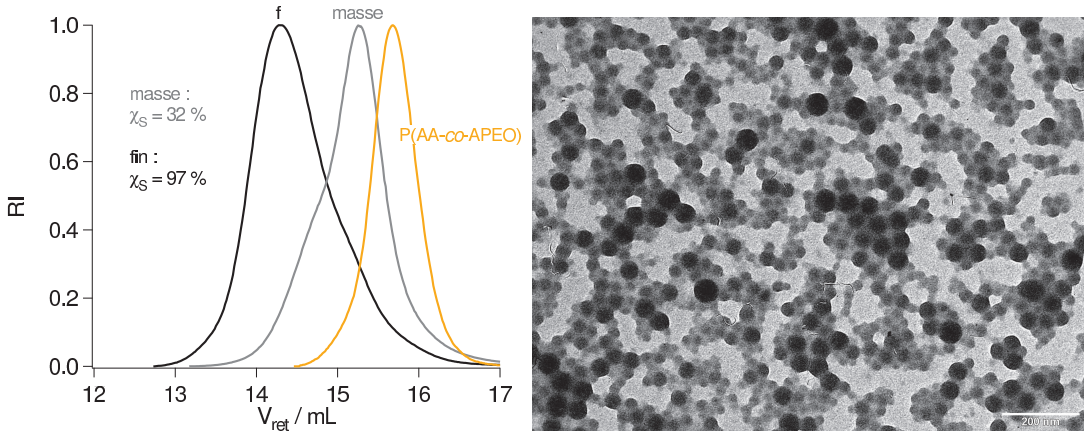


FIGURE 5.8 – Polymérisation en miniémulsion du styrène par un procédé "one-pot" en présence de macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-TTC (exp CG160C). Gauche : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-TTC. Droite : cliché de MET, barre d'échelle : 200 nm.

Par la suite, la même expérience a été réalisée mais cette fois-ci en augmentant la longueur du bloc PS du macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-*b*-PS_x-TTC (exp CG169C, TABLEAU 5.8). Pour cela, la polymérisation en masse est poursuivie pendant 2h30, au lieu de 1h30 précédemment. La conversion en styrène est alors de 45 % et semble toujours suivre la même cinétique que celle de la FIGURE 2.6 (polymérisation en masse du styrène en présence de macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-TTC). Le macro-agent RAFT obtenu présente un bloc PS de 69 unités. Malgré cette forte conversion en styrène, le milieu réactionnel est très peu visqueux et l'inversion de phase et l'étape de sonication se déroulent normalement. La polymérisation en miniémulsion est donc poursuivie.

Le chromatogramme d'exclusion stérique à la fin de la polymérisation en miniémulsion montre un pic symétrique et relativement fin (I_P = 1,35). Les masses molaires moyennes en nombre et théoriques sont du même ordre de grandeur.

Les NPs obtenues mesurent 70 nm de diamètre et sont monodisperses (TABLEAU 5.8). Les clichés de MET montrent des objets sphériques ayant un cœur de 40 nm de diamètre environ. Ces images confirment la monodispersité des objets et permettent également de

voir que ces NPs sont pleines, contrairement aux NPs à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{11}$-*b*-TTC.

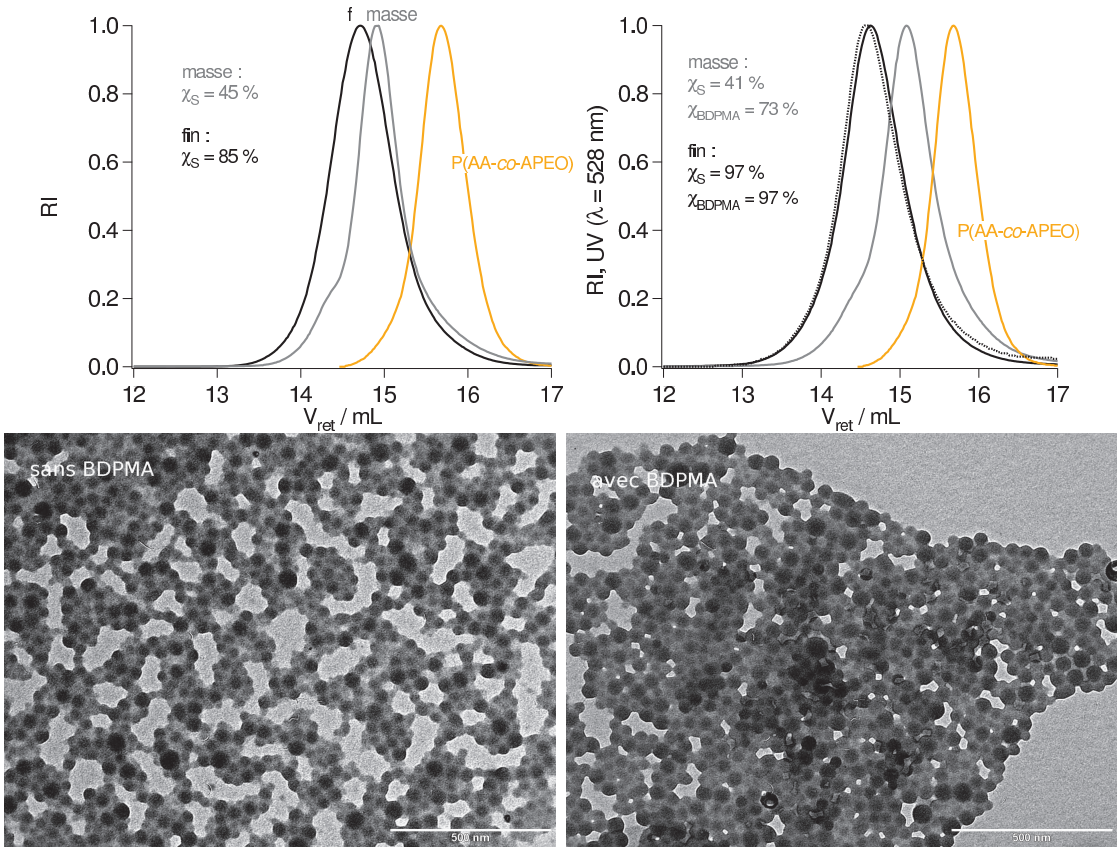


FIGURE 5.9 – Polymérisation en miniémulsion du styrène par un procédé "one-pot" en présence de macro-agents RAFT $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$-TTC en l'absence (CG169C, gauche) ou en présence (CG171C, droite) de BDPMA. Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF (détection RI : - et UV-vis. $\lambda = 528$ nm : $\cdots$) à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT $P(\mathbf{AA_{0,5}}\text{-}co\text{-}\mathbf{APEO_{0,5}})_{\mathbf{22}}$-TTC. Bas : clichés de MET des NPs, barres d'échelle : 500 nm.

La même synthèse a alors été réalisée en présence de BDPMA ($[BDPMA]_0 = 0{,}9$ mol % par rapport au styrène). Ce dernier est bien incorporé à la chaîne polymère et se polymérise encore une fois plus rapidement que le styrène ($\chi_{BDPMA} = 73\%$ et $\chi_S = 41\%$, FIGURE 5.9). Les chromatogrammes d'exclusion stérique montrent des pics fins et symétriques. L'indice de polymolécularité au temps final est raisonnable, de 1,40. Les NPFs obtenues sont sphériques et monodisperses, d'un diamètre hydrodynamique de 85 nm (TABLEAU 5.8).

Il est donc possible de synthétiser des NPFs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ par le procédé en miniémulsion "one-pot". Ces NPFs ont des caractéristiques similaires à celles obtenues avec une couronne PEO-*b*-PAA en terme de diamètres et de masses molaires des chaînes dont elles sont composées.

Macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-TTC

Un dernier macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-TTC a été testé, cette fois-ci avec une masse molaire élevée, de 9,2 kg/mol. Comme pour les deux types de macro-agents RAFT précédents, celui-ci a été employé dans une polymérisation en miniémulsion "one-pot" du styrène. Les conditions et résultats expérimentaux sont résumés dans le Tableau 5.9.

Tableau 5.9 – Conditions et résultats expérimentaux des polymérisations en miniémulsion du styrène réalisées dans les conditions "one-pot" à 80°C en présence de macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-TTC, arrêtées après 4h ($[S]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[RAFT]_0/[AIBN]_0$ = 3, $[OH^-]/[AA]$ = 1,3, pH > 12).

Exp	$\frac{[S]_0}{[RAFT]_0}$	t_0^a min	$\chi_{S,0}^b$ %	$DP_n^{PS,c}$	$\chi_{S,f}^b$ %	$M_{n\ th}$ kg/mol	$M_{n\ CES}^{PS}$ kg/mol	I_P	D_z (σ) nm
CG145C	240	75	18	35	99	30,0	27,7	1,56	100 (poly)
CG28D	200	150	46	70	98	26,8	24,4	1,36	110 (0,14)

[a] Durée de la polymérisation en masse. [b] Conversion molaire en styrène à la fin de la polymérisation en masse (0) et à la fin de la polymérisation en miniémulsion (f) déterminée par gravimétrie et corrigée de la perte de 25 % de styrène. [c] Degré de polymérisation moyen en nombre du bloc PS à l'issue de la polymérisation en masse.

Une première expérience a été réalisée en arrêtant la polymérisation en masse après 75 min. La longueur du bloc PS est alors de 38 unités. L'inversion de phase est réalisée et la polymérisation en miniémulsion démarrée. À l'issue de la polymérisation en miniémulsion, des NPs d'environ 100 nm de diamètre sont obtenues mais elles sont polydisperses. Une analyse par MET confirme cette polydispersité (Figure 5.10). Ces clichés montrent des NPs sphériques et pleines dont la majorité mesurent entre 40 et 50 nm de diamètre, cependant des NPs de plus grand diamètre (D = 100-110 nm) sont également observées. Ce sont ces NPs qui sont certainement majoritairement observées par DDL puisque ce sont les objets les plus diffusants du milieu.

Le chromatogramme d'exclusion stérique au temps final présente une traînée vers les faibles masses molaires, certainement dû à un réamorçage non total du macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-*b*-PS_{38}-TTC.

Ces résultats tendent vers les mêmes observations que précédemment, c'est-à-dire que la masse molaire du bloc hydrophobe PS est trop faible pour assurer la stabilité colloïdale des particules et un bon contrôle de la polymérisation.

Afin d'améliorer la stabilité colloïdale des NPs, une polymérisation similaire a été réalisée mais en augmentant la taille du bloc hydrophobe PS (CG28D). Cela est réalisé en poursuivant la polymérisation en masse durant 2h30. Le macro-agent RAFT amphiphile P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-*b*-PS_{70}-TTC possède alors 70 unités styrène. La polymérisation

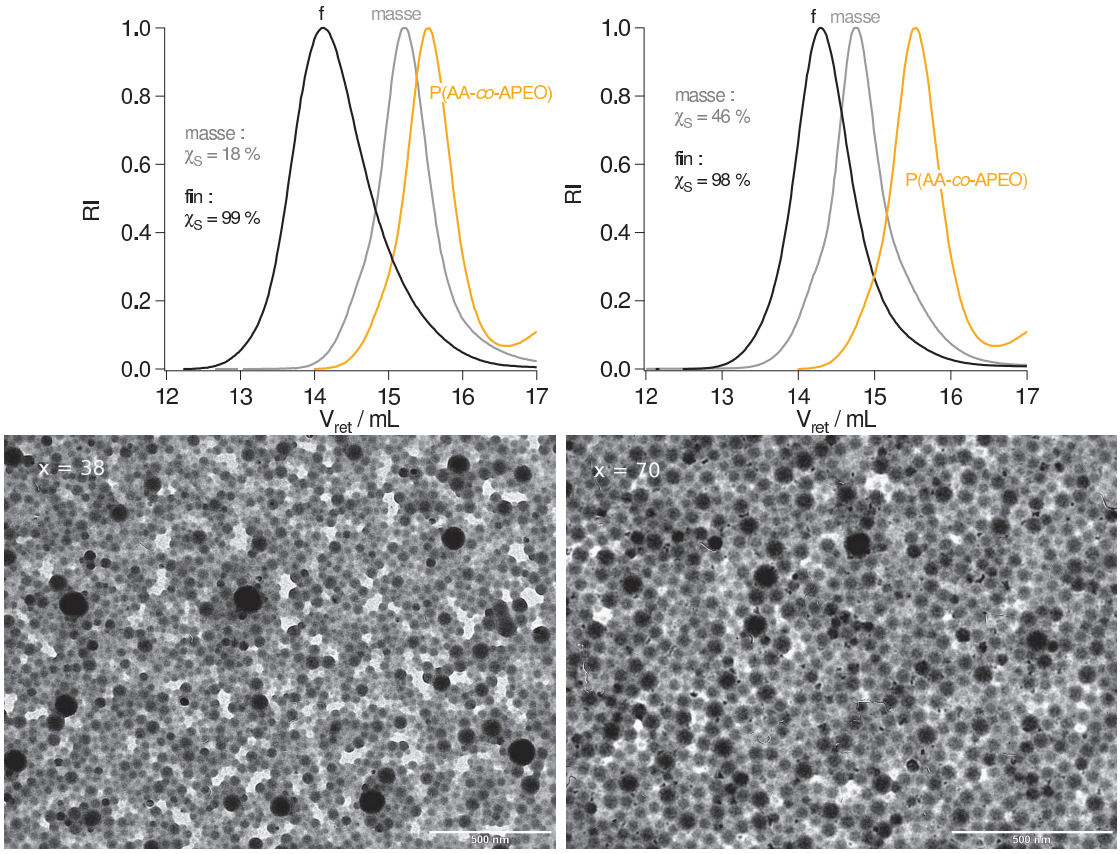


FIGURE 5.10 – Polymérisation en miniémulsion du styrène par un procédé "one-pot" en présence de macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-TTC présentant différentes longueurs de blocs PS_x à l'issue de la polymérisation en masse ($x = 38$, gauche, CG145C) et ($x = 70$, droite, CG28D). Haut : chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF à la fin de la polymérisation en masse et à la fin de la polymérisation en miniémulsion, ainsi que du macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-TTC. Bas : clichés de MET des NPs, barres d'échelle : 500 nm.

en miniémulsion est réalisée selon les conditions habituelles.

Les NPs obtenues mesurent sensiblement le même diamètre que celles avec le macro-agent RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-*b*-PS_{38}-TTC. Elles sont néanmoins plus monodisperses. Les clichés de MET (Figure 5.10) confirment ces diamètres et semblent également confirmer que les objets sont légèrement plus monodisperses.

Le chromatogramme d'exclusion stérique (Figure 5.10) montre un bon réamorçage des macro-agents RAFT P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{33}$-*b*-PS_{70}-TTC. L'indice de polymolécularité à l'issue de la polymérisation est bon (1,36) et les masses molaires moyennes en nombre théoriques et expérimentales similaires (Tableau 5.9). Le contrôle de la polymérisation en miniémulsion du styrène avec ce type de macro-agent RAFT est donc possible.

Conclusion

Trois types de NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_x$-TTC et à cœur PS (ou P(S-*co*-BDPMA)) ont été synthétisés. Les NPs à couronne hydrophile présentant 11 ou 22 unités AA et APEO sont d'un diamètre inférieur à 100 nm, ce qui n'est pas le cas de celles ayant une couronne de 33 unités.

5.4 Résumé sur les différentes couronnes hydrophiles

Différentes NPs à cœur PS seul ou P(S-*co*-BDPMA) et à couronne à base d'AA et/ou d'APEO ont pu être synthétisées. Les principales caractéristiques de ces objets sont résumées dans le Tableau 5.10. La composition des macro-agents RAFT en terme de masse molaire du bloc hydrophile comparée à la masse molaire totale (estimée de manière simplifiée sous la forme du rapport HLB, équation 2.1) influe sur le diamètre et la morphologie des NPs, ainsi que sur le contrôle de la polymérisation. Pour les couronnes composées de motifs de poly(oxyde d'éthylène) et d'acide acrylique, il semble que la HLB doive être inférieure à 10-11 pour qu'il puisse y avoir un contrôle de la polymérisation du styrène en miniémulsion. Néanmoins, dans le cas de certains copolymères à base de de poly(oxyde d'éthylène) et d'acide acrylique, lorsque la masse molaire du bloc hydrophile devient trop faible comparativement au bloc hydrophobe (HLB = 8-9), les particules comportent une cavité, certainement remplie d'eau. Cela est certainement dû à la trop forte solubilité de ces macro-agents RAFT dans le styrène.

Pour les NPs à couronne PAA, cet effet n'est pas observé dans les conditions de synthèse employées (pH $>$ 12), certainement car le PAA déprotoné ne peut pas être solubilisé dans le styrène (contrairement aux copolymères précédents où les groupements PEO aidaient à cette solubilité). Des particules sphériques sont toujours obtenues dans ce cas. En revanche, pour ce type de couronnes hydrophiles (PAA_{35}), même avec une HLB $<$ 8, le contrôle de la polymérisation n'est pas assuré. Il se peut que dans le cas de ces copolymères amphiphiles PAA_{35}-*b*-PS_x, le bloc hydrophobe doive être plus grand pour permettre l'ancrage de ce dernier dans les gouttes de styrène. Seul dans le cas d'une

couronne de faible masse molaire, de type PAA_3, le contrôle de la polymérisation a été assuré (HLB = 2).

À titre comparatif, tous les macro-agents RAFT de type PAA_5-*b*-PS_y-TTC-C_4 utilisés par Hawkett et coll. pour stabiliser la polymérisation en miniémulsion du styrène (à pH 8) présentent des HLB comprises entre 2 et 4. Les gouttelettes de départ ne sont stables qu'en présence de macro-agents RAFT ayant un bloc PS supérieur ou égal à 15 unités (HLB $\leqslant$ 3). Les NPs obtenues mesurent en moyenne 40 nm pour un rapport initial $[S]_0/[RAFT]_0 = 200$. En présence de macro-agents RAFT PAA_{20}-*b*-PS_{28}-TTC-C_4 (HLB = 6), les gouttelettes de styrène sont plus stables qu'en présence des macro-agents RAFT précédents, ce qui pourrait être attribué à un plus long bloc PS, malgré cette HLB supérieure. Les NPs obtenues dans les mêmes conditions ont le même diamètre et une morphologie sphérique et sont pleines. La polymérisation est en revanche moins contrôlée que pour nous puisque les I_P sont compris entre 1,5 et 2.

Tableau 5.10 – Caractéristiques principales des NPs à différentes couronnes hydrophiles et à cœurs PS, synthétisées par une polymérisation "one-pot" en miniémulsion dans les conditions du Tableau 2.18 ($[S]_0$ = 1,3 mol/L_{eau}, $[S]_0/[RAFT]_0 = 200$, $[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 3$, $[OH^-]/[AA]$ = 1,3, pH > 12).

macro-RAFT amphiphile[a]	HLB[b]	I_P	D_z nm	morphologie[c]	C[d]
PEO_{45}-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_7^e	14	3,35	80	pleines, monodisperses	
PEO_{45}-*b*-PAA_{12}-*b*-$PS_{\approx 25}^e$	10	1,32	60	pleines, monodisperses	$\surd$
PEO_{45}-*b*-PAA_{12}-*b*-PS_{40}^e	8	1,32	85	creuses, polydisperses	
PAA_3-*b*-PS_{15}	2	1,36	95	pleines, polydisperses	
PAA_{35}-*b*-PS_{19}	10	1,84	65	pleines, monodisperses	
PAA_{35}-*b*-PS_{35}	8	2,04	150	-	
$PAPEO_{11}$-*b*-PS_{40}	10	1,29	95	creuses, monodisperses	($\surd$)
$PAPEO_{11}$-*b*-PS_{65}	8	1,37	90	creuses, monodisperses	($\surd$)
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{12}$-*b*-PS_{38}	8	1,29	90	creuses, monodisperses	
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$-*b*-PS_{46}	11	1,55	85	pleines, polydisperses	
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$-*b*-PS_{69}	9	1,35	70	pleines, monodisperses	$\surd$
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{33}$-*b*-PS_{35}	14	1,56	100	pleines, polydisperses	
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{33}$-*b*-PS_{70}	11	1,36	110	pleines, polydisperses	

[a] Structure du macro-agent RAFT amphiphile au moment de l'inversion de phase. [b] balance hydrophile-lipophile (équation 2.1). [c] Morphologies des NPs observées sur les clichés de MET. [d] Critères de contrôle de la polymérisation (I_P < 1,3-1,4), diamètres (< 100 nm) et polydispersité des NPFs respectés. [e] $[S]_0/[RAFT]_0 = 160$ pour ces expériences.

5.5 Propriétés de surface des NPFs

Nous avons voulu savoir quelles étaient les propriétés physico-chimiques de la couronne des NPFs évoquées précédemment. Des mesures de diffusion dynamique de la lumière et de potentiel ζ à différents pH ont ainsi été réalisées. Le nombre d'agrégation des objets a également été estimé par MET et par diffusion statique de la lumière.

5.5.1 Sensibilité au pH des NPFs

Les NPFs fluorescentes à couronne PEO-*b*-PAA précipitent en milieu acide mais ce phénomène est réversible puisqu'elles peuvent être redispersées en milieu basique (Figure 5.11, Tableau 5.11). Elles peuvent également être redispersées en milieu tamponné (PBS 1 ×). Pour cela, il faut les centrifuger avant l'ajout du tampon car le pouvoir de ce dernier n'est pas assez fort pour permettre la redispersion des NPFs si le pH initial est trop bas (Figure 5.11). Les diamètres mesurés avant et après précipitation sont similaires (Tableau 5.11). Ces NPs redispersées dans un tampon PBS ont également été analysées à 37°C. Le diamètre des NPs est alors légèrement supérieur qu'à 25°C, cela pourrait être dû à une mauvaise estimation de la viscosité lors du calcul du rayon hydrodynamique.

Cette sensibilité au pH pourrait être mise à profit pour purifier ou concentrer les NPFs, ou pour les redisperser facilement dans un tampon biologique.

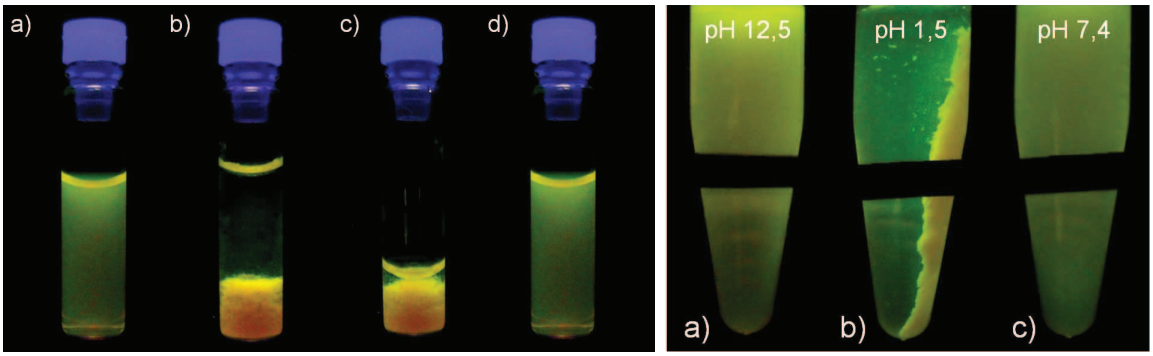


Figure 5.11 – Précipitation des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA) en milieu acide et leur redispersion en milieu alcalin. Gauche : a) NPFs à pH > 12 ; b) précipitation des NPFs par ajout de quelques gouttes d'une solution d'HCl à 1M (pH 1,5) ; c) prélèvement du surnageant ; d) Redispersion des NPFs par ajout d'eau et de quelques gouttes d'une solution de NaOH à 1M (pH > 12). Droite : a) NPFs à pH 12,5 ; b) précipitation des NPFs par ajout de quelques gouttes d'une solution d'HCl à 1M (pH 1,5) et centrifugées à 3000 tours/min. pendant 2 min. ; c) Redispersion des NPFs dans du tampon PBS 1 × (pH 7,4). Photographies réalisées en excitant les NPFs à l'aide d'une lampe UV-365 nm.

La sensibilité des dispersions aqueuses de NPFs en fonction du pH a été suivie par diffusion dynamique de la lumière en mesurant pour chaque pH le diamètre hydrodynamique moyen des objets ainsi que l'indice de polydispersité (Figure 5.12). Ces valeurs ont peu de sens physique lorsque des agrégats sont formés mais ils rendent facilement compte

TABLEAU 5.11 – Diamètres hydrodynamiques des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA), à différents pH et températures.

conditions de dispersion des NPFs	pH	T[a] °C	D_z (σ) nm
eau, après la polymérisation	12,5	20	65 (0,08)
eau, redispersées après acidification	12,5	20	68 (0,15)
PBS 1 ×, redispersées après acidification et centrifugation	7,4	25	63 (0,14)
PBS 1 ×, redispersées après acidification et centrifugation	7,4	37	77 (0,09)

[a] Température d'analyse des NPFs.

de la précipitation des NPFs. La FIGURE 5.12 montre qu'à des pH inférieurs à 5,5, l'indice de polydispersité des dispersions de NPFs commence à augmenter, ce qui signifie certainement qu'il y a formation d'agrégats de NPFs. Le diamètre des NPFs augmente dramatiquement pour des pH inférieurs à 4. Par ces mesures, nous pouvons conclure que les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA précipitent pour des pH compris entre 4 et 5,5, ce qui correspond à la zone du pK_a du poly(acide acrylique). À des pH inférieurs au pK_a du PAA, celui-ci devient hydrophobe et n'assure plus la stabilité colloïdale des NPFs par répulsion électrostatique inter-chaînes au sein d'une NP et inter-NPFs.

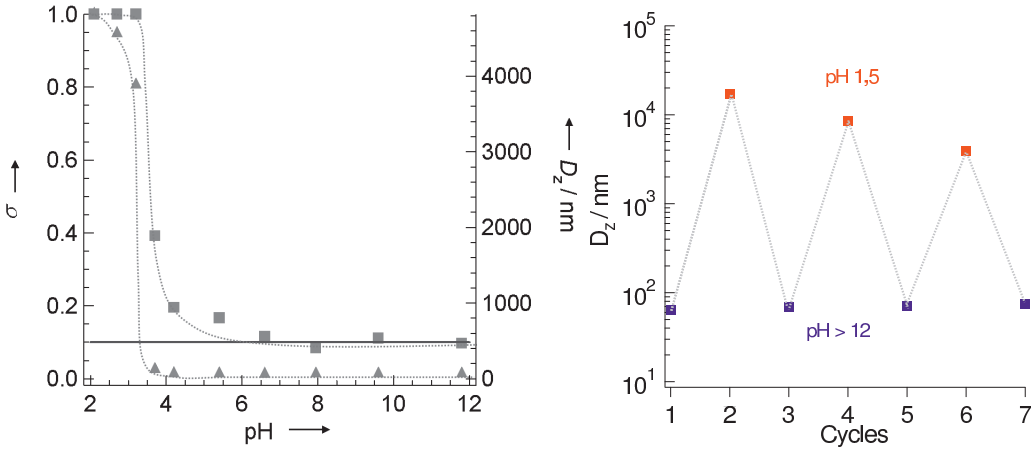


FIGURE 5.12 – Sensibilité au pH des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA) à 25°C. Gauche : évolution du diamètre hydrodynamique des NPFs (D_z, ▲) et de l'indice de polydispersité (σ, ■) avec le pH. Le trait continu correspond à $\sigma = 0{,}1$. Droite : Diamètres hydrodynamiques des NPFs après des cycles successifs d'acidification/basification.

Ces résultats rejoignent ceux présentés par Cheng et coll. qui ont étudié la formation d'agrégats micellaires entre des polymères de type PAA_{77} et des micelles de PEO_{182}-*b*-PS_{240} [334]. Pour des pH < 3, il y a formation d'agrégats micellaires entre les chaînes de PAA et les micelles de PEO-*b*-PS. Pour des pH compris entre 3 et 4,8, les auteurs observent une simple adsorption des chaînes de PAA sur les micelles de PEO-*b*-PS. Enfin, à des pH supérieurs à 4,8, les micelles de PEO-*b*-PS sont observées seules, sans adsorption

de PAA. Ces effets ont été attribués à la formation de liaisons hydrogènes entre les unités EO et AA dans les milieux acides.

La réversibilité de ces systèmes a été testée en effectuant différents cycles de précipitation / dispersion des NPFs (par ajout respectivement d'aliquotes de solution de HCl à 1M ou de solution de NaOH à 1M Figure 5.12). Après redispersion en milieu basique, les particules retrouvent les mêmes rayons hydrodynamiques mais l'indice de polymolécularité devient supérieur à ce qu'il était initialement (Tableau 5.11). Ces mesures ont été effectuées sans agitation ou sonication des NPFs. Il pourrait donc y avoir quelques agrégats de NPFs qui demeurent en solution et qui n'ont pas eu le temps de se dissocier.

Les particules à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{12\ ou\ 22}$ ne précipitent pas en milieu acide. Cela est certainement dû à l'alternance des unités AA et APEO et à la structure greffée (contrairement à la structure linéaire des copolymères PEO-*b*-PAA) de ces derniers dans la couronne qui permet une stabilité colloïdale des NPFs et ce même en milieu acide. Ainsi, il n'y a pas formation d'un bloc totalement hydrophobe contrairement aux NPFs à couronne PEO-*b*-PAA.

Enfin, bien évidemment, les NPFs à couronne PAPEO ne précipitent pas en milieu acide.

Les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA ou à couronne P(AA-*co*-APEO) ont des comportements très différents en milieu acide. Les premières étant très sensibles au pH. Pour des expériences en milieux biologiques, il faudra donc veiller à ne pas les exposer à des milieux trop acides. Pour les autres types de couronnes, ces précautions ne sont pas nécessaires.

5.5.2 Potentiel ζ

Le potentiel ζ de NPs à couronnes PEO-*b*-PAA et à couronnes P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ a été mesuré afin d'évaluer la charge apparente des NPs. Ces mesures ont été réalisées au laboratoire Physico-Chimie (UMR 168) de l'Institut Curie dans l'équipe du Dr. Min-Hui Li et avec l'aide de Sabrina Hocine. Les mesures ont été réalisées dans l'eau à 25 °C pour différents pH pour des particules avec ou sans BDPMA à cœur. À cause de la précipitation des NPs à couronne PEO-*b*-PAA, aucune mesure n'a été réalisée pour des pH inférieurs à 6. Les résultats sont résumés dans le Tableau 5.12.

Pour les particules de type PEO-*b*-PAA, le potentiel ζ est négatif, quelque soit le pH. Cette valeur négative est d'une part attribuée à la présence des unités AA déprotonées pour les pH analysés, et d'autre part à la présence des groupements PEO. En effet, les particules à cœur PS et à couronne PEO ont globalement des potentiels ζ négatifs [77, 335].

Pour les particules de type P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$, les valeurs du potentiel ζ sont également globalement négatives pour les milieux neutres à basiques (pH = 6-8). Ces potentiels ζ sont plus négatifs que ceux observés dans le cas des couronnes diblocs PEO-

Tableau 5.12 – Potentiels ζ (mV) mesurés dans l'eau à une concentration en NaCl de 14 mM, à 25°C, pour différents types de NPs et à différents pH (tampons phosphate / citrate 1mM).

Exp	copolymère	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
CG96C	PEO-*b*-PAA_{19}-*b*-PS_{120}			-16	-17	-17
CG174B	PEO-*b*-PAA_{12}-*b*-P(S-*co*-BDPMA)$_{120}$		-20	-17	-14	-16
CG169C	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-*b*-PS_{160}	-12		-26	-28	-24
CG171C	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$-*b*-P(S-*co*-BDPMA)$_{160}$	-16		-29	-36	-30

b-PAA, ce qui peut être attribué à la différence de distribution des unités AA dans la couronne hydrophile. Une augmentation de la valeur du potentiel ζ est observée à pH 4, ce qui est certainement dû à la protonation des acides acryliques. Le potentiel ζ renseigne également sur la stabilité colloïdale des nanoparticules. Les plus fortes valeurs absolues de potentiels ζ enregistrées pour les NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ peuvent peut-être expliquer leur meilleure stabilité que les NPs à couronne PEO-*b*-PAA.

5.5.3 Évaluation du nombre d'agrégation par MET et DSL

Le nombre d'agrégation peut être estimé à l'aide de clichés de MET (équation 3.1) et par diffusion statique de la lumière. Cette technique permet de mesurer la masse molaire moyenne en masse de NPs polymères. Le nombre d'agrégation est alors donné par :

$$N_{agg} = \frac{M_{\text{w, NPs}}}{M_{\text{w, chaînes}}} \tag{5.1}$$

où : $M_{\text{w, chaînes}}$ masse molaire moyenne en masse des chaînes de copolymères
$M_{\text{w, NPs}}$ masse molaire moyenne en masse des NPs

Dans notre cas, les $M_{\text{w, chaînes}}$ sont calculées par le produit des masses molaires moyennes en nombre théoriques multipliées par l'indice de polymolécularité des chaînes déterminé par CES.

Les mesures de diffusion statique de la lumière ont été réalisées au laboratoire Polymères, Colloïdes et Interfaces (UMR 6120) de l'Université du Maine, avec l'aide du Pr. Christophe Chassenieux. Les mesures d'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) ont été réalisées au laboratoire de Physico-chimie des Polymères et Milieux Dispersés Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (UMR 7615) de l'ESPCI.

Seuls deux types de NPFs ont pu être analysés par manque de temps. Les résultats sont résumés dans le Tableau 5.13. Les N_{agg}^{MET}, N_{agg}^{SLS} et dn/dc sont donnés avec une erreur de 15 %.

Pour les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA ou P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$, les nombres d'agrégation déterminés par diffusion statique de la lumière ou par MET sont du même ordre de grandeur. Les NPFs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ présentent un nombre d'agrégation inférieur à celui des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA. Pour les deux types de particules,

TABLEAU 5.13 – Caractérisation des NPFs à différentes couronnes hydrophiles et à cœur P(S-*co*-BDPMA) par microscopie électronique à transmission et diffusion statique de la lumière (25°C).

couronne	D_z	MET			$\frac{dn}{dc}$	DSL	
		D^a_{MET}	$N^{MET,\,a}_{agg}$	d^b		$N^{DSL,\,c}_{agg}$	$\frac{R_g}{R_h}$
	nm	nm		chaînes/nm^2			
PEO-*b*-PAA	65	40	1750	0,35	0,16	1610	0,78
P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$	85	37	1030	0,24	0,20	1170	0,80
P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{12}$	85	70	-	-	-	-	-
$PAPEO_{11}$	110	60	-	-	-	-	-

[a] Respectivement diamètre du cœur des NPFs et nombre d'agrégation déterminés à l'aide des clichés de MET (équation 3.1). [b] Densité des chaînes hydrophiles à la surface des NPFs, calculé par l'équation 5.2. [c] Nombre d'agrégation déterminé par DSL.

le rapport R_g/R_h confirme la présence de sphères dures.

La densité des chaînes à la surface des NPFs peut être estimée par :

$$d = \frac{N^{MET}_{agg}}{4\pi \frac{D_{TEM}}{2}^2} \tag{5.2}$$

Ainsi, on trouve une densité de chaînes plus grande à la surface des NPFs de type PEO-*b*-PAA que pour les NPFs à surface P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$. Ceci peut être expliqué par le fait que les couronnes de type PAPEO sont plus encombrantes à cause des chaînes latérales d'APEO en forme de brosses. La densité de greffage des copolymères hydrophiles est un paramètre déterminant dans la furtivité des NPs [335] à cause de l'adsorption non spécifique des protéines sur leur surface [74, 76]. Des études ont montré que la distance entre unités PEO doit être inférieure à 1 nm pour éviter l'adsorption de petites protéines ($r \approx 2$ nm) et inférieure à 2 nm pour les plus grosses protéines ($r \approx$ 5-6 nm) [336]. Dans notre cas, pour les deux types de NPFs évoquées ci-dessus, la densité de chaînes est d'environ 0,3 chaînes/nm^2 (ou 1 chaîne dans 3,3 nm^2) (TABLEAU 5.13), soit une distance inter-chaînes d'environ 2 nm si on assimile les chaînes à un point au milieu d'un carré de 3,3 nm^2. Les particules auront donc peut-être une certaine furtivité en milieu biologique.

Pour les NPFs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{12}$ ou $PAPEO_{11}$, le nombre d'agrégation déterminé par MET est plus surprenant car de 8500 environ. Ce nombre d'agrégation est certainement faussé car les particules n'ont pas une morphologie de sphères pleines, mais ont une cavité en leur centre. Le calcul du nombre d'agrégation par l'équation 3.1 est donc certainement faux, ainsi que le calcul de la densité de chaînes à la surface des objets (qui ne tiennent pas compte de la surface interne des cavités).

5.6 Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différentes couronnes à base de PEO, AA et APEO

5.6.1 Spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps

Quatre types de NPFs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronnes à base de PEO et de PAA ont été synthétisées. Leurs caractéristiques spectroscopiques sont résumées dans le Tableau 5.14.

Tableau 5.14 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différentes couronnes hydrophiles, mesurées dans l'eau à 20°C ([NPF] ≈ 0,01 wt %).

Exp	couronne	n^a_{BDPMA}	$[BDPMA]^b$ mol/L_S	Φ_F	$\overline{\tau}^c$ ns	$\Delta^d_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta^d_{1/3}$ cm^{-1}
CG178B	PEO-*b*-PAA	2,1	0,17	0,24	3,2	980	1360
CG174B	PEO-*b*-PAA	1,1	0,08	0,39	4,3	980	1380
CG183C	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{12}$	1,8	0,13	0,44	4,2	1230	1940
CG171C	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	1,9	0,10	0,52	4,5	1300	1990
CG172C	$PAPEO_{11}$	1,3	0,08	0,58	4,9	970	1410

[a] Nombre moyen de BDPMA par chaîne de copolymère. [b] Concentration en BDPMA en mole par litre de styrène. [c] Durée de vie moyenne déterminée à l'aide de l'équation 3.2. [d] Respectivement largeurs à mi-hauteur et au tiers de la hauteur des spectres d'émission de fluorescence de la Figure 5.13.

Pour toutes ces NPFs, quel que soit le type de couronne les spectres d'absorption sont parfaitement superposables et le maximum est situé à 529 nm (Figure 5.13). En revanche, les spectres d'émission de fluorescence, bien qu'ayant le même maximum (544 nm), ne sont pas identiques. En effet, les spectres d'émission de fluorescence des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA ou à couronne PAPEO sont superposables et sont identiques à celui du BDPMA dans le toluène, alors que pour les couronnes de type $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})$, ces bandes sont plus larges. La largeur à mi-hauteur ou au tiers de la hauteur de la bande d'émission de fluorescence est environ 30 % plus grande pour ce type de couronne que pour les autres (Tableau 5.14). Un élargissement de bande peut correspondre à une hétérogénéité de milieu plus marquée aux alentours des fluorophores [1]. Or, ces NPs sont moins hétérogènes en taille et en morphologie que celles à couronne PAPEO qui elles présentent une cavité (et pour lesquelles le BDPMA est toujours réparti en gradient dans les chaînes de P(S-*co*-BDPMA)). Donc ces observations sont contradictoires.

Les rendements quantiques sont très fortement différents d'un type de particule à l'autre, à concentrations molaires en BDPMA au cœur des NPFs comparables ([BDPMA]

en mol/L de styrène, Tableau 5.14). L'efficacité de fluorescence la plus forte est obtenue avec les couronnes PAPEO pures. Pour les couronnes de type P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$), l'efficacité semble meilleure lorsque la couronne est plus grande. Enfin, les NPFs les moins fluorescentes (de cette étude comparative) sont celles à couronne PEO-*b*-PAA. D'une manière générale, la tendance va tout de même vers un rendement quantique plus élevé lorsque la concentration en BDPMA est plus faible, pour un type de couronne donné. Ce phénomène a été évoqué dans le chapitre 3 pour les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et a été attribué à la formation d'agrégats peu ou pas fluorescents de BDPMA.

Les déclins des NPFs avec ces nouvelles couronnes ne peuvent pas être ajustés par une exponentielle étendue avec un exposant $\beta = 0{,}88$, contrairement aux couronnes de type PEO-*b*-PAA (chapitre 3). Seules les durées de vie moyennes sont donc comparées. Les durées de vie moyennes suivent la même tendance que les rendements quantiques de fluorescence (Tableau 5.14, Figure 5.13). La durée de vie moyenne la plus longue est observée avec la couronne PAPEO. La durée de vie moyenne des NPFs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$) est inférieure à celle observée dans le cas des NPFs à couronne PAPEO et est d'autant plus courte que la masse molaire de la couronne hydrophile est faible. Ces durées de vie moyennes sont néanmoins supérieures à celles observées pour les couronnes de type PEO-*b*-PAA, pour une même concentration en BDPMA.

Nous pensons qu'une des explications possibles à ce phénomène est la présence des BDPMA en surface du cœur des NPFs. Localisés ainsi, une modification de la nature de la couronne hydrophile pourrait alors modifier leur efficacité de fluorescence (Φ_F et τ_F).

Le groupement le plus hydrophile de la couronne des NPFs est la partie constituée d'acide acrylique. Dans le cas des NPFs ayant le plus faible rendement quantique de fluorescence (couronnes PEO-*b*-PAA), ce bloc est situé au plus près du cœur des NPFs. Les NPFs ayant le meilleur rendement quantique de fluorescence n'ont pas d'acides acryliques dans leur couronne. Enfin, les NPFs où l'acide acrylique est situé de manière aléatoire dans la couronne (P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)) ont un comportement intermédiaire. Pour ce type de couronne, le rendement quantique de fluorescence le meilleur est observé lorsque la masse molaire du bloc hydrophile est la plus grande. Il est donc possible qu'une augmentation locale de la polarité (due aux unités acides acryliques et à l'eau) avoisinant le BODIPY induise une baisse de l'efficacité de fluorescence. Cet effet a déjà été rapporté par Boens et coll. [337].

Par ailleurs, les couronnes à base de PAPEO ont une morphologie en brosse, les blocs hydrophiles des chaînes de copolymères sont certainement plus éloignées entre elles que les chaînes linéaires. Cet effet peut être perçu en comparant les nombres d'agrégation des NPFs à couronnes PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$ ou P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ (Tableau 5.13) : à taille de cœur hydrophobe identique, le premier type de NPFs a une densité de chaînes en surface du cœur supérieure au second type de NPFs. Ces chaînes hydrophiles plus rapprochées pourraient donc diminuer la distance entre BDPMA incorporés en tout début des blocs hydrophobes P(S-*co*-BDPMA) et ainsi favoriser la formation d'agrégats inter-chaînes.

Remarquons que pour ces NPFs, le rendement quantique de fluorescence a été de nouveau déterminé six mois après leur synthèse et qu'il n'a pas évolué (NPFs stockées à 4°C dans le noir), ce qui est intéressant en terme d'utilisation et de stockage de ces objets.

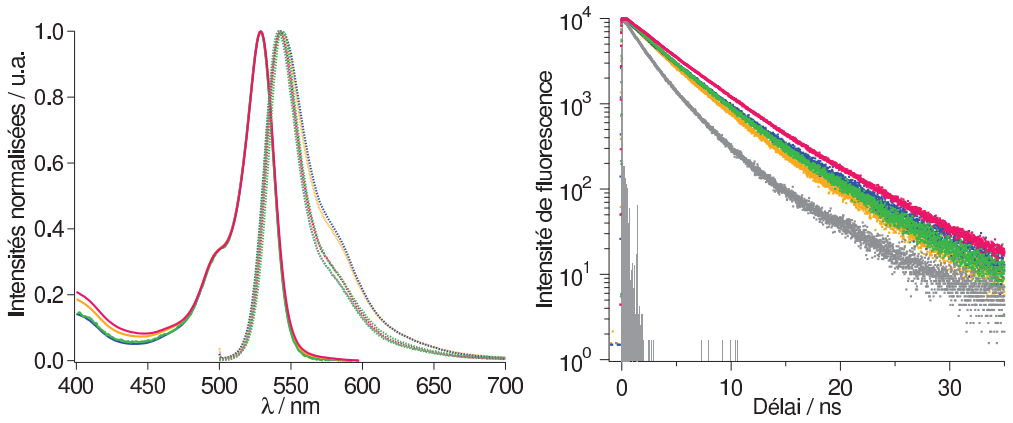


FIGURE 5.13 – Spectres des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA (1,1 BDPMA / chaîne -, 2,1 BDPMA / chaîne -), P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{12}$ (-), P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ (-), $PAPEO_{11}$ (-) enregistrés dans l'eau. Gauche : spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (···, $\boldsymbol{\lambda_{exc}}$ = 495 nm). Droite : déclins de fluorescence ($\boldsymbol{\lambda_{exc}}$ = 495 nm, $\boldsymbol{\lambda_F}$ = 543 nm) et impulsion laser.

Contre toute attente, la nature de la couronne hydrophile a donc un effet sur les propriétés spectroscopiques des NPFs.

5.6.2 Photoblanchiment des NPFs

La photostabilité des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA ou à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ a été mesurée. Ce paramètre est primordial lors de l'étude de NPFs sous microscope optique en milieux biologiques par exemple. En effet, si les NPFs photoblanchissent durant le temps d'analyse des organismes, il ne sera alors pas envisageable de les utiliser comme traceurs fluorescents.

Pour un ensemble de molécules ayant toutes la même cinétique de photodégradation, celle-ci s'écrit sous la forme :

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau_D} \tag{5.3}$$

où :

$N(t)$	nombre de molécules fluorescentes à l'instant t
N_0	nombre de molécules fluorescentes à l'instant initial
τ_D	constante de temps de photoblanchiment

Le photoblanchiment de NPFs à couronne PEO-*b*-PAA (CG174B) ou P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ (CG171C), ayant sensiblement la même concentration en BDPMA à cœur ([BDPMA] ≈ 0,1 mol/L_S), a été étudié (FIGURE 5.14). Les mesures sont réalisées en déposant 50 μL d'une solution de NPFs diluées environ mille fois entre deux lamelles de

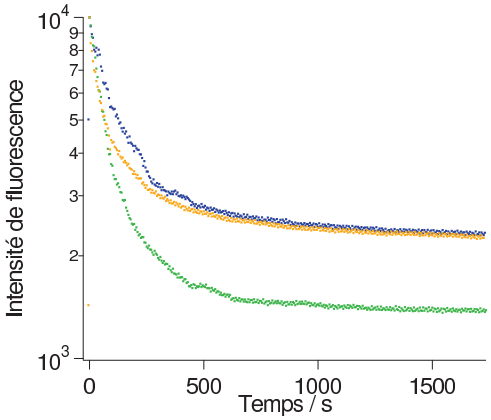


FIGURE 5.14 – Étude du photoblanchiment de NPFs à cœur BDPMA ([BDPMA] $\approx$ 0,1 mol/L$_S$) et à couronne PEO-*b*-PAA (• • •) ou P(AA$_{0,5}$-*co*-APEO$_{0,5}$)$_{22}$ mesurées à trois jours d'intervalle (J : • • •, J +3 : • • •). Mesures réalisées sur une surface d'analyse de 3,25 $\times$ 10^{-9} m^2 avec une puissance laser de 3,1 mW (λ_{exc} = 515 nm, 10 MHz, 400 fs).

microscope en verre. Une fois séché, l'échantillon est irradié avec un laser (λ_{exc} = 515 nm) d'une puissance de 3,1 mW (10 MHz, 400 fs).

Pour un même échantillon de NPFs, nous nous sommes aperçus que les NPFs étudiées une à une n'avaient pas la même cinétique de photodégradation. De plus, un même échantillon analysé à trois jours d'intervalle ne présente pas exactement le même déclin de photoblanchiment (FIGURE 5.14). Nous avons donc préféré étudier un ensemble de NPFs afin d'avoir une constante de photoblanchiment la plus représentative de l'échantillon. Les déclins de photodestruction sont complexes, multiexponentiels. Ils peuvent être ajustés par une fonction biexponentielle décroissante mais nous avons préféré calculer des constantes de photodégradation moyennes, comme dans le cas des déclins de fluorescence multiexponentiels. Ces constantes de photodégradation moyennse ($\overline{\tau_D}$) ont été calculées à l'aide de l'équation 3.2 et les valeurs sont résumées dans le TABLEAU 5.15. Bien que les déclins paraissent différents pour les différentes NPFs et à différents jours, les valeurs des constantes de temps moyennes sont du même ordre de grandeur (entre 680 et 750 s).

Le rendement de photodégradation peut s'exprimer sous la forme :

$$\Phi_D = \frac{hcN_AS_0}{\tau_D W_0 \lambda \varepsilon ln10} \tag{5.4}$$

où :

Φ_D	rendement de photodégradation
τ_D	constante de temps de photoblanchiment (s)
h	constante de Planck (W.s^2)
c	célérité de la lumière (m.s^{-1})
N_A	nombre d'Avogadro (mol^{-1})

S_0	section éclairée (m^2)
W_0	puissance du laser (W)
λ	longueur d'onde de la lumière envoyée sur l'échantillon (m)
ε	coefficient d'extinction molaire de la molécule analysé à la longueur d'onde λ ($m^2.mol^{-1}$)

Les valeurs des rendements de photodégradation sont résumées dans le Tableau 5.15. Tous ces rendements sont du même ordre de grandeur, entre 3,39 et 3,73 $\times$ 10^{-7}. Les rendements de photodestruction de BODIPY isolés sont de l'ordre de 3 $\times$ 10^{-5} [338]. Le BDPMA copolymérisé avec du styrène présente donc un rendement de photodégradation environ 100 fois inférieur à celui d'un fluorophore libre, et ce quelle que soit la couronne hydrophile de NPFs. Wittmerhaus et coll. ont étudié la photostabilité de BODIPY commerciaux dispersés dans des latex de PS de 40 nm de diamètre [339]. Les constantes de temps de photoblanchiment déterminées sont environ deux fois supérieures à celles des fluorophores isolés. Il semble donc que les BDPMA copolymérisés au styrène présentent une meilleure photostabilité que des BODIPY dispersés dans une matrice.

Tableau 5.15 – Résultats expérimentaux des mesures de photodégradation pour deux types de NPFs réalisées sur une surface d'analyse de 3,25 $\times$ 10^{-9} m^2 avec une puissance laser de 3,1 mW (λ_{exc} = 515 nm).

Exp	couronne	$\overline{\tau_D}$ / s	Φ_D / $\times$ 10^{-7}
CG174B	PEO-*b*-PAA_{15}	722	3,52
CG171C - J	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	751	3,39
CG171C - J+3	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	681	3,73

Les NPFs à base de BDPMA ont donc des rendements de photoblanchiment faibles, quelle que soit la nature de la couronne hydrophile des NPFs.

Par ailleurs, la brillance des NPFs à couronnes $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ est de 7 $\times$ 10^7 $cm^{-1}.mol^{-1}.L$, ce qui est du même ordre de grandeur que les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA (B = 8 $\times$ 10^7 $cm^{-1}.mol^{-1}.L$).

Cela en fait donc des objets intéressants pour l'imagerie de fluorescence.

5.7 Tests préliminaires d'incubation de cellules eucaryotes avec les NPFs à différentes couronnes

Nous avons voulu tester l'interaction des NPFs ayant différentes couronnes hydrophiles avec des cellules eucaryotes. Pour cela, des cellules cancéreuses adhérentes de la lignée HeLa ont été incubées avec différentes NPFs (*cf.* §7.2.5 pour plus de détails). Des NPFs à une concentration allant de $8\mu g/mL_{PBS}$ à $200\mu g/mL_{PBS}$ ont été mises en contact avec des cellules déposées dans des puits et lavées de leur milieu de culture. Les cellules incubées sont placées 30 minutes à 37°C (100 % humidité, 5 % CO_2) puis rincées deux fois avec du PBS et analysées sous microscope optique à fluorescence. Une expérience préliminaire a montré que la concentration en NPFs optimale pour observer les cellules marquées est de 67 $\mu g/mL_{PBS}$.

Les clichés de fluorescence (images en intensité) des cellules HeLa incubées avec les différentes NPFs sont présentés FIGURE 5.15. Dans tous les cas, la fluorescence des NPFs est observée. Il semble que, quelle que soit la nature de la couronne hydrophile, il y ait une interaction des NPFs avec les cellules. Il est difficile de conclure si les NPFs ont été incorporées dans les cellules (par des mécanismes d'endocytose) ou si elles sont seulement adsorbées à la surface des cellules. Néanmoins, la présence de zones sombres au cœur des cellules laisse penser qu'une partie des NPFs sont internalisées, laissant alors apparaître le noyau, car les NPFs ne peuvent pas y pénétrer. Quoi qu'il en soit, il n'est pas possible de discriminer si un type de couronne permet une meilleure pénétration ou adsorption sur les cellules avec des tels clichés. Des expériences menées en utilisant différents temps d'incubation des NPFs pourraient permettre de compléter cette étude.

De plus, des expériences de toxicité des NPFs avec ces différentes couronnes hydrophiles seraient également intéressantes.

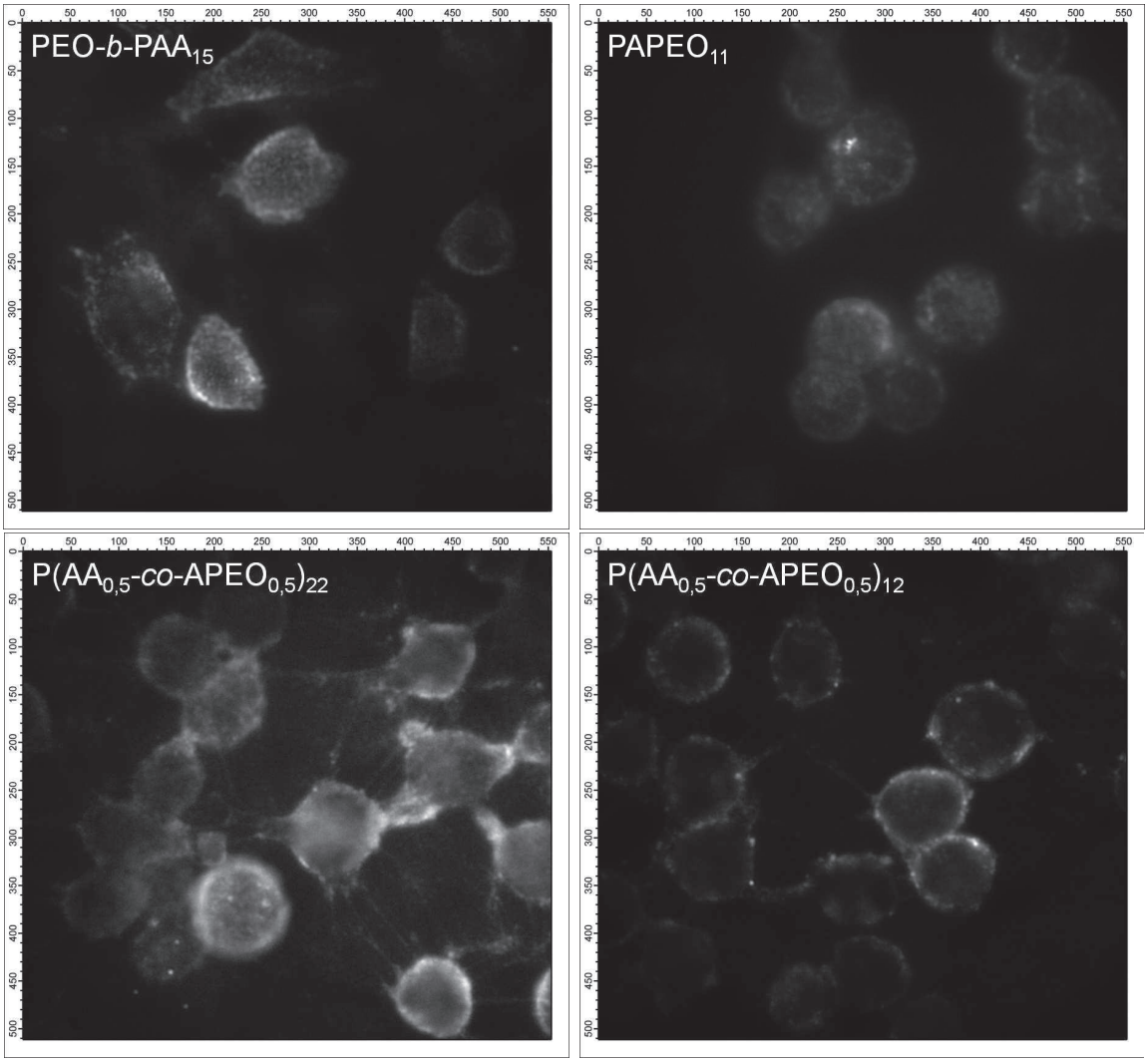


FIGURE 5.15 – Clichés de fluorescence de cellules HeLa incubées en présence de NPFs ([NPFs] = 67 μg/mL$_{\text{PBS}}$, λ_{exc} = 488 nm, λ_F = 508-675 nm) ayant différentes couronnes hydrophiles, puis rincées par du PBS. De gauche à droite et de haut en bas, couronnes : PEO-*b*-PAA$_{15}$, PAPEO$_{11}$, P(AA$_{0,5}$-*co*-APEO$_{0,5}$)$_{22}$, P(AA$_{0,5}$-*co*-APEO$_{0,5}$)$_{12}$. Échelle (les nombres indiqués en abscisses et en ordonnées correspondent à des pixels) : 100 pixels = 21,5 μm.

5.8 Conclusion

À travers ce chapitre nous avons vu la synthèse de NPFs à cœur BDPMA copolymérisé au styrène présentant différents types de couronnes hydrophiles à base d'acide acrylique et d'acrylate de PEO, de type $PAPEO_{11}$ ou $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{12\ ou\ 22}$. Des NPFs d'un diamètre nanométrique ont pu être obtenues par le procédé "one-pot". Le contrôle de la polymérisation est assuré pour toutes ces synthèses de NPFs.

La synthèse de ces NPs à couronnes à base d'acide acrylique et d'acrylate de PEO et à cœur PS, fluorescentes ou non, par un procédé de polymérisation radicalaire contrôlée en miniémulsion n'avait, à notre connaissance, jamais été réalisée. Il s'agit donc d'objets originaux.

Les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA précipitent fortement en milieu acide, contrairement aux NPFs à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})$ ou PAPEO. Ce phénomène est réversible lorsque les NPFs sont redispersées à des pH > 6. Le potentiel ζ des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ a pu être déterminé. Il est globalement négatif pour des pH allant de 4 à 8. Enfin, le nombre d'agrégation de ces deux types de couronne a pu être déterminé à l'aide des clichés de microscopie électronique à transmission et par diffusion statique de la lumière, donnant des résultats similaires.

Les caractéristiques spectroscopiques de ces NPFs ont été étudiées. Étonnamment, le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence semblent dépendants de la nature de la couronne hydrophile. Ce phénomène a été attribué d'une part à la polarité des unités monomères de la couronne hydrophile les plus proches du cœur des NPFs (et donc des BDPMA), et d'autre part à la densité des chaînes à la surface du cœur des NPFs. Les particules à couronnes à base d'acide acrylique et d'oxyde d'éthylène (PEO-*b*-PAA et $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$) présentent des rendements de photodégradation faibles, ce qui est intéressant pour des applications en imagerie de fluorescence.

Les NPFs ayant différentes couronnes hydrophiles ont enfin été analysées en présence de cellules de type HeLa. Il existe une interaction entre les cellules et les NPFs quelque soit leur couronne mais il est difficile de conclure à une internalisation des NPFs ou à une simple adsorption.

À des fins d'utilisation de ces NPFs en senseurs ou en biologie, il peut être intéressant d'en fonctionnaliser la surface. Le chapitre suivant présentera la mise au point des conditions de greffage de la surface des particules à différentes couronnes par une chimie de couplage peptidique.

Chapitre 6 : Fonctionnalisation de la surface des NPFs

Dans les chapitres précédents, nous avons vu qu'il était possible de synthétiser des NPFs ayant des propriétés spectroscopiques intéressantes et que la nature de la couronne hydrophile de ces NPFs pouvait être changée.

Afin de réaliser la synthèse de nanosenseurs fluorescents ou de marqueurs pour l'imagerie biologique, il paraît intéressant de fonctionnaliser la surface des NPFs. Cela est rendu possible par la présence des acides carboxyliques sur la couronne, pouvant réagir avec des molécules à fonction amine par couplage peptidique.

Ainsi, divers types de greffages ont été réalisés. Dans un premier temps, des molécules simples ont été greffées sur la surface des NPs afin de démontrer la faisabilité du couplage et de le caractériser facilement. Ensuite, divers types de molécules halochromes[1] ont été attachées à la couronne des NPFs afin de réaliser des nanosenseurs de pH. Enfin, la biotine, une molécule d'intérêt biologique, et des protéines ont été introduites à la surface des NPs.

6.1 Fonctionnalisation par de petites molécules hydrophiles à fonction amine

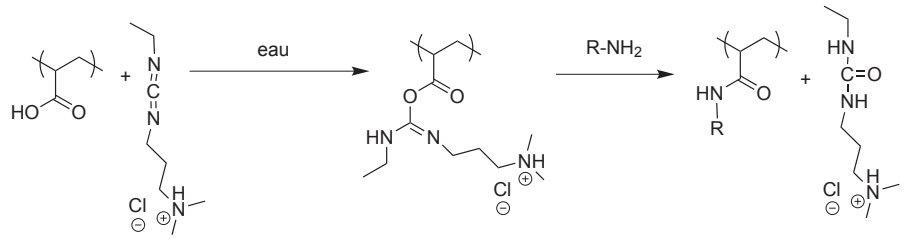
6.1.1 Conditions expérimentales

Une chimie de couplage classique consiste à faire réagir un acide carboxylique avec une amine primaire ou secondaire afin d'obtenir une amide. Malheureusement, la réaction entre un acide carboxylique et une amine primaire n'est pas cinétiquement favorable. Afin d'activer la vitesse de réaction, des molécules de type carbodiimide sont généralement utilisées afin de transformer l'acide carboxylique en ester activé (exemple Schème 6.1 avec l'EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide). L'amine vient alors réagir sur l'ester activé et une fonction amide est créée. Ces réactions peuvent être menées dans l'eau. Dans ce cas-là, pour que l'ester activé soit stable, il est recommandé de réaliser la réaction dans l'eau légèrement acide (pH 4-6), la plupart du temps à température ambiante. L'ester activé à partir des carbodiimides pouvant facilement s'hydrolyser dans l'eau, le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ou sa forme sulfonée (sulfo-NHS) ou encore l'hydroxyben-

1. molécule changeant de couleur en fonction du pH.

zotriazole (HOBt) sont souvent employés en complément car l'ester activé formé est plus stable [340, 341]. Les réactions sont alors généralement menées dans l'eau à température ambiante dans des milieux tamponnés entre 6 et 7,5.

Les exemples de greffage du PAA par des molécules à fonction amine sont nombreux et les conditions de greffage extrêmement variées. On peut noter par exemple que l'équipe de Wooley et coll. réticule des NPs à cœur PS et à couronne PAA en greffant de petites molécules à fonction diamine dans l'eau, en présence d'EDC ($n_{EDC} = n_{AA}$) [342]. Hoven et coll. ont, quant à eux, greffé une biotine à fonction amine ou une protéine sur des surfaces présentant des brosses de PAA en utilisant l'EDC et le NHS à pH 4,5 [343].



Schème 6.1 – Couplage peptidique entre un poly(acide acrylique) et une molécule à fonction amine, activé par l'EDC.

En nous basant sur ces résultats, nous avons mené des premières expériences de couplage sur des NPs à cœur PS et à couronne PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$ en présence d'EDC et NHS ($n_{EDC} = n_{NHS} = n_{AA} \times 4$) à pH 7 et à température ambiante. Malheureusement, les NPs précipitent lors de l'activation de l'ester. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque le HOBt est utilisé à la place du NHS.

Michielsen et coll. se sont intéressés au greffage de PAA sur du nylon 6,6 [344]. Ils ont montré qu'il n'y a pas d'amélioration du couplage si du NHS est utilisé en complément de l'EDC. De plus, le couplage est plus efficace si $n_{EDC} > n_{AA} \times 2$ certainement à cause d'une hydrolyse partielle de l'ester activé. Enfin, ils conseillent de mener les greffages à faible température (vers 0°C) afin, encore une fois, d'éviter l'hydrolyse de l'ester activé.

En se basant sur ces résultats, le NHS a alors été éliminé de la formulation des greffages. Cette fois-ci, l'hydrolyse de l'ester activé est très rapide si le pH est supérieur à 7. Or, rappelons que les particules de type PEO-*b*-PAA précipitent à des pH < 6. De plus, l'amine est plus réactive si celle-ci n'est pas sous sa forme protonée. Il faudrait donc travailler à des pH supérieurs à 8 pour optimiser la réaction de l'amine ($pK_a \approx$ 8-9) sur l'ester activé. Ces conditions de pH sont donc incompatibles.

Nous avons donc choisi de travailler à des pH compris entre 8 et 9 et à 4°C et en utilisant $n_{EDC} = n_{AA} \times 4$ afin d'optimiser les conditions expérimentales tout en diminuant les risques d'hydrolyse de l'ester activé. Ces conditions sont résumées sur la Figure 6.1 et seront les mêmes quelle que soit la nature du cœur ou de la couronne des NPs. La quantité d'amine varie, quant à elle, de 0,1 à 1 équivalent selon la nature de la molécule greffée et

la quantité à introduire dans la couronne désirée. Dans tous les couplages, l'amine et les NPs sont mélangées et placées à 4°C, puis une solution d'EDC dans l'eau est ajoutée. Les réactions sont poursuivies durant 12h. Enfin les NPs sont purifiées par dialyse pendant une semaine sur des membranes de pores 12-14 kDa pour les petites molécules organiques et 300 kDa pour les protéines.

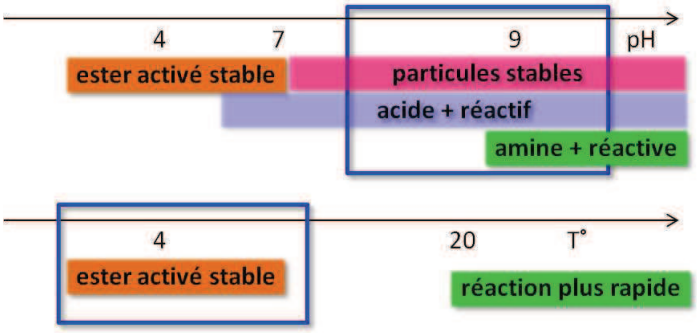


FIGURE 6.1 – Conditions de pH et de T optimisées pour un couplage peptidique entre les NPFs et une amine, activé par l'EDC.

6.1.2 Caractérisation des greffages

Une méthode classique pour caractériser la formation d'une liaison peptidique est d'utiliser la spectroscopie infra-rouge. Malheureusement, les NPs ont une structure complexe contenant entre 3 et 4 monomères différents et de nombreuses bandes vibrationnelles sont visibles sur le spectre avant greffage. De plus, le greffage, même s'il était 100 % efficace, ne concernerait en moyenne que dix unités acides sur les (environ) 200 unités oxydes d'éthylène et styrènes du copolymère. La bande caractéristique de l'amide n'est donc pas observable.

De même, une étude des NPs polymères par RMN du ^{1}H dans le D_2O ne permet pas de discriminer les protons apportés par la molécule greffée parmi tous les protons déjà présents dans le copolymère.

Enfin, le test de Kaiser [345], un test colorimétrique à la ninhydrine permettant de quantifier le nombre d'amines, a été réalisé. Il s'agit de mettre en présence l'amine et la ninhydrine, du phénol, de la pyridine et du cyanure de potassium, le tout dans l'éthanol. Après 10 min. de chauffage à 50°C, un complexe caractéristique ninhydrine/amine de couleur bleue se forme. En ayant au préalable établi une courbe d'étalonnage pour un couple ninhydrine/amine, il est alors possible de quantifier l'amine présente dans le milieu (*i.e.* la quantité d'amine n'ayant pas réagi). Malheureusement, les NPs à cœur PS précipitent dans l'éthanol. Le test ne peut être réalisé ni dans l'eau ni dans des mélanges eau/éthanol (jusqu'à 40/60) car le complexe ninhdrine/amine n'est pas stable. Les solvants THF, dioxane, acétone, ne permettent pas la formation du complexe caractéristique

de couleur bleue (solutions de couleur jaune à marron). Le toluène et l'acétate d'éthyle ne sont pas miscibles à l'eau et le test ne peut donc être réalisé. La caractérisation des greffages par le test de Kaiser a donc été abandonnée, faute de solvant adéquat.

Deux autres méthodes permettant de mettre en évidence des modifications chimiques sont la microanalyse élémentaire et les mesures de potentiel ζ. Ces méthodes ont pu être appliquées avec succès sur nos systèmes. La première permet de quantifier l'efficacité du greffage, alors que la seconde permet de mettre en évidence la modification de la charge de surface.

Microanalyse élémentaire

La microanalyse élémentaire est une méthode de choix pour quantifier la présence d'un élément vis-à-vis d'un autre. Le greffage que nous avons cherché à quantifier est celui de l'éthanolamine ($EtOHNH_2$) sur des NPs à cœur PS et à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ ou PEO-*b*-PAA_{15}. L'intérêt de l'éthanolamine pour quantifier ce greffage est que, avant ou après greffage, la quantité d'oxygène n'est pas modifiée dans la chaîne du copolymère (l'oxygène de l'éthanolamine remplace celui perdu sur l'acide carboxylique), alors qu'un azote est incorporé par molécule (amené par l'éthanolamine). En dosant le pourcentage massique d'azote par rapport à celui de l'oxygène, il est alors possible de quantifier le greffage.

Les contraintes de cette méthode d'analyse sont qu'elle nécessite que les NPs greffées soient parfaitement propres avant l'analyse et que celles-ci se présentent sous forme de poudre. Pour cela, les NPs ont été lyophilisées durant 24h après dialyse. De plus, environ 5 mg doivent être fournis par élément à doser ce qui nécessite de réaliser les greffages sur au moins 15 mg de polymère.

Les résultats d'analyse des NPs à différentes couronnes hydrophiles greffées par l'éthanolamine ($n_{EtOHNH_2} = n_{AA} \times 3$) dans les conditions du §6.1.1 sont résumés dans le Tableau 6.1. Pour chaque élément dosé, deux mesures ont été réalisées.

Tableau 6.1 – Résultats des dosages de l'azote et l'oxygène par microanalyse élémentaire pour le greffage de l'éthanolamine sur les NPs à différentes couronnes hydrophiles.

Exp	couronne	$[\%\ N]/[\%\ O]^a_{100\%}$	$[\%\ N]/[\%\ O]^b_{exp}$	taux de greffage / %
G70	$P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$	0,074	0,041 ($\pm$ 0,02)	56 ($\pm$ 3)
G71	PEO-*b*-PAA_{15}	0,170	0,105 ($\pm$ 0,03)	62 ($\pm$ 4)

[a] Rapport des pourcentages massiques en azote et en oxygène si le greffage est de 100 %. [b] Moyenne sur deux mesures des rapports des pourcentages massiques en azote et en oxygène mesurés expérimentalement par microanalyse élémentaire (et écart aux mesures).

Pour les couronnes de type $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$, le taux de greffage est de 56 %

et pour les couronnes de type PEO-*b*-PAA_{15}, il est de 62 %. Sachant que les résultats sont donnés à 5-6 % (sur la valeur), l'efficacité de greffage ne présente pas de différence significative pour les deux types de NPs.

Il est donc possible de greffer des molécules à fonction amine sur la couronne des NPs constituée d'acides carboxyliques, avec un taux de greffage d'environ 60 % pour l'éthanolamine, quelle qu'en soit leur nature. La couronne des NPs est alors constituée d'un copolymère d'acide acrylique, de *N*-(2-hydroxyéthyl)acrylamide (AEtOH) et de poly(oxyde d'éthylène).

Potentiel ζ

Comme cela a déjà été évoqué dans le chapitre précédent, la mesure de potentiel ζ est une méthode de choix pour caractériser la charge apparente de dispersions colloïdales.

L'expérience précédente des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} greffées par l'éthanolamine a été caractérisée par des mesures de potentiel ζ à différents pH (Tableau 6.2). Contrairement aux couronnes "nues", les couronnes greffées ne précipitent pas en milieu acide (et présentent le même diamètre hydrodynamique qu'avant greffage). Il est donc possible de les analyser à des pH < 5. Pour ce type de couronne greffée, nous n'observons pas d'évolution du potentiel ζ avec le pH.

Tableau 6.2 – Potentiels ζ (mV) mesurés dans l'eau à une concentration en NaCl de 14 mM, à 25°C, pour différents types de particules et à différents pH (tampons phosphate/citrate 1mM).

Exp	couronne	molécule(s) greffée(s)	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
	PEO-*b*-PAA_{19}				-16	-17	-17
	PEO-*b*-PAA_{15}			-20	-17	-14	-16
	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$		-12		-26	-28	-24
G46	PEO-*b*-PAA_{15}	$EtOHNH_2$	-16		-14	-12	-15
G63	PEO-*b*-PAA_{19}	$Et(NH_2)_2$	+5	-2	-11	-15	-14
G64	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	$Et(NH_2)_2$	+10	+2	-15		-16
G65	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	$PEO_3(NH_2)_2$	-9		-11		-14

Afin d'observer une variation du potentiel ζ avec le pH, nous avons greffé des molécules à fonction diamine sur les particules. Ainsi, pour des pH inférieurs à leur pK_a (environ 8-9), ces molécules devraient être chargées positivement. De l'éthylène diamine ($Et(NH_2)_2$) et de la 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine ($PEO_3(NH_2)_2$) ont été greffées sur des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} et $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Si l'on estime que le taux de greffage est similaire à celui de l'éthanolamine sur le même type de NPs, les particules devraient alors avoir une charge globale soit positive, soit neutre, soit négative selon le pH.

Les NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ ou PEO-*b*-PAA_{19} greffées Et(NH_2)$_2$ sont négatives pour des pH allant de 6 à 8, presque neutres à pH 5 et positives à pH 4. Des études par MET montrent par ailleurs que les NPs après greffage ont le même diamètre et ne semblent pas réticulées entre elles (*cf.* FIGURE 6.21, FIGURE 6.22).

Le greffage d'éthylènediamine est donc possible sur les NPs à couronne PEO-*b*-PAA et P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$. Dans les conditions employées, aucune réticulation n'est observée. De plus, les NPs obtenues présentent un caractère amphotère et sont stables quel que soit le pH utilisé. Cela peut être intéressant en terme d'applications en biologie afin de moduler l'interaction des NPs avec la surface de bactéries ou de cellules (qui sont globalement chargées négativement).

Enfin, une molécule à fonction diamine mais présentant un petit groupement PEO de 3 unités ($PEO_3(NH_2)_2$) a été greffée sur les NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$. Étonnamment, la charge est négative quel que soit la valeur du pH. Le potentiel ζ est néanmoins moins négatif dans les milieux basiques pour les NPs greffées que pour les NPs originelles. Cela pourrait éventuellement venir d'une réticulation inter-chaînes au sein de la couronne des NPs, ce qui rejoindrait le travail de Wooley et coll. [342], ou d'une moins bonne réactivité de cette molécule qui présente un plus grand encombrement stérique que les molécules précédentes [2]. De plus, rappelons que les NPs couvertes de PEO présentent un potentiel ζ négatif, il n'est donc pas improbable que, malgré la fonction amine introduite, le potentiel ζ des NPs reste négatif.

6.1.3 Incubation de cellules eucaryotes avec des NPFs fonctionnalisées

Caractérisation des NPFs utilisées en présence des cellules

Les NPFs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne à base d'oxyde d'éthylène et d'acide acrylique sont chargées négativement pour des pH supérieurs à 6. Il est possible de greffer environ 60 % d'éthanolamine sur les fonctions acide des couronnes hydrophiles des NPFs. Ainsi, les NPFs sont toujours globalement chargées négativement mais leur charge est diminuée.

Les NPs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ ou PEO-*b*-PAA_{15} greffées éthanolamine ont été caractérisées par des mesures de spectroscopie de fluorescence et de photoblanchiment (TABLEAU 6.3).

Pour les deux types de couronnes, les NPFs après greffage présentent un rendement quantique de fluorescence inférieur à celui des NPFs avant greffage. Afin d'essayer de comprendre ce phénomène, les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} ont été dialysées ou ont été mises en présence de EDC puis dialysées. Dans le premier cas, le rendement quantique de fluorescence est de 31 %, et dans le second cas de 24 %. Il y a donc, d'une part,

2. Pour ce greffage, il n'a pas été possible de réaliser un dosage des fonctions greffées par microanalyse élémentaire par manque de matière.

TABLEAU 6.3 – Caractéristiques spectroscopiques des NPFs à différentes couronnes hydrophiles et cœur P(S-*co*-BDPMA) avant et après greffage par l'éthanolamine.

couronne	λ_{abs}	λ_F	Φ_F	Φ_D
	nm	nm		$\times 10^{-7}$
PEO-*b*-PAA_{15}	529	544	0,39	3,52
PEO-*b*-$P(AA_{0,4}$-*co*-$AEtOH_{0,6})_{15}$	529	544	0,26	4,11
$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	529	544	0,52	3,56
$P(AA_{0,2}$-*co*-$AEtOH_{0,3}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	529	544	0,46	-

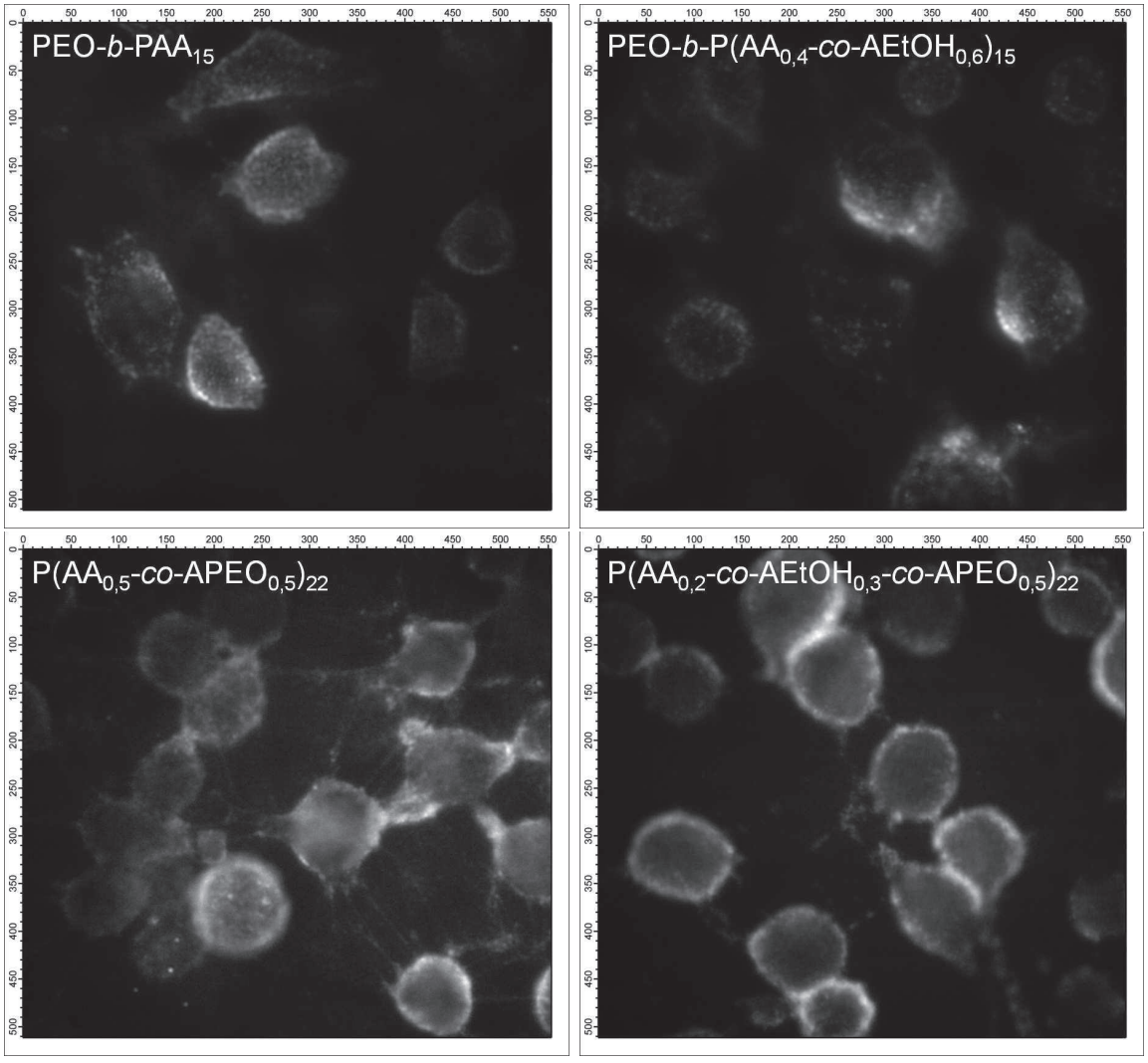


FIGURE 6.2 – Clichés de fluorescence de cellules HeLa incubées en présence de NPFs ([NPFs] = 67 $\mu g/mL_{PBS}$, λ_{exc} = 488 nm) ayant différentes couronnes hydrophiles, puis rincées par du PBS. De gauche à droite et de haut en bas, couronnes : PEO-*b*-PAA_{15}, PEO-*b*-$P(AA_{0,4}$-*co*-$AEtOH_{0,6})_{15}$, $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$, $P(AA_{0,2}$-*co*-$AEtOH_{0,3}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Échelle : 100 pixels = 21,5 μm.

un effet de la dialyse sur le rendement quantique de fluorescence des NPFs, et d'autre part, un effet de l'EDC. Il pourrait éventuellement s'agir d'une réorganisation des chaînes hydrophiles. En effet, les BDPMA étant localisés principalement à la surface du cœur des NPFs, une modification de l'organisation des chaînes pourrait éventuellement avoir tendance à les rapprocher et ainsi à diminuer le rendement quantique de fluorescence. L'influence de la nature de la couronne hydrophile sur le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence a déjà été notée dans le chapitre précédent.

En ce qui concerne le rendement de photodégradation, il est du même ordre de grandeur avant et après greffage.

Incubation des cellules avec des NPFs greffées éthanolamine

Des cellules HeLa ont été incubées en présence de ces NPFs greffées présentant moins de charges négatives que leurs précurseurs (FIGURE 6.2). Les cellules présentant une charge globalement négative, il est couramment admis qu'elles internalisent plus facilement les NPFs chargées positivement. Tout comme dans le cas précédent de cellules incubées en présence de NPFs ayant différentes couronnes (FIGURE 5.15), il est difficile d'évaluer si les NPFs sont à la surface ou à l'intérieur des cellules. Elles sont *a priori* dans l'espace membranaire de la cellule. Il ne semble pas y avoir de différence entre les NPFs avant ou après greffage.

Il aurait été intéressant de tester l'incubation de cellules HeLa avec les NPFs fonctionnalisées par l'éthylènediamine, chargées positivement pour des pH $\leqslant 5$, mais cela n'a pas pu être effectué par manque de temps.

6.1.4 Conclusion

Il est possible de greffer des petites molécules hydrophiles à fonction amine (telles que l'éthanolamine ou l'éthylènediamine) à la surface des NPFs. Le greffage a pu être quantifié par microanalyse élémentaire et le potentiel ζ des NPFs a pu être mesuré.

Les NPFs greffées par l'éthanolamine voient leur rendement quantique de fluorescence chuter par rapport aux particules avant greffage. Ce phénomène n'a pas pu être expliqué mais pourrait être dû à une réorganisation des chaînes de la couronne hydrophile des NPFs.

Enfin, des cellules cancéreuses ont été incubées en présence de ces NPFs. L'imagerie de fluorescence ne montre pas de différence notable de comportement avant et après greffage.

6.2 Fonctionnalisation par des molécules sensibles au pH

La surface des NPFs peut être modifiée par couplage peptidique entre les acides carboxyliques portés par le PAA et une molécule à fonction amine. En greffant des molécules halochromiques, il est possible de réaliser des nano-senseurs de pH. La plupart du temps ces modulations sont dues à l'existence d'une espèce acide (A) et d'une espèce basique (B) ayant une signature spectroscopique différente. Ces molécules greffées peuvent être regroupées en deux familles :

- les molécules qui ne fluorescent pas (ou très peu, $\Phi_F < 0{,}1$ %) mais dont les spectres d'absorption des formes A et B sont différents ;
- les molécules fluorescentes dont l'intensité de fluorescence est modulée avec le pH.

Dans le premier cas, si la molécule greffée présente sous sa forme acide ou basique un recouvrement spectral avec, par exemple, le BDPMA et qu'elle est spatialement proche de celui-ci, il sera possible d'avoir une modulation de l'inhibition de fluorescence par transfert d'énergie de type FRET en fonction du pH.

Dans le second cas, en mesurant à un pH donné l'émission de fluorescence d'une sonde par rapport à l'autre, il doit être possible de réaliser un senseur de pH ratiométrique. Ce type de senseur prend tout son intérêt pour mesurer notamment le pH intra-cellulaire ou dans tout milieu biologique dans lequel les sondes pH classiques ne sont pas adaptées. Ainsi, en ayant au préalable réalisé une droite d'étalonnage, il doit être possible de déterminer le pH des milieux biologiques en s'affranchissant des problèmes d'appareillage (filtres, ϵ des milieux analysés...) ou d'effets de concentrations.

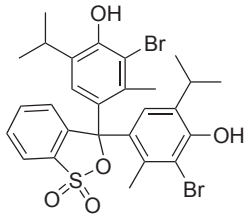
Le pK_a des indicateurs de pH est généralement choisi autour de 6-7 avec une zone de transition vers 5-8 afin d'être au mieux adapté aux milieux biologiques. Des pK_a plus acides (vers 3-4) peuvent néanmoins être intéressants pour sonder des milieux particulièrement acides tels que les biofilms développés sur la plaque dentaire.

6.2.1 Greffage du Neutral Red

Le Bleu de Bromothymol (BBT, Schème 6.2) et le Neutral Red (NR, Schème 6.3) ont été retenus comme molécules halochromiques adaptées pour nos systèmes. En effet, le BBT présente un pK_a de 7,10 [346], est jaune ($\lambda_{abs} = 432$ nm) pour des pH inférieurs à 6 et bleu ($\lambda_{abs} = 617$ nm) pour des pH supérieurs à 7,6. En milieu acide le spectre d'absorption du BBT est donc décorrélé du spectre d'émission de fluorescence du BDPMA ($\lambda_F = 544$ nm), alors qu'en milieu basique il y a recouvrement spectral entre le spectre d'absorption du BBT et le spectre d'émission du BDPMA. En milieu acide, la fluorescence du BDPMA devrait donc pouvoir être observée alors qu'en milieu basique elle devrait être inhibée.

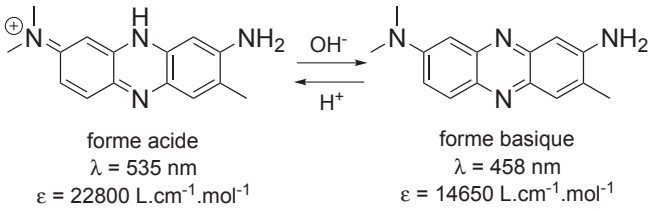
Cependant, le BBT ne porte pas de fonction amine, il faut donc au préalable le modifier afin de pouvoir le greffer sur les NPFs. Les positions hydroxyles ne peuvent pas

être utilisées car cela changerait les propriétés de sensibilité au pH de la molécule. Une substitution en position ortho des noyaux aromatiques bromés n'est pas non plus possible, à cause de l'encombrement stérique engendré [347, 348]. Il faudrait donc synthétiser une molécule équivalente au BBT en ayant au préalable modifié le noyau aromatique sulfoné, ce que nous n'avons pas envisagé de faire.



Schème 6.2 – Bleu de Bromothymol sous sa forme acide.

Le Neutral Red est une molécule sensible au pH dont les propriétés sont intéressantes pour sonder les milieux biologiques, car sa zone de transition de pH se situe entre 5,5 et 8 et son pK_a est de 6,8 [349]. Cette molécule apparaît rouge sous sa forme acide (λ_{abs} = 535 nm) et jaune sous sa forme basique (λ_{abs} = 458 nm), avec un point isobestique à 479 nm. Cette sonde est également connue pour ses propriétés d'oxydo-réduction [350].



Schème 6.3 – Formes acide et basique du Neutral Red.

Le Neutral Red possède ainsi un spectre d'absorption sous sa forme acide qui recouvre le spectre d'émission de fluorescence du BDPMA, alors que sous sa forme basique les deux spectres sont décorrélés (Figure 6.3). Pour des NPFs à cœur BDPMA (3 BDPMA/chaîne, Φ_D = 0,20), le rayon de Förster a été estimé à 4,2 nm pour la forme acide et à 2,8 nm pour la forme basique du NR. Pour des molécules dont la distance est égale au rayon de Förster, le transfert d'énergie est efficace à 50 %. Au-delà, il décroit très rapidement en d^{-6} (où d est la distance entre les molécules).

La longueur du bloc PAA des couronnes de type PEO-*b*-PAA_{10} peut être estimée dans l'eau à l'aide de l'équation 3.15. Pour le PAA dans l'eau, $C_\infty \approx 11$ [302], donc $r \approx 3{,}2$ nm (10 unités AA). Cette valeur est de l'ordre de grandeur du rayon de Förster pour le couple NR/BDPMA greffé. Rappelons de plus que le BDPMA est certainement localisé sur la surface du cœur des NPFs. Ainsi, en théorie, en milieu acide la fluorescence du BODIPY doit pouvoir être éteinte par transfert d'énergie, alors qu'en milieu basique elle ne devrait peu ou pas être altérée.

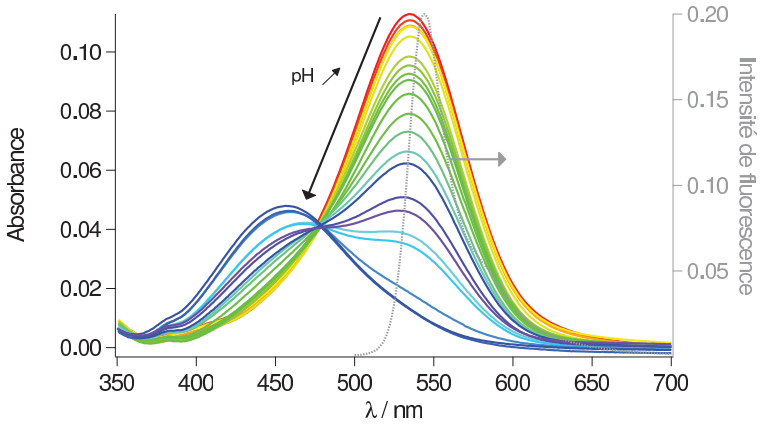


FIGURE 6.3 – Spectres d'absorption du Neutral Red à différents pH (-) et spectre d'émission de fluorescence de NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA) (···), enregistrés dans l'eau.

Il existe peu d'exemples dans la littérature où le Neutral Red a été greffé sur des surfaces. On peut citer Jeykumari et coll. qui ont greffé du NR à des nanotubes de carbone couverts d'acides carboxyliques par un couplage activé à l'EDC et au NHS, afin de réaliser des capteurs à eau oxygénée [351] ou à glucose [352].

Greffage

Le Neutral Red a été greffé par un couplage peptidique à la surface de particules à couronne PEO-*b*-PAA_{10} et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_3)_{120}$ dans les conditions énoncées au §6.1.1. Le Neutral Red étant peu soluble dans l'eau, il est solubilisé dans un minimum d'éthanol avant d'être ajouté à la suspension de NPFs. L'éthanol a été choisi en tant que mauvais solvant du PS et solvant miscible à l'eau (maximum 10 % en volume comparativement au volume d'eau final). Ainsi, l'ajout de ce solvant ne devrait pas faire gonfler le cœur des NPFs contrairement à des solvants comme l'acétone ou le DMSO. Trois couplages ont été réalisés, avec trois rapports initiaux de Neutral Red par rapport au BDPMA (NR/BDPMA) : 0,3/1 , 1/1 et 2/1.

Les nanoparticules sont purifiées par dialyse. Durant cette étape, l'eau extérieure à la membrane, changée à plusieurs reprises, est fortement colorée dans les premiers jours. Cela signifie donc que le Neutral Red n'est pas greffé en totalité. Après dialyse, les nanoparticules greffées Neutral Red semblent moins stables dans l'eau que les nanoparticules vierges et présentent un diamètre hydrodynamique d'environ 100 nm (contre 65 nm avant). Cela peut être dû au fait que le Neutral Red est peu soluble dans l'eau, par conséquent le greffage du Neutral Red introduit des zones hydrophobes dans la couronne hydrophile des nanoparticules et les déstabilise.

Propriétés spectroscopiques des NPFs greffées

L'effet du greffage du Neutral Red sur les NPs peut être visible à l'œil nu comme le montrent les photographies ci-dessous prises en milieux acides (pH 2) et basiques (pH 12) (FIGURE 6.4).

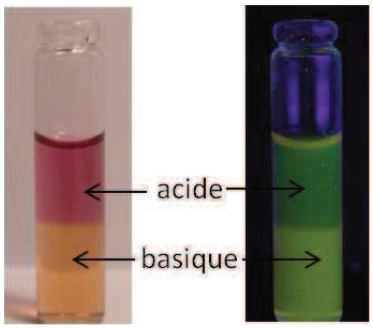


FIGURE 6.4 – Photographies des NPFs greffées NR en milieu acide (pH 2) (haut) et basique (pH 12) (bas). Gauche : à la lumière du jour et droite : sous éclairement UV (λ_{exc} = 365 nm).

Les spectres d'absorption des NPFs greffées avec le plus fort taux de NR sont présentés FIGURE 6.5. Un fond de diffusion plus prononcé est observé pour les NPFs greffées par rapport aux NPFs avant greffage. Cela est dû à leur plus grand diamètre. La signature du NR sur les NPFs greffées est difficilement observable, seul un léger épaulement est visible vers 460 nm en milieu basique. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où les coefficients d'extinction molaire du NR sont relativement élevés pour les formes A et B (supérieurs à 14 000 $M^{-1}.cm^{-1}$).

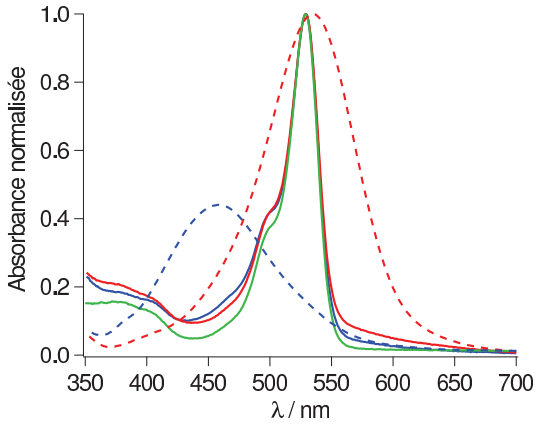


FIGURE 6.5 – Spectres d'absorption des NPFs greffées avec un rapport initial NR/BDPMA = 2/1 dans l'eau, en milieu acide (-) et basique (-) ainsi que des NPFs avant greffage (-) et du Neutral Red en milieu acide (• • •) et basique (• • •). Les spectres ne tiennent pas compte des ε des différentes espèces.

Les NPFs présentant différents rapports en NR ont été caractérisées par spectrophotométrie de fluorescence (TABLEAU 6.4). Quelle que soit la quantité de NR greffé, le rendement quantique de fluorescence chute dramatiquement comparativement aux NPFs

avant greffage (Φ_F = 20 %) et ce même en milieu basique. Pour des pH > 8, les spectres d'absorption du NR et d'émission de fluorescence du BDPMA sont supposés être décorrélés. De plus, lorsque la quantité de NR augmente, le Φ_F des NPFs greffées diminue. Il semble donc que le NR inhibe la fluorescence du BDPMA quel que soit le pH. Remarquons que les spectres d'émission de fluorescence (non présentés) sont identiques avant et après greffage mais d'intensité plus faible.

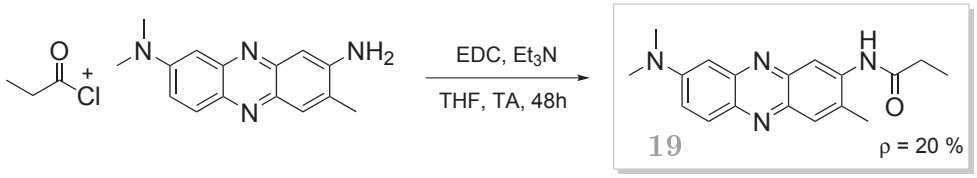
Tableau 6.4 – Caractéristiques spectroscopiques des nanoparticules à couronne PEO-*b*-PAA_{10} et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_3)_{120}$ à différents taux de Neutral Red greffé.

Exp.	NR/chaîne[a]	NR/BDPMA[a]	$\Phi^b_{F,\ A}$	$\Phi^b_{F,\ B}$
G25	1	0,3	0,03	0,03
G32	3	1	0,01	0,02
G23	6	2	0,01	0,01

[a] Rapports théoriques (calculés par rapport aux quantités de matière initialement introduites pour le greffage). [b] Rendements quantiques en milieux acides (A) et basiques (B) des NPFs greffées NR.

Modèle du Neutral Red greffé

Les résultats spectroscopiques obtenus pour les NPFs à cœur BDPMA greffées NR étant déconcertants, nous avons analysé un modèle du NR greffé : le NR portant une amide à la place de l'amine. La molécule **19** a ainsi été synthétisée en réalisant un couplage peptidique entre le Neutral Red et le chlorure de propionyle dans le THF, en présence d'EDC (Schème 6.4).



Schème 6.4 – Synthèse du dérivé du Neutral Red servant de modèle de molécule greffée.

Les spectres d'absorption pour cette molécule à différents pH sont visibles sur la Figure 6.6. Il apparaît clairement que les bandes en milieux basique et acide ont été déplacées vers le rouge par rapport au Neutral Red. Un déplacement bathochrome des bandes principales d'absorption de 45 nm pour la forme basique et de 24 nm pour la forme acide est observé. Dans la partie du spectre visible, trois points isobestiques sont observés, à 386, 447 et 504 nm, contre un seul dans le cas du neutral red. De plus, les coefficients d'extinction molaire ont largement chuté puisqu'ils passent de 22800 à 5600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ pour la forme acide et de 14650 à 2510 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ pour la forme basique. Le rayon

de Förster de cette molécule en interaction avec des NPFs à cœur BDPMA a alors été calculé. En milieu acide, ce rayon vaut 3,8 nm, alors qu'en milieu basique il vaut 3,0 nm. S'il existe un transfert d'énergie des BDPMA vers les NR greffés, il n'y a pratiquement aucune différence d'efficacité entre les milieux acides ou basiques.

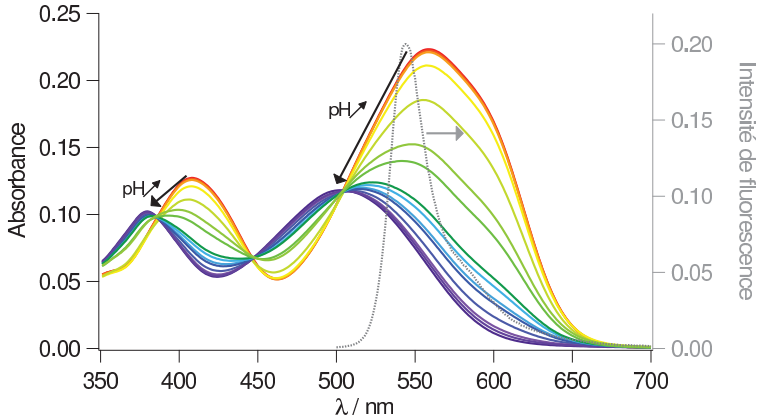


FIGURE 6.6 – Spectres d'absorption du composé **19** à différents pH (-) et spectre d'émission de fluorescence de NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur P(S-*co*-BDPMA) (···), enregistrés dans l'eau.

Ces observations expliquent d'une part pourquoi les bandes caractéristiques du Neutral Red ne sont pas visibles sur les spectres d'absorption des nanoparticules greffées (coefficient d'extinction molaire du NR-amide trop faible), d'autre part pourquoi le rendement quantique des NPFs greffées chute même sous forme basique.

Enfin, le pK_a du Neutral Red modèle a été évalué, ainsi que sa zone de virage. Pour évaluer le pK_a d'un indicateur coloré, des spectres d'absorption de même concentration molaire mais à différents pH sont enregistrés. Le pK_a est alors déterminé à l'aide de l'équation de Benesi-Hildebrand :

$$pH = pK_a + log\frac{A - A_A}{A_B - A} \tag{6.1}$$

où :

A	absorbance de la solution à un pH donné
A_A	absorbance de la solution où l'espèce acide est seule
A_B	absorbance de la solution où l'espèce basique est seule

qui peut être écrite sous la forme :

$$A = \frac{A_A + A_B K_a 10^{pH}}{1 + K_a 10^{pH}} \tag{6.2}$$

La FIGURE 6.7 présente l'évolution de l'absorbance à 560 et à 535 nm en fonction du pH, respectivement pour les composés Neutral Red et **19**, ainsi que l'ajustement des points expérimentaux avec l'équation 6.2. Ainsi, le pK_a du composé **19** a pu être estimé à 5,10, alors que celui du Neutral Red est de 6,62 (littérature : 6,8 [349]). De plus, pour le composé **19**, la zone de transition de pH va de 4 à 6, contre 5,5 à 8 pour le Neutral Red.

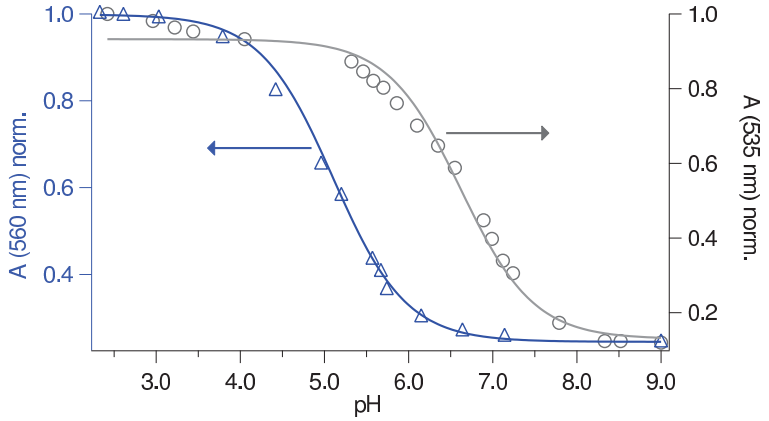


FIGURE 6.7 – Évolution du maximum d'absorbance des composés **19** (△, λ_{abs} = 560 nm) et Neutral Red (○, λ_{abs} = 535 nm) en fonction du pH. Ajustement des points expérimentaux par l'équation 6.2.

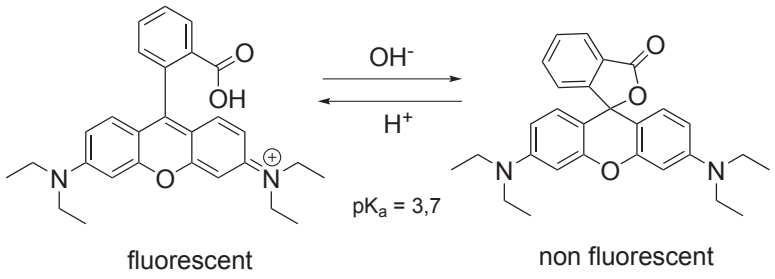
En conclusion, il est possible de greffer une sonde colorimétrique sur la surface des nanoparticules mais le Neutral Red ne semble pas être une molécule de choix pour nos systèmes.

Par ailleurs, les senseurs de type ratiométrique ont par la suite été étudiés. Ces senseurs, particulièrement intéressants, ont pour principe d'avoir une sonde répondant au pH et l'autre non, celle-là servant de référence interne. C'est pourquoi à présent nous nous intéresserons à des molécules fluorescentes sensibles au pH, dérivées de la Rhodamine et de la Fluorescéine.

6.2.2 Greffage d'un dérivé de la Rhodamine B

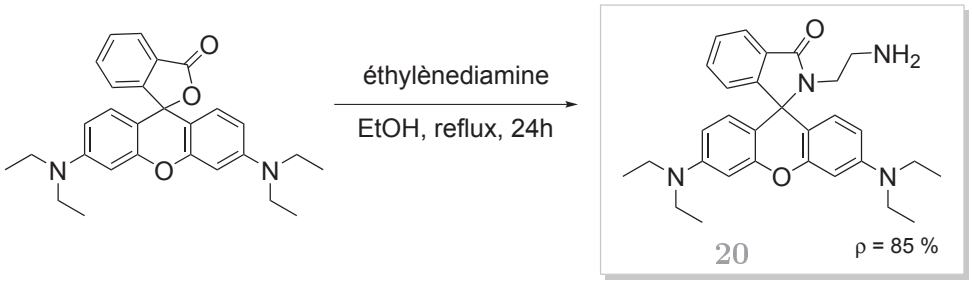
Les Rhodamines sont une famille de colorants à cœur xanthène [12], photostables, souvent utilisée en tant que colorants lasers. Un des dérivés les plus courants de cette famille de molécules est la Rhodamine B. Celle-ci présente un pK_a de 3,5 [353] et est fluorescente sous sa forme acide et non fluorescente sous sa forme basique (SCHÈME 6.5). Dans l'eau, la Rhodamine B absorbe à 562 nm et émet à 583 nm. Cette molécule est donc une bonne candidate pour élaborer des sondes pH couplées au BDPMA qui émet à 544 nm. Si un transfert d'énergie de type Förster peut avoir lieu entre le BDPMA et la Rhodamine, en excitant sélectivement le BDPMA, il doit être possible de mesurer l'émission de fluorescence du BDPMA et de la Rhodamine B à différents pH et ainsi d'établir une droite d'étalonnage ratiométrique.

La Rhodamine B ne peut être greffée directement sur la couronne des NPFs à base de PAA. Il faut donc introduire une fonction amine sur sa structure. Néanmoins, si l'acide carboxylique présent sur le cycle en position 9 du noyau xanthène est transformé en amide, la forme fermée n'est plus une lactone mais une lactame et le pK_a de la molécule est dramatiquement modifié. Ainsi, Lin et coll. ont montré que plus le groupement porté par l'amide était encombré, plus le pK_a était élevé car la forme spyrolactame a de plus



Schème 6.5 – Rhodamine B sous ses formes acide et basique.

en plus de mal à se former [354]. En introduisant une chaîne éthyle, le pK_a est d'environ 2, alors qu'avec un groupement adamantane le pK_a est de 5,8. En nous basant sur ces travaux, nous avons tout d'abord synthétisé le composé **20**, dérivé de la Rhodamine B possédant une amine (Schème 6.6). Le protocole décrit par Yuan et coll. qui consiste à former un chlorure d'acide à l'aide de trichlorure de phosphoryle, puis à le faire réagir avec l'éthylènediamine n'a pas fonctionné et était assez lourd à mettre en œuvre. Yamato et coll. [355] et Shiraishi et coll. [356] ont décrit la synthèse de cette même molécule en chauffant tout simplement à reflux la Rhodamine B et l'éthylènediamine dans l'éthanol. Ce protocole plus simple a donc été retenu (Schème 6.6).



Schème 6.6 – Synthèse du dérivé de la Rhodamine B à fonction amine.

Dans ces conditions, le greffage de la Rhodamine **20** a été effectué sur des NPs à cœur PS non fluorescentes, couvertes par une couronne de PEO-*b*-PAA. Malheureusement, cette molécule absorbe trop peu pour être observée sur les nanoparticules (seule la diffusion est observée en absorbance). En variant le pH, aucun changement n'a pu être observé dans la partie visible du spectre, même à des pH inférieurs à 2.

Un modèle de cette molécule sous forme diamide a alors été synthétisé, tout comme dans le cas du Neutral Red (Schème 6.7).

En faisant varier le pH depuis un pH 12 vers un pH 1, aucun changement de couleur ou de fluorescence n'est observé, la solution reste rose pâle et peu fluorescente. Nous avons cependant remarqué qu'une solution aqueuse acide (pH 1,5) du composé **21**, initialement incolore, devenait rose fluorescente 24 h après sa préparation. À l'inverse, en partant d'une solution acide et en ajoutant quelques gouttes de base, la solution devient instantanément incolore. D'après ces résultats, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'ouverture du cycle spirolactame par un suivi de l'absorbance de la solution à 562 nm (Figure 6.8).



Schème 6.7 – Synthèse du modèle **21** du dérivé **20** de la Rhodamine B.

Il s'avère que l'ouverture totale du cycle met 12h à être réalisée. Cette molécule ne peut donc raisonnablement pas être employée comme senseur de pH.

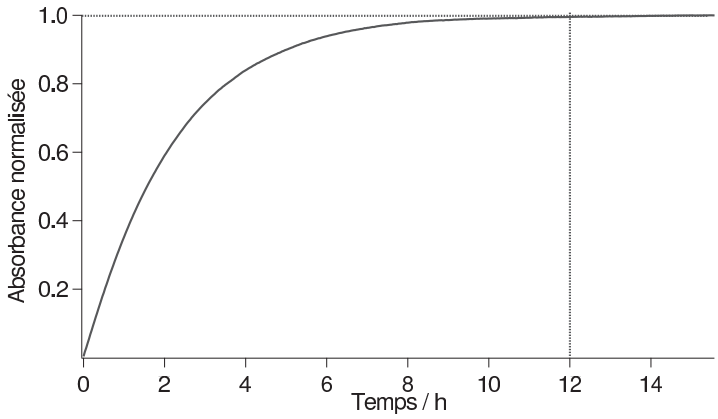


Figure 6.8 – Suivi cinétique par absorbance (562 nm) du passage de la forme fermée (basique) à la forme ouverte (acide) du dérivé de la Rhodamine B **21**.

Le dérivé de la Rhodamine B sous sa forme amide ne peut être employé comme senseur de pH de par son trop lent équilibre entre les formes acide et basique. Une molécule appartenant également à la famille des xanthènes est la Fluorescéine. Dans le prochain paragraphe nous verrons l'utilisation de cette molécule également sensible au pH.

6.2.3 Greffage de la Fluorescéinamine

Les Fluorescéines sont une famille de composés fluorescents à cœur xanthène, tout comme les rhodamines. La Fluorescéine présente cinq formes acido-basiques (Figure 6.9). Ses propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence sont fortement dépendantes du pH. Nous nous intéresserons principalement aux formes **c** et **d** dont le couple présente un pK_a de 6,4 [357].

Les caractéristiques spectroscopiques des formes **b**, **c** et **d** sont résumées dans le Tableau 6.5 [357]. La forme **d** est fortement absorbante et fluorescente avec un rendement quantique de 0,93 et émet à 520 nm, alors que la forme **c** est beaucoup moins fluorescente et émet sous la forme d'une bande large entre 520 et 540 nm. Ces caractéristiques en font

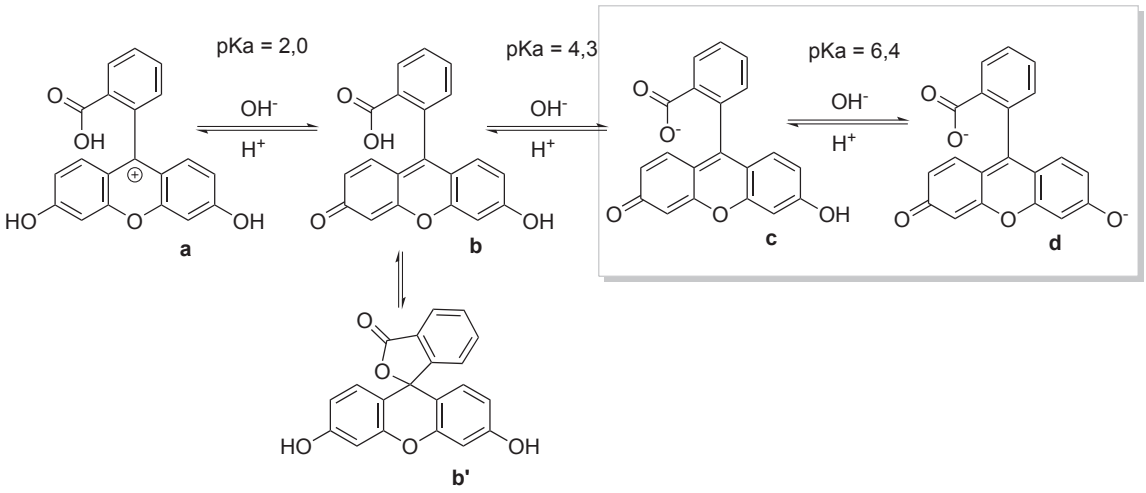


FIGURE 6.9 – Différentes formes de la Fluorescéine en fonction du pH (issu de [357, 20]).

une molécule d'intérêt pour l'élaboration de sondes pH couplées au BDPMA qui absorbe à 528 nm. Ainsi, en milieu basique, en excitant la Fluorescéine, il doit être possible d'observer la fluorescence du BDPMA par transfert d'énergie, alors qu'en milieu acide cet effet doit être beaucoup moins prononcé.

TABLEAU 6.5 – Caractéristiques spectroscopiques dans l'eau des formes **b**, **c** et **d** de la Fluorescéine (données issues de [357]).

Espèce	λ_{abs}	λ_F	ε	Φ_F	τ
	nm	nm	10^3.L.mol^{-1}.cm^{-1}		ns
F_b	434	-	11	≈ 0	-
F_c	472	520-540	29	0,37	3,0
F_d	490	520	77	0,93	4,1

Les dérivés les plus utilisés de la Fluorescéine sont la Fluorescéine isothiocyanate (FITC), la Fluorescéine-5-thiosemicarbazide (FTC) et la 5(6)-carboxyfluorescéine *N*-succinimidyl ester qui possèdent des groupements réactifs permettant de les attacher, entre autres, à des peptides, protéines, polymères [358, 359].

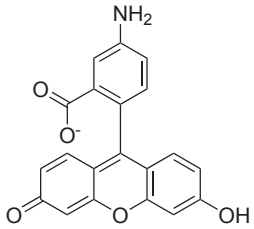
Ainsi, Wooley et coll. ont post-fonctionnalisé des copolymères à bloc de PEO_{45}-*b*-PVBA-TTC-C_{12} (PVBA : polyvinylbenzaldéhyde) par la FTC [231]. Par un assemblage par la méthode de déplacement de solvants, des nanoparticules de 24 nm de diamètre hydrodynamique, possédant en moyenne 30 fluorophores par particules sont obtenues. Le rendement quantique de fluorescence est de 22 % et la brillance de 510 $\times 10^3$.L.mol^{-1}.cm^{-1}.

Larpent et coll. ont, quant à eux, post-fonctionnalisé des nanoparticules de PS (réticulées DVB) couvertes de groupements amine, par la FITC [176]. Avant greffage de la FITC, ces NPs sont déjà fluorescentes car elles contiennent du 1,9-diphénylanthracène. Les nanoparticules après greffage contiennent en moyenne 20 DPA et 55 FITC pour un

diamètre hydrodynamique d'environ 20 nm. Leur pK_a est d'environ 5,6. Ces NPFs constituent des senseurs ratiométriques. La même équipe a également fonctionnalisé par une chimie click des NPs de PS couvertes de groupements azotures par une Fluorescéine et un dansyle à fonctions alcynes [177]. Ces senseurs de pH ratiométriques contiennent environ 90 Fluorescéines par particule.

Chen, Yi et coll. [360] ont copolymérisé un dérivé monomère de la Fluorescéine avec du MMA, un monomère spyropyrane et un tensioactif polymérisable à base de PEO_{40} par une polymérisation en miniémulsion. Les NPs cœur/couronne obtenues mesurent en moyenne 150 nm de diamètre et contiennent environ 8000 Fluorescéines.

Dans notre travail, nous avons choisi de travailler avec l'isomère I commercial de la Fluorescéinamine (FA). La Fluorescéinamine présente un rendement quantique de 1,5%, ce qui est très inférieur à ceux de la Fluorescéine ou de la FITC (76%). Cette chute de rendement quantique est due à la présence de l'amine (transfert d'électron photo-induit). Lorsque la FA est transformée en amide, le rendement quantique augmente alors vers 80%, selon la nature du groupement porté par l'acide [361].



Schème 6.8 – Isomère I de la Fluorescéinamine (FA).

La FA peut être greffée sur du PAA par un couplage peptidique dans l'eau, activé à l'EDC [362, 363]. Elle peut également être transformée en monomère à fonction acrylamide [364, 365]. Ainsi, Sun et coll., ont copolymérisé un dérivé acrylamide de la FA avec un dérivé de la rhodamine B à fonction acrylate, dans une matrice d'acrylamide réticulée par le méthylènebis(acrylamide) [158]. La polymérisation est réalisée en microémulsion inverse eau dans l'huile. Les particules sont ensuite redispersées dans l'eau. Chaque particule de 50 nm de diamètre contient en moyenne 5,7 FA et 75 Rh B. Le pK_a de la FA greffée aux nanoparticules est de 6,6.

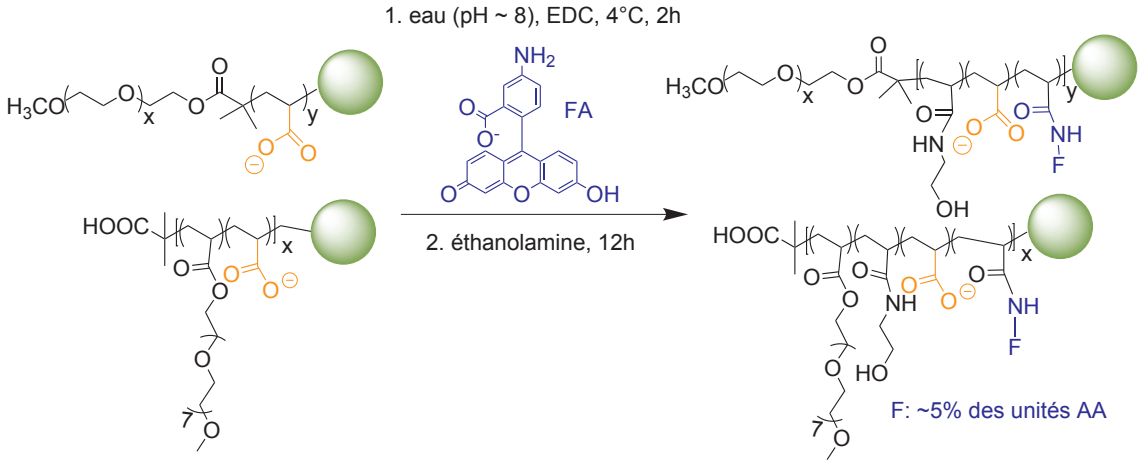
Delaittre, Cornelissen et coll. se sont intéressés au greffage de la FA sur des NPs à couronne $PEOMA_{11}$ ayant un ester activé succinimidyle en bout de chaîne et un cœur PS_{100} (assemblage des NPs par la méthode de déplacement de solvants) [366]. Le nombre d'agrégation est estimé par MET à $N_{agg}^{MET} = 910$. Les auteurs calculent par des mesures d'absorbance qu'ils greffent environ 850 FA par particule, ce qui signifie que 93 % des chaînes sont fonctionnalisées. La légère perte d'efficacité de greffage est attribuée d'une part à l'erreur effectuée sur la mesure, et d'autre part à l'hydrolyse de l'ester activé dans l'eau. Malheureusement, aucune étude spectroscopique en fonction du pH n'a été réalisée

sur ces objets, il s'agissait seulement pour les auteurs de démontrer le principe de ce greffage.

Il n'existe pas à notre connaissance de nanosenseurs de pH ratiométriques à base de Fluorescéine et de BODIPY. De plus, la plupart des senseurs ratiométriques ont un nombre de fluorophores par particule limité. Nous pouvons espérer en greffer plus grâce au grand nombre de fonctions acides présentes à la surface des NPs de type PEO-*b*-PAA ou P(AA-*co*-APEO).

Greffage de la Fluorescéinamine sur des NPs à cœur PS (sans BDPMA)

Dans un premier temps, la FA a été greffée sur les NPs non fluorescentes à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ (Schème 6.9). Les réactions sont réalisées selon les conditions énoncées dans le §6.1.1 en choisissant d'avoir initialement une FA pour dix motifs d'acide acrylique. Tout comme dans le cas du Neutral Red, la FA est solubilisée dans l'éthanol (maximum 10 % en volume comparativement au volume d'eau final) et la solution ajoutée à la dispersion de NPs. Deux heures après le début de la réaction, un excès d'éthanolamine est ajouté à la solution afin de passiver les fonctions acides carboxyliques résiduelles. Ainsi, les NPFs devraient être stables quel que soit le pH (*cf.* §6.1.2). Exceptionnellement ces greffages sont purifiés par dialyse sur des membranes de pores 300 kDa car nous avons remarqué que l'utilisation des membranes 12-14 kDa ne permettaient pas d'éliminer toute la FA libre en solution.



Schème 6.9 – Greffage de Fluorescéinamine (FA) sur des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$.

Les NPFs greffées FA et $EtOHNH_2$ ont tout d'abord été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et par mesures de potentiel ζ. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 6.6.

Pour les NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19}, le diamètre des NPs est sensiblement le même avant ou après greffage. Les NPs greffées ne précipitent plus à pH 4 mais leur potentiel

ζ n'est pas significativement différent de celui des NPs avant greffage. La valeur globalement négative du potentiel ζ provient probablement du bloc linéaire de PEO présent à l'extrémité des couronnes hydrophiles.

Les NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ greffées sont, quant à elles, plus petites que les NPs avant greffage (la mesure a été réalisée deux fois à pH 7, D = 70 nm contre 56 nm après greffage). Cela pourrait être dû à un réarrangement des chaînes de la couronne hydrophile après greffage. En introduisant des fonctions amides au détriment des fonctions acides carboxyliques, la répulsion électrostatique entre chaînes est moins grande et donc le diamètre hydrodynamique des NPs peut éventuellement diminuer. La valeur du potentiel ζ des NPs greffées est légèrement supérieure à celle des NPs avant greffage pour des pH entre 6 et 8. À pH 4, le potentiel ζ est quasiment neutre, ce qui provient peut-être d'un moins bon écrantage des brosses de PEO comparé au PEO linéaire.

Tableau 6.6 – Caractéristiques des NPs à cœur PS et à différentes couronnes hydrophiles, greffées FA et $EtOHNH_2$. Potentiels ζ (mV) mesurés dans l'eau à différents pH ([tampons phosphate/citrate] = 1 mM, [NaCl] = 14 mM).

Exp	couronne	G[a]	D_z (σ)	ζ			
			nm	pH 4	pH 6	pH 7	pH 8
	PEO-*b*-PAA_{19}		80[b]		-16	-17	-17
G45	PEO-*b*-PAA_{19}	√	73 (0,23)	-9	-14		-14
	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$		70 (0,12)	-12	-26	-28	-24
G49	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$	√	56 (0,06)	-1	-18		-21

[a] NPFs greffées éthanolamine et Fluorescéinamine. [b] Diamètre hydrodynamique mesuré sur l'appareil Cordouan.

Remarquons qu'une méthode pour caractériser le succès de ces greffages serait d'utiliser la CES en couplée à la détection UV-vis. réglée sur le maximum d'absorption de la FA. Malheureusement, ces copolymères à base d'acide acrylique doivent être méthylés avant d'être analysés par CES. Or, une analyse de l'absorbance de ces copolymères après méthylation montre que le spectre d'absorption de la FA a dramatiquement changé. Il est très probable que l'agent de méthylation (TMS) ait également réagi sur la fonction acide carboxylique de la FA et ait altéré ses propriétés spectroscopiques. Ces copolymères ont alors été analysés par CES dans le DMF (+LiBr), analyse qui ne nécessite pas d'étape de méthylation grâce aux sels présents dans l'éluant. Malheureusement les copolymères à base de PS sont peu solubles dans le DMF. De plus, la FA dans ce solvant est présente sous sa forme neutre (forme **b**, Figure 6.9), forme qui absorbe très peu dans le visible (Tableau 6.5). L'analyse des copolymères par la méthode CES couplée à une détection UV-vis. n'a donc pas donné des résultats interprétables.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence en fonction du pH des NPs à

cœur PS greffées FA (et éthanolamine) sont présentés FIGURE 6.10 pour les couronnes PEO-*b*-PAA_{19} et FIGURE 6.11 pour les couronnes $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Les caractéristiques de ces NPFs sont résumées dans le TABLEAU 6.7. Les NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} absorbent à 494 nm et émettent à 522 nm à pH 8. Un léger déplacement bathochrome de ces maxima est observé pour les NPs à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Les Fluorescéines étant des molécules fortement solvatochromes, ce déplacement pourrait être dû à une légère différence d'environnement entre les deux types de couronnes.

Pour ces deux types de NPs greffées, l'intensité d'absorption et l'émission de fluorescence augmentent lorsque le pH passe de 4 à 8, ce qui est dû au passage de la forme **c** à la forme **d** de la Fluorescéine. La FA, une fois greffée, a donc conservé ses propriétés de sensibilité au pH.

Les rendements quantiques de fluorescence des deux types de NPs ($\approx$ 13 %) sont plus faibles que pour la Fluorescéine en solution, ce qui peut être dû à une trop grande proximité des FA entre elles et donc à une inhibition de fluorescence par formation d'agrégats. Les durées de vie moyennes de fluorescence sont également du même ordre de grandeur pour les deux types de NPs, vers 2,2-2,6 ns, quelle que soit la longueur d'onde d'émission de fluorescence (TABLEAU 6.7, FIGURE 6.17).

TABLEAU 6.7 – Caractéristiques spectroscopiques des NPs à cœur PS et à différentes couronnes hydrophiles, greffées FA. Mesures réalisées dans l'eau à pH 8 ([tampons phosphate/citrate] = 10 mM, [NaCl] = 140 mM).

Exp	couronne	λ_{abs}	λ_F	Φ_F	$\overline{\tau}^a_{515}$	$\overline{\tau}^a_{543}$
		nm	nm		ns	ns
G45	PEO-*b*-PAA_{19}	494	522	0,12	2,2	2,2
G49	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	497	524	0,14	2,7	2,6

[a] Durées de vies moyennes calculées à l'aide de l'équation 3.2, mesurées pour λ_F = 515 ou 543 nm, avec λ_{exc} = 495 nm.

Par des mesures d'absorbance (en prenant $\varepsilon_{\text{FA greffée}} = 88 \times 10^3$.L.mol^{-1}.cm^{-1} à pH 8 [367]) des NPFs après dialyse, il a été possible d'estimer l'efficacité du greffage de la FA. Pour les NPs à couronne PEO-*b*-PAA, environ 5,2 % seulement des FA ont réagi, ce qui correspond à 0,3 FA par chaîne et à environ 530 FA par NPFs. Pour les NPs à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$, environ 3,0 % des FA ont été greffées, ce qui correspond à 0,33 FA par chaîne, et à environ 340 FA par NPFs. Ces valeurs sont certainement sous estimées car l'étape de dialyse peut avoir légèrement dilué les solutions de NPFs et donc faussé le calcul des concentrations en FA.

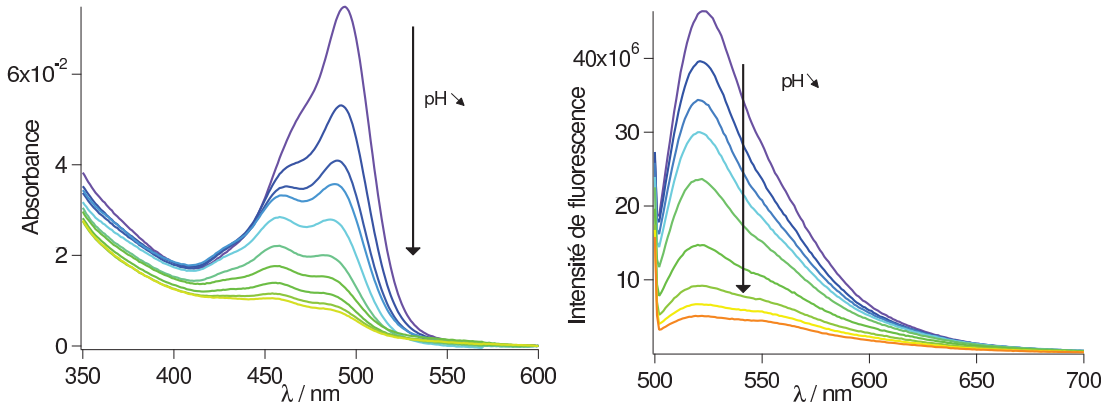


FIGURE 6.10 – Spectres des nanoparticules à couronne PEO-*b*-PAA_{19} greffées FA et éthanolamine et à cœur PS, enregistrés dans l'eau pour des pH allant de 4,4 à 8 (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM). Gauche : absorption. Droite : émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm).

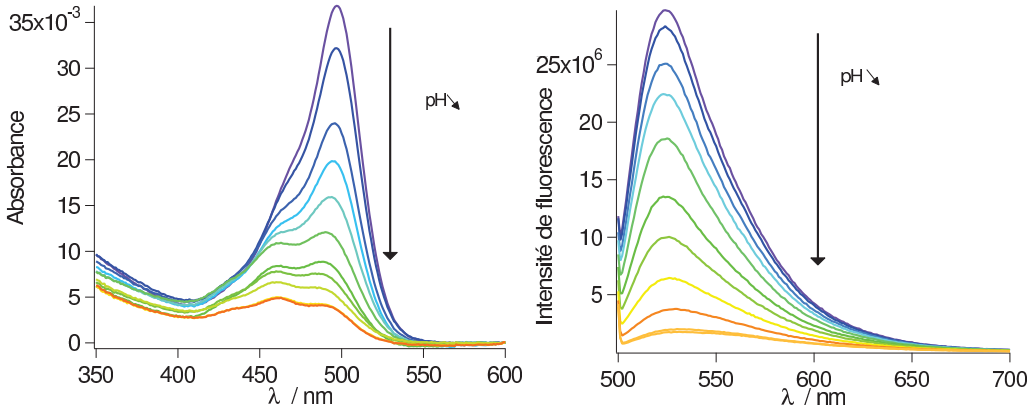


FIGURE 6.11 – Spectres des nanoparticules à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur PS, enregistrés dans l'eau pour des pH allant de 4,4 à 8 (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM). Gauche : absorption. Droite : émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm).

Enfin, le pK_a de la FA greffée aux NPs peut être estimé à l'aide de l'équation suivante [1] :

$$I = \frac{I_A + I_B K_a 10^{pH}}{1 + K_a 10^{pH}} \tag{6.3}$$

où : I_A intensité de fluorescence à la longueur d'onde λ en milieu acide
I_B intensité de fluorescence à la longueur d'onde λ en milieu basique

Pour les deux types de NPs, l'évolution de l'intensité de fluorescence avec le pH est présenté FIGURE 6.12. Dans les deux cas, le pK_a déterminé à l'aide de l'équation 6.3 est identique et est de 6,55 $\pm$ 0,02. Ce pK_a est proche de celui de l'équilibre entre les formes **c** et **d** de la Fluorescéine (FIGURE 6.9).

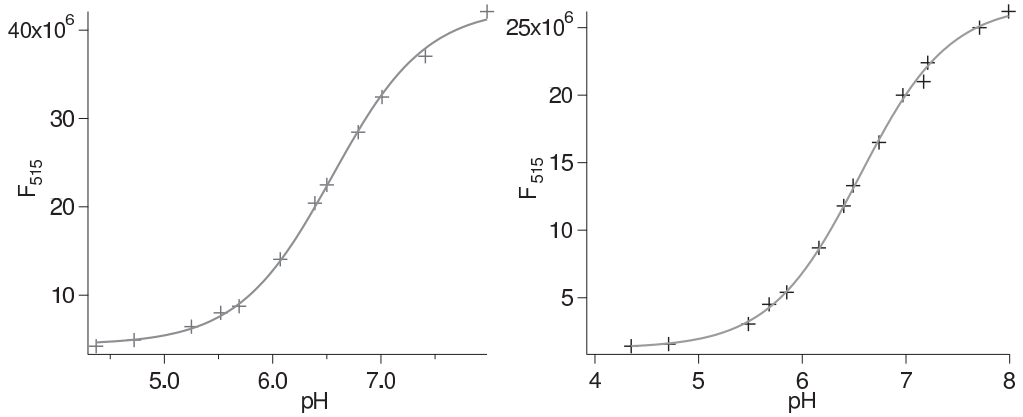


FIGURE 6.12 – Évolution du maximum de l'émission de fluorescence (515 nm) des NPs greffées FA et éthanolamine à cœur PS (+) en fonction du pH (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM) et ajustement par l'équation 6.3 (-). Gauche : couronnes PEO-*b*-PAA_{19}. Droite : couronnes $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$.

Il est donc possible de greffer de la FA sur des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Ces NPs sont très fluorescentes pour des pH supérieurs à 7,5 et peu fluorescentes pour des pH inférieurs à 6,0. Elles constituent donc des nanosenseurs de pH. Néanmoins, ces NPFs ne sont pas des senseurs ratiométriques possédant une sonde dont la fluorescence n'évolue pas avec le pH, et une sonde pH-sensible. Dans le prochain paragraphe, ce type de senseurs ratiométriques sera étudié.

Greffage de la Fluorescéinamine sur des NPFs

Afin de réaliser des senseurs de pH ratiométriques, nous avons fonctionnalisé la surface de NPs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne PEO-*b*-PAA_{15} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ par la Fluorescéinamine dans les mêmes conditions que précédemment.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des NPs à cœur PS et à couronne greffée FA et des NPs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à couronne "nue" sont présentés FIGURE 6.13. Il apparaît évident qu'il y a un bon recouvrement spectral entre le spectre

d'émission de fluorescence de la FA à pH 8 et le spectre d'absorption du BDPMA. Le rayon de Förster pour ce couple a été estimé à 4,2 nm (calculé avec $\varepsilon_{\text{BDPMA}} = 73 \times 10^3$.L.mol^{-1}.cm^{-1} et $\Phi_{\text{F NPs greffées FA}} = 0{,}13$). La longueur entre extrémités d'une chaîne de PAA_{15} dans l'eau est d'environ 4,8 nm (calculé par l'équation 3.15). Il peut donc *a priori* y avoir du transfert d'énergie efficace entre les BDPMA présents à la surface du cœur des NPs et les FA greffées en couronne.

Pour les couronnes de copolymère, la longueur entre extrémités de chaîne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ peut être estimée de la même manière en assimilant les unités APEO à des unités AA. Il est à noter qu'ici nous faisons une estimation très approximative. On trouve alors $r \approx 7$ nm. Cette valeur correspond à l'étirement maximal de la chaîne de copolymère dans l'eau. Les FA qui seraient greffées en extrémité de chaîne seraient trop éloignées pour permettre un transfert d'énergie efficace avec les BDPMA situés à la surface du cœur des NPFs. En revanche, les FA qui seraient greffées près du cœur des NPFs pourraient réaliser du transfert d'énergie avec ces BDPMA de surface.

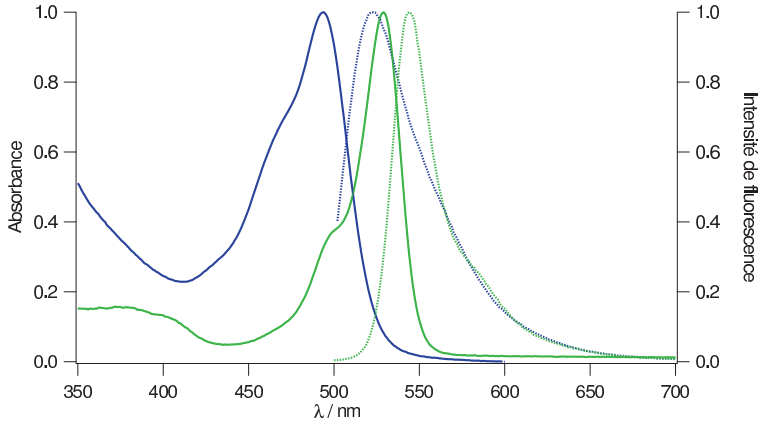


FIGURE 6.13 – Spectres d'absorption (-) et d'émission de fluorescence (···, $\lambda_{exc} = 495$ nm) enregistrés dans l'eau des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} : greffées FA et éthanolamine (pH 8, 140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM) et à cœur PS (-) et couronne non modifiée et cœur P(S-*co*-BDPMA) (-).

La FA a alors été greffée sur des nanoparticules fluorescentes en suivant le même protocole que pour le greffage sur les NPs à cœur PS seul.

Ces NPFs greffées ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et potentiel ζ (TABLEAU 6.8). Comme dans le cas précédent, le diamètre hydrodynamique des NPFs après greffage est légèrement inférieur à celui des NPFs avant greffage. Cela peut, comme auparavant, éventuellement s'expliquer par une réorganisation des chaînes de la couronne hydrophile.

Pour les NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15}, les potentiels ζ avant et après greffage sont du même ordre de grandeur. Il a été vu précédemment que les mêmes NPFs greffées éthanolamine avaient un potentiel ζ qui n'était pratiquement pas modifié avant et après greffage (TABLEAU 6.2).

Les NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ présentent, quant à elles, un potentiel ζ diminué après greffage quel que soit le pH. Ce potentiel ζ devient même légèrement positif à pH 4.

Ces différences observées en terme de potentiel ζ pour les deux types de couronnes ont déjà été commentées auparavant. Il s'agit certainement pour le cas des couronnes dibloc PEO-*b*-PAA d'un écrantage des unités PEO qui donne ces valeurs négatives quel que soit le pH.

Ces deux types de NPFs ont également été analysées en MET (clichés non présentés). Les mêmes morphologies et diamètres de particules sont observés avant et après greffage.

TABLEAU 6.8 – Caractéristiques des NPFs à cœur P(S-*co*-BDPMA) et à différentes couronnes hydrophiles, greffées FA et $EtOHNH_2$. Potentiels ζ (mV) mesurés dans l'eau à différents pH ([tampons phosphate/citrate] = 1 mM, [NaCl] = 14 mM).

Exp	couronne	G[a]	D_z (σ)	ζ			
			nm	pH 4	pH 6	pH 7	pH 8
	PEO-*b*-PAA_{15}		76 (0,12)		-17	-14	- 16
G44	PEO-*b*-PAA_{15}	√	68 (0,10)	-11		-15	-15
	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$		77 (0,10)	-16	-29	- 36	-30
G48	P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$	√	68 (0,14)	+5	-12	-16	-21

[a] NPFs greffées éthanolamine et Fluorescéinamine.

Les NPFs greffées FA ont par la suité été analysées par spectrophotométrie d'absorption et d'émission de fluorescence (FIGURE 6.14, FIGURE 6.15). Le maximum d'absorption se trouve vers 495 nm pour la bande correspondant à la FA et à 528 nm pour le BODIPY, quelle que soit la nature de la couronne hydrophile. Lorsque le pH diminue, la bande correspondante à la FA diminue. On observe également une diminution de la bande d'absorption du BDPMA car l'absorbance de la FA se superpose à celle du BDPMA jusqu'à environ 530 nm.

L'analyse des spectres d'absorption permet de déterminer le nombre de FA comparativement au nombre de BDPMA par chaîne. Pour cela, l'absorbance (528 nm) du BDPMA en milieu acide (pH $\approx$ 4) est prise comme référence pour déterminer la quantité de BDPMA. Puis, la différence d'absorbance (495 nm) entre les spectres des NPFs en milieux basique (pH $\approx$ 8) et acide est attribuée à la présence de la FA seule. Les quantités de matière respectives de BDPMA et de FA sont calculées à l'aide des coefficients d'extinction molaire de chaque espèce ($\varepsilon_{\text{FA greffée}} = 88 \times 10^3$.L.mol^{-1}.cm^{-1} [367] et $\varepsilon_{\text{BDPMA}} = 73 \times 10^3$.L.mol^{-1}.cm^{-1}). Pour les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA_{15}, le calcul indique que 1 FA est greffée pour 1,7 BDPMA (0,6 FA/chaîne, environ 4 % des AA sont greffés par chaîne), soit un rendement de greffage de 8 %. Pour les couronnes de copolymères

P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$, 1 FA est greffée pour 3,6 BDPMA (0,5 FA/chaîne, environ 5 % des AA sont greffés FA), soit un rendement de greffage de 3 %. Ces efficacités de greffage sont du même ordre de grandeur que celles déterminées pour le greffage de FA sur des NPs à cœur PS. Il semble donc que le greffage de la FA soit plus difficile sur des NPs à couronnes de type P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ que sur celles à couronne PEO-*b*-PAA_{15}. Cela est probablement dû à l'encombrement stérique des monomères APEO dans les copolymères de type P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$, rendant difficile l'accès du fluorophore aux unités d'AA.

Précédemment, il a été vu que le greffage d'éthanolamine dans des conditions similaires menait à un greffage de 60 % des fonctions acides acryliques. Par ailleurs, des tests de greffage des mêmes NPFs en présence de FA seulement ont montré des efficacités de greffage similaires. Ce n'est donc pas l'éthanolamine introduite après 2 h de réaction qui empêche le greffage efficace de la FA. Cette faible efficacité vient certainement du fait que cette molécule est d'assez grande taille (comparativement à l'éthanolamine) et il ne doit pas être possible d'un point de vue stérique de faire réagir plus que 4-5 % des AA. Comparativement, Déjugnat et coll. ont greffé la FA sur des PAA dans un mélange DMF/eau 95/5 et utilisant EDC seulement, et seulement 0,7 % des unités AA sont marquées par la FA [363].

Bien que les rendements de greffage soient relativement faibles, le nombre de FA greffées par particule reste tout de même satisfaisant (Tableau 6.9), avec en moyenne 1140 FA par NPFs pour les couronnes de type PEO-*b*-PAA_{15} et 540 FA par NPFs pour les couronnes de type P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$. Ce nombre élevé de fluorophores par particule place ces objets parmi les meilleurs recensés dans la littérature en terme de concentration de fluorophores en surface.

Les spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm, excitation des deux fluorophores simultanément) des NPFs greffées présentent deux bandes, l'une correspondant à la FA, vers 515 nm ; l'autre correspondant au BDPMA vers 544 nm. De même que pour les spectres d'absorption, l'émission de fluorescence de la bande de la FA diminue avec le pH. La bande correspondant au BDPMA diminue également certainement car celle de la FA qui émet jusqu'à environ 600 nm s'y superpose (Figure 6.13).

Une courbe d'étalonnage de pH a été réalisée pour les deux types de NPFs en traçant le rapport d'intensité des bandes de fluorescence de la FA (515 nm) et du BDPMA (542 nm) en fonction du pH (Figure 6.16). Le pK_a des NPFs peut alors être estimé par ajustement de ces courbes avec l'équation 6.3. On trouve un pK_a de 6,69 $\pm$ 0,04 pour la FA greffée aux NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et un pK_a de 6,47 $\pm$ 0,04 pour les couronnes P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$. Ces pK_a sont du même ordre de grandeur et similaires à ceux mesurés pour la FA greffée aux NPFs à cœur PS (pK_a = 6,55).

La réversibilité des systèmes avec le pH en mesurant les rapports des bandes de la FA

et du BDPMA pour un cycle de montée et descente en pH (FIGURE 6.16) a également été validée.

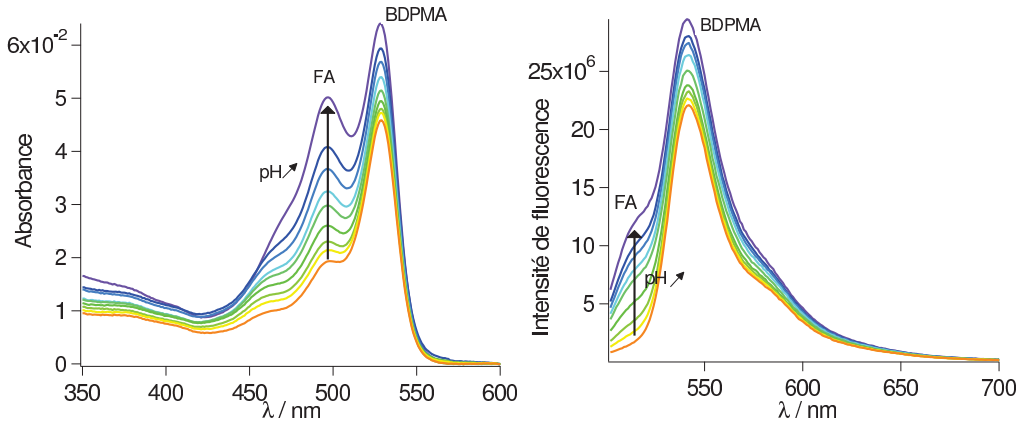


FIGURE 6.14 – Spectres des nanoparticules à couronne PEO-*b*-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,1})_{110}$ (FA/BDPMA : 1/1,7), enregistrés dans l'eau pour des pH allant de 4,4 à 8 (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM). Gauche : absorption. Droite : émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm).

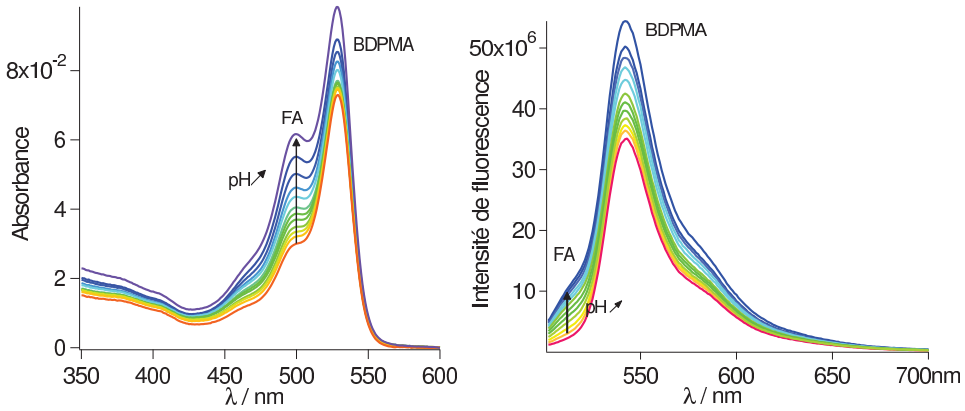


FIGURE 6.15 – Spectres des nanoparticules à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,9})_{160}$ (FA/BDPMA : 1/3,6), enregistrés dans l'eau pour des pH allant de 4,4 à 8 (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM). Gauche : absorption. Droite : émission de fluorescence (λ_{exc} = 495 nm).

Les rendements quantiques de fluorescence des NPFs ont été estimés dans l'eau à pH 8 (TABLEAU 6.9), en excitant les NPFs à 495 nm, *i.e.* en excitant simultanément le BDPMA et la FA. Ils rendent donc compte de l'efficacité de fluorescence de ces deux fluorophores. Pour les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA_{15}, il est de 8 % ($\Phi_{F\ NPFs}$ non greffées = 39%) et pour celles à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ il est de 12 % ($\Phi_{F\ NPFs}$ non greffées = 52%). Cela signifie qu'il y a eu une perte de 75 à 80 % du rendement quantique de fluorescence des NPFs suite au greffage de la FA et de l'éthanolamine. Il a été vu précédemment que

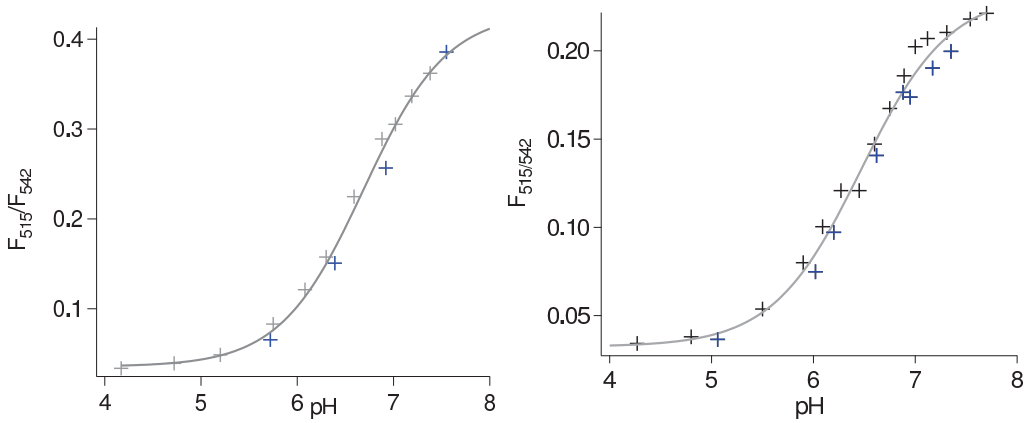


FIGURE 6.16 – Évolution du rapport des bandes d'émission de fluorescence de la FA et du BDPMA (F_{515}/F_{542}, λ_{exc} = 495 nm) en fonction du pH (140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM) et ajustement par l'équation 6.3 (-). Gauche : des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_{1,1}$)$_{110}$ (pH 8 → 4 +, pH 4 → 8 +). Droite : des NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$)$_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_{1,9}$)$_{160}$ (pH 8 → 4 +, pH 4 → 8 +).

les rendements quantique de fluorescence des NPFs greffées FA et éthanolamine étaient d'environ 13 %. Cela pourrait en partie expliquer cette baisse de rendement quantique générale des NPFs. Par ailleurs, au §6.1.3, il a été vu que des NPFs greffées $EtOHNH_2$ seulement présentaient une perte de rendement quantique de 33 % après greffage, et que la seule utilisation de EDC menait à la même perte de rendement quantique. Il se peut donc que la perte de rendement quantique de ces NPFs soit également en partie due à l'utilisation de EDC.

La brillance des NPFs greffées FA a été estimée à l'aide de l'équation 3.3 modifiée pour prendre en compte le nombre de fluorophores BDPMA et FA par particule (n) (pour une excitation à 495 nm, à pH 8) :

$$B = (\varepsilon_{\text{FA 495 nm}} \times n_{\text{FA}} + \varepsilon_{\text{BDPMA 495 nm}} \times n_{\text{BDPMA}}) \times \Phi_{\text{F 495 nm}} \tag{6.4}$$

Les coefficients d'extinctions molaire des fluorophores FA et BDPMA ont été estimés à 495 nm ($\varepsilon_{\text{FA 495 nm}}$ = 87,6 × 10^3L.mol^{-1}.cm^{-1} et $\varepsilon_{\text{BDPMA 495 nm}}$ = 24,8 × 10^3L.mol^{-1}.cm^{-1} à pH 8) et le rendement quantique de fluorescence pris en compte est celui mesuré pour λ_{exc} = 495 nm. On trouve alors pour les deux types de NPFs greffées, une brillance d'environ 1,2 × 10^7 L.mol^{-1}.cm^{-1}. Cette brillance est encore une fois très élevée, malgré le faible rendement quantique des NPFs, et place ces objets parmi les plus fluorescents recensés dans la bibliographie.

Enfin, nous avons essayé de mettre en évidence un transfert d'énergie depuis la FA (donneur) vers le BDPMA (accepteur). Pour cela, les NPFs ont été excitées à 460 nm et la fluorescence mesurée de 500 à 700 nm à pH 7,8. Malheureusement, cette longueur d'onde qui paraissait la plus sélective pour la FA ne l'est pas : le BDPMA est également

Tableau 6.9 – Caractéristiques spectroscopiques des NPs à cœur PS et à différentes couronnes hydrophiles, greffées FA. Mesures réalisées dans l'eau à pH 7,8 ([tampons phosphate/citrate] = 10 mM, [NaCl] = 140 mM).

Exp	couronne	Φ_F	$\overline{\tau}^a_{515}$ ns	$\overline{\tau}^a_{543}$ ns	N^{MET}_{agg}	n^b_{BDPMA}	n^b_{FA}	B $\times 10^7 M^{-1}.cm^{-1}$
G44	PEO-*b*-PAA_{15}	0,08	3,1	1,6	1750	1930	1140	1,2
G48	$P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$	0,12	2,6	1,6	1030	1960	540	1,2

[a] Durées de vies moyennes calculées à l'aide de l'équation 3.2, mesurées pour λ_F = 515 ou 543 nm, avec λ_{exc} = 495 nm. [b] Nombres moyens de fluorophores BDPMA et FA par NPF.

excité. Des spectres d'excitation ont alors été enregistrés pour λ_F = 587, 542 et 515 nm. Là encore, aucune de ces longueurs d'onde n'est sélective d'un fluorophore. Il est donc difficile de conclure sur la présence ou non d'un transfert d'énergie au sein de ces NPFs avec la spectroscopie stationnaire.

Une méthode de choix pour mettre en évidence un transfert d'énergie entre deux chromophores est l'analyse des déclins de fluorescence. En effet, lorsqu'a lieu un phénomène de FRET entre donneur et accepteur, un temps de montée sur les déclins de fluorescence de l'accepteur et une diminution de la durée de vie du donneur sont observés. Cela traduit le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur.

Des mesures de durée de vie de fluorescence ont donc été réalisées sur ces NPFs (Figure 6.17). Ces déclins ont été enregistrés à pH 7,8 pour six types de NPs : les NPFs avant greffage (BDPMA seulement) et après greffage (BDPMA et FA), ainsi que les NPFs greffées FA seulement. Deux longueurs d'onde d'émission de fluorescence ont été utilisées, λ_F = 515 nm et λ_F = 543 nm afin de regarder préférentiellement la FA ou le BDPMA. La longueur d'onde d'excitation est de 495 nm, les deux fluorophores seront donc excités simultanément.

Les déclins n'ayant pas pu être ajustés par une équation satisfaisante, quantitativement seules les durées de vie moyennes (équation 3.2) seront donc comparées (Tableau 6.9).

Les durées de vie des NPFs à cœur PS greffées FA sont similaires à 515 ou 543 nm, ce qui était prévisible dans la mesure où il n'y a qu'une seule molécule fluorescente sur ces objets. Ces déclins sont assez rapides au début puis tendent vers une durée de vie plus longue ($\overline{\tau} \approx$ 2,2-2,7 ns). Cela est certainement dû à la présence d'agrégats de FA dans la couronne des NPFs comme cela a été évoqué précédemment. Pour les NPFs à cœur BDPMA greffées FA, les déclins de fluorescence sont plus difficile à interpréter. À 515 nm, l'allure des déclins est globalement similaire à ceux de la FA. Les durées de vie moyennes pour les NPFs à couronne PEO-*b*-PAA et $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ sont respectivement de 3,1 et 2,6 ns à 515 nm. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles mesurées

pour les NPFs greffées FA et à cœur PS. À 543 nm, les déclins sont plus complexes. Ils sont constitués d'une durée de vie courte provenant certainement de la FA et d'une durée de vie longue qui peut être attribuée au BDPMA. Les durées de vie moyennes de ces deux types de NPFs sont toutes deux de 1,6 ns. Cette diminution de la durée de vie moyenne de fluorescence observée à 543 nm est en adéquation avec la chute de rendement quantique de fluorescence des NPFs avant et après greffage.

Il n'a pas été possible d'observer un temps de montée sur ces déclins à $\lambda_F = 543$ nm, même lorsqu'une fenêtre de 10 ns est utilisée pour l'acquisition. De plus, les durées de vie à $\lambda_F = 515$ nm sont du même ordre de grandeur que celles obtenues sur les NPs non fluorescentes initialement, greffées FA. Il n'est donc pas non plus possible de dire si un transfert d'énergie a lieu de la FA vers le BDPMA avec ces données.

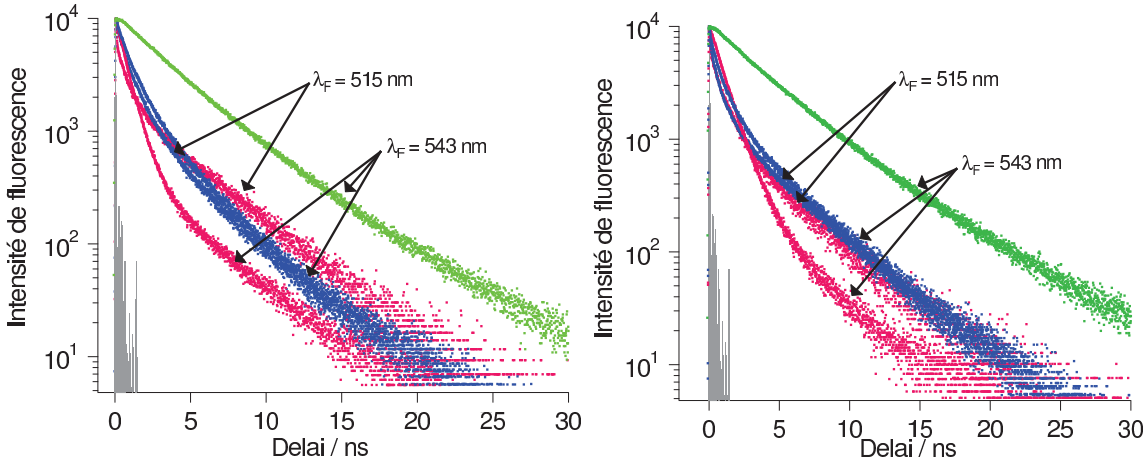


FIGURE 6.17 – Déclins de fluorescence dans l'eau (pH 7,8, 140 mM NaCl, tampons phosphate/citrate 10 mM, $\lambda_{exc} = 495$ nm, $\lambda_F = 515$ nm ou 543 nm). Gauche : des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_{1,1})_{110}$ (-) et des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et à cœur PS (-) ou P(S-*co*-$BDPMA_{1,1})_{110}$ (-) et impulsion laser (-). Droite : des NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ et à cœur P(S-*co*-$BDPMA_{1,9})_{160}$ (-) et des NPs à couronne P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur PS (-) ou P(S-*co*-$BDPMA_{1,9})_{160}$ (-) et impulsion laser (-).

Des nano-senseurs ratiométriques et réversibles de pH ont pu être synthétisés. La gamme d'efficacité de ces senseurs va de pH 5,5 à pH 7,5 avec un pK_a d'environ 6,5. Ces senseurs présentent par ailleurs un très grand nombre de fluorophores par particule. Cela en fait donc des objets intéressants pour l'imagerie en milieu biologique.

6.3 Mesure du pH cellulaire à l'aide des nano-senseurs à base de BDPMA et de Fluorescéinamine

Des cellules cancéreuses HeLa ont été incubées en présence des nano-senseurs à cœur BPDMA et à couronne de type $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ ou PEO-b-PAA_{15} greffées FA. Afin de mesurer le pH intra-cellulaire, pour chaque type de couronne, à même longueur d'onde d'excitation (laser argon, $\lambda_{exc} = 488$ nm), deux images à longueurs d'onde d'émission de fluorescence différentes ($\lambda_F = 517$ nm : FA ou 543 nm : BDPMA) sont enregistrées pour chaque cliché de cellules à analyser. Puis, sur chaque image le fond dû à l'auto-fluorescence des cellules est supprimé et l'image à $\lambda_F = 517$ nm est divisée par celle à $\lambda_F = 543$ nm. Ces clichés seront par la suite nommés "clichés-pH".

Par ailleurs, une échelle de calibration de pH est réalisée en préparant des solutions de NPFs à différents pH et en les observant sous microscope aux deux longueurs d'onde d'émission de fluorescence. L'ajustement des points expérimentaux est réalisé avec l'équation 6.3 en fixant le pK_a de chaque type de NPFs (Figure 6.18).

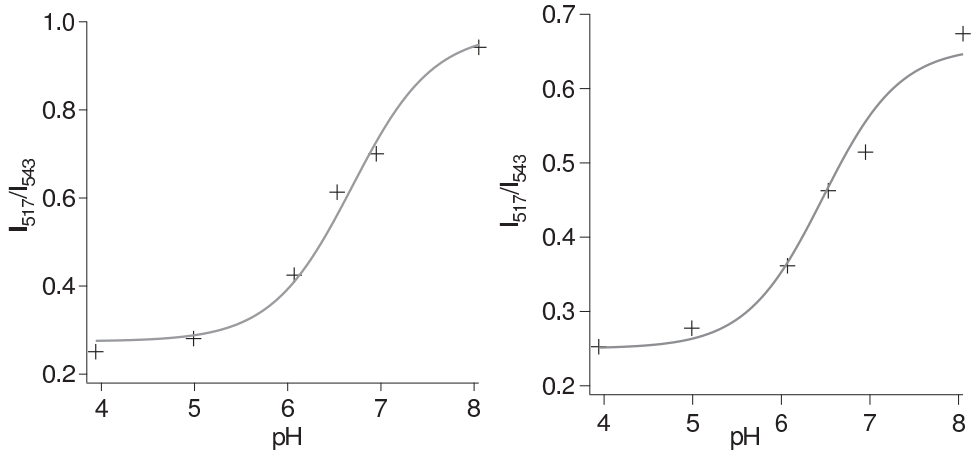


Figure 6.18 – Échelles de pH enregistrées sous microscope optique, points expérimentaux (+) et ajustements par l'équation 6.3 en fixant le pK_a pour chaque type de NPFs. Gauche : NPs à couronne PEO-b-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,1})_{110}$ (pK_a = 6,69). Droite : NPs à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,9})_{160}$ (pK_a = 6,47).

À l'aide de cette calibration de pH réalisée pour chaque type de NP, il est possible de déterminer le pH sur les "clichés-pH". Ces cartographies de pH en milieux biologiques sont présentées Figure 6.19 pour les NPs à couronne PEO-b-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et Figure 6.20 pour les NPs à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,9})_{160}$. D'une manière générale, quel que soit le type de couronne greffée, il est encore une fois difficile de conclure à une simple adsorption des NPFs sur la surface des cellules ou à une internalisation.

Le pH mesuré par le rapport des intensités de fluorescence varie de 6,3 à 7,5 pour les deux types de NPs, sachant que les cellules sont en présence de tampon PBS 1 × (pH

7,4). Le pH est donné à $\pm$0,2 unités, en raison de l'erreur faite lorsque l'auto-fluorescence des cellules est soustraite des clichés (la frontière entre bruit et auto-fluorescence est assez subjective). Les pH mesurés paraissent donc réalistes dans la mesure où les cellules cancéreuses sont généralement acides ($6 < \text{pH} < 7{,}2$) à cause de l'acide lactique qu'elles produisent [368]. Les valeurs de pH inférieures à 5,5 sont à considérer avec précaution car la fluorescence de la FA à 517 nm est difficilement mesurable et donc l'erreur faite sur la mesure assez grande.

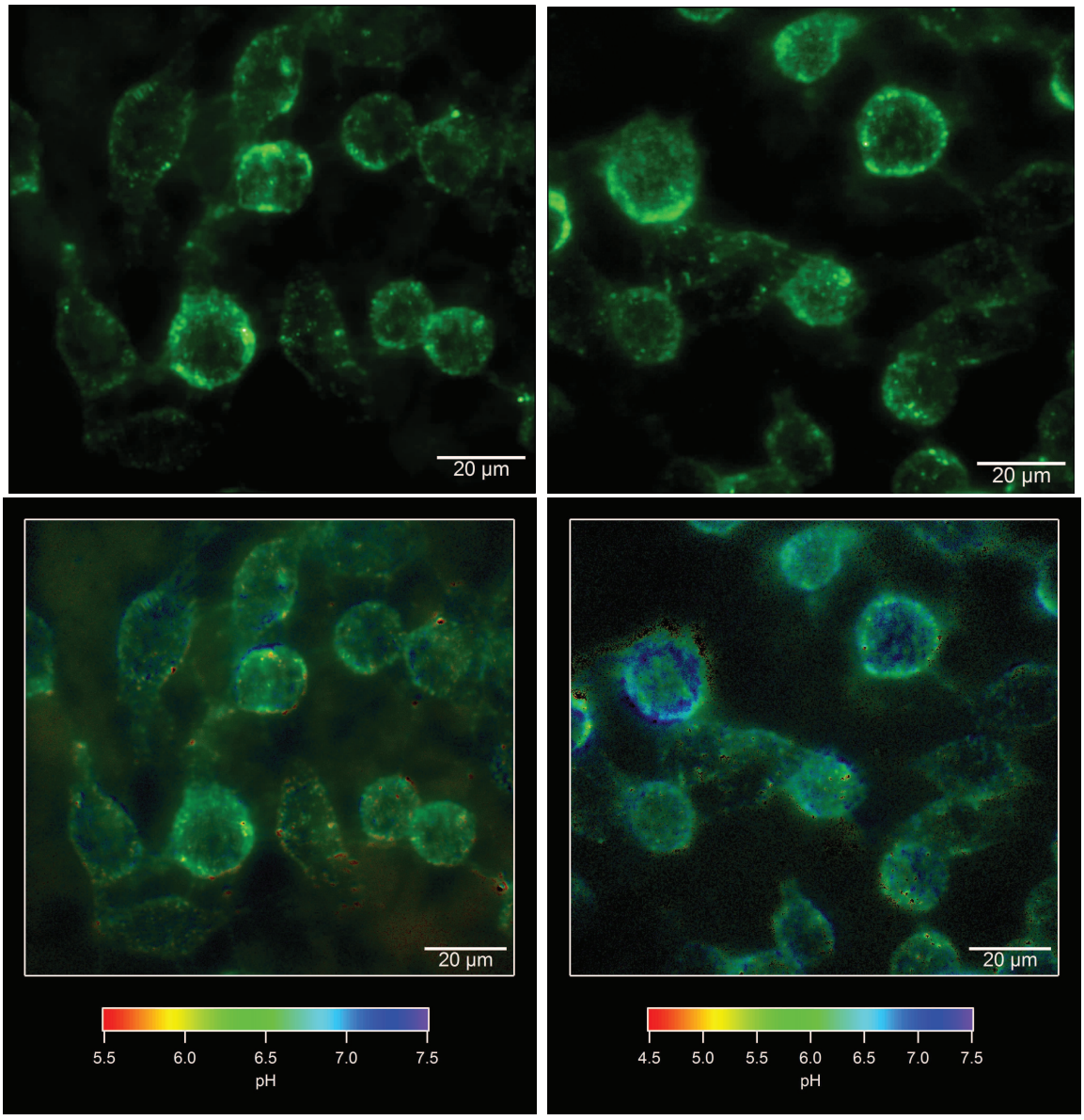


FIGURE 6.19 – Cellules HeLa incubées en présence des NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,1})_{110}$ (images de deux positions différentes sur le même échantillon). Haut : émission de fluorescence (images colorisées artificiellement). Bas : "clichés-pH".

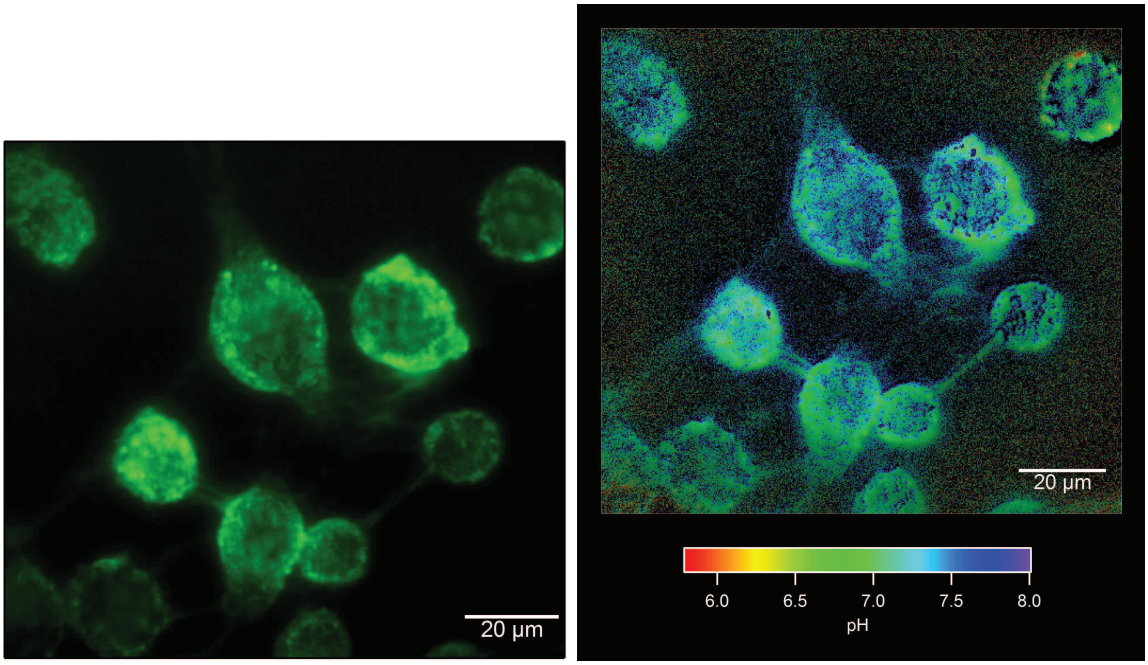


FIGURE 6.20 – Cellules HeLa incubées en présence des NPs à couronne $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ greffées FA et éthanolamine et à cœur $P(S\text{-}co\text{-}BDPMA_{1,9})_{160}$. Gauche : émission de fluorescence (images colorisées artificiellement). Droite : "clichés-pH".

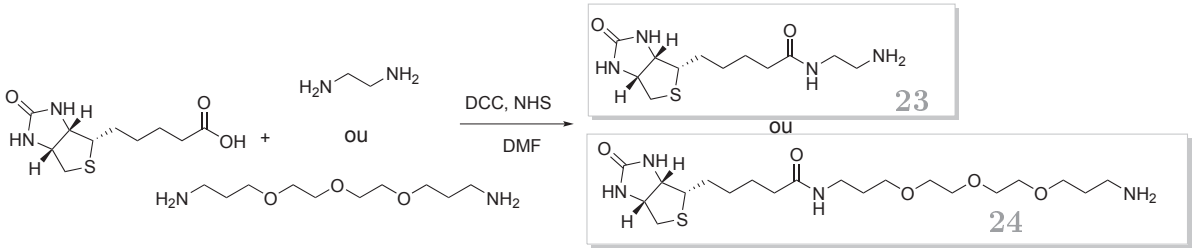
Les NPs cœur/couronne présentant une sonde fluorescente mesurant le pH (FA) et une sonde fluorescente inerte (BDPMA) peuvent mesurer le pH dans des milieux biologiques. Ces NPFs pourraient donc être utilisées par les biologistes pour mesurer des variations de pH. Il serait intéressant de compléter cette étude par des tests de toxicité des NPFs sur des cellules.

6.4 Fonctionnalisation par des molécules cibles en biologie : greffage de dérivés de la biotine

Dans l'optique de réaliser des objets fluorescents pour l'imagerie médicale, il peut être intéressant de fonctionnaliser la surface des NPFs par des molécules cibles en biologie. Ce type de NPFs équipées de molécules d'intérêt doit alors pouvoir se fixer préférentiellement sur des molécules hôtes et ainsi permettre le marquage de certains compartiments cellulaires, ou zones d'activités en biologie. À ce titre, nous avons choisi de greffer la biotine sur nos NPFs.

La biotine (SCHÈME 6.10), ou vitamine B8, est une molécule naturelle découverte en 1916 par Bateman. Elle est composée d'un groupement urée, d'un cycle tétrahydrothiophène et enfin d'une chaîne latérale acide valérique. La biotine est particulièrement connue pour le complexe qu'elle peut former avec la streptavidine, cette dernière étant une protéine tétramère de 52,8 kDa. La constante de dissociation du complexe biotine-streptavidine est de l'ordre de 10 à 15 mol/L, ce qui en fait une des interactions non-

covalentes les plus fortes. Nous avons pensé utiliser ce complexe afin de voir si une petite molécule (biotine) greffée à la surface des nanoparticules pouvait reconnaître une surface spécifique (surface décorée de streptavidine). Avant de pouvoir être greffée, la biotine doit être modifiée en amine. Néanmoins, la taille de l'espaceur entre la biotine et la fonction amine est très importante [369]. En effet, pour que le complexe biotine-streptavidine puisse se faire, il faut que l'ensemble de la biotine puisse pénétrer dans la streptavidine, tous les groupements fonctionnels de la biotine devant être reconnus. Ainsi, nous avons entrepris la synthèse de deux dérivés de la biotine possédant deux tailles d'espaceurs (Schème 6.10).



Schème 6.10 – Synthèse de dérivés de la biotine à fonction amine.

La synthèse du composé **23** a été réalisée selon des protocoles décrits dans la littérature [370, 371]. L'analyse de la molécule obtenue est difficile par RMN du ^{1}H dans le D_2O ou dans la plupart des solvants polaires deutérés. Une caractérisation par chromatographie sur couche mince (1-propanol : acide acétique : eau, 80 : 8 : 12) présente une tache de rapport frontal 0,18, positive à une révélation à l'iode et à la ninhydrine (présence d'amine). Une analyse par spectrométrie de masse montre la formation du dimère de la biotine et non de la molécule attendue (**23**). Le composé **24** a été synthétisé en parallèle en adaptant le protocole utilisé pour la synthèse de la biotinamine **23** et un protocole issu de la littérature [372]. Ce composé n'a pas non plus pu être caractérisé avec succès par RMN. Nous pensons que cette molécule s'est également dimérisée.

Ce type de biotine à fonction amine est commercialisée mais à un prix très élevé.

Une autre approche a ensuite été abordée pour le greffage de la biotine sur les NPs polymères. Dans le §6.1.2, il a été vu que des NPs à couronnes PEO-*b*-PAA_{19} et $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ couvertes d'éthylènediamine et de $PEO_3(NH_2)_2$ pouvaient être obtenues. Nous estimerons l'efficacité de ce greffage similaire à celui de l'éthanolamine (*i.e.* $\approx$ 60 %). La biotine à fonction acide carboxylique a ainsi été directement greffée sur ces NPFs à fonctions amines. Le rendement de ce greffage n'a pu être déterminé mais, même si la biotine se greffe dans les mêmes proportions que la FA par exemple, il devrait au minimum y avoir 500 biotines par particules. Quatre types de NPs greffées biotine ont ainsi été obtenues : couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$, chacune couverte de biotine et de $Et(NH_2)_2$ ou $PEO_3(NH_2)_2$ résiduels.

Afin de voir si une reconnaissance biotine/streptavidine était possible, des NPs d'or

couvertes de streptavidine [3] ont été incubées en présence des quatres types de NPs greffées biotine dans les mêmes conditions que Kodaka et coll. [373]. Typiquement, 10 μL de NPs polymères à 0,6 wt % sont mélangées à 20 μL de NPs d'or et 200 μL de tampon PBS puis le mélange est placé sous agitation lente durant une semaine à 4°C.

Les dispersions issues de cette réaction ont ensuite été caractérisées par MET (Figure 6.21, Figure 6.22). Les NPs d'or apparaissent sous la forme de petits points noirs de très bon contraste et de 10 nm de diamètre et les NPs polymères sous la forme d'objets sphériques grisés d'environ 40-50 nm de diamètre. Des cristaux de sels en grand nombre sont observés sur ces clichés de MET à cause de la présence de tampons dans les milieux analysés.

La Figure 6.21 présente les NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} greffées biotine avec les deux types d'espaceurs ($PEO_3(NH)_2$ et $EtNH_2$). Pour les NPs à lien $EtNH_2$, environ 25 % des NPs d'or-streptavidine semblent être adsorbées aux NPs polymères-biotine. Dans le cas du lien plus long $PEO_3(NH)_2$, environ 20 % des NPs d'or semblent être adsorbées. Malheureusement, un blanc des expériences (NPs polymères sans biotine incubées en présence de NPs d'or-streptavidine) montre également une adsorption des NPs d'or sur les NPs polymère. Il est est donc difficile de conclure à un couplage biotine-streptavidine entre les NPs polymères et les NPs d'or.

Dans le cas des NPs à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ greffées biotine avec un lien $EtNH_2$, aucune interaction spécifique n'a pu être observée avec les NPs d'or (Figure 6.22). Quelques interactions sont visibles lorsqu'un lien $PEO_3(NH)_2$ est utilisé sur les NPs polymères-biotines, mais rien de significatif.

Il n'a pas été possible de mettre clairement en évidence un couplage spécifique biotine-streptavidine entre les NPs polymères et les NPs d'or. Cela peut être dû à la présence des groupements PEO linéaires ou en brosse à la surface des NPs empêchant l'adsorption de protéines à la surface des NPs. Il semble néanmoins que les NPs couvertes de brosses de PEO sont moins sujettes à l'adsorption de la streptavidine.

3. NPs Au Sigma-Aldrich référence S9059 SIGMA : D = 10 nm, 2,5 A_{520}unités/mL dans tampon PBS 0,01 M, pH 7.2, contenant 1% de BSA, 2% de glycerol, et 15 mM d'une solution de NaN_3.

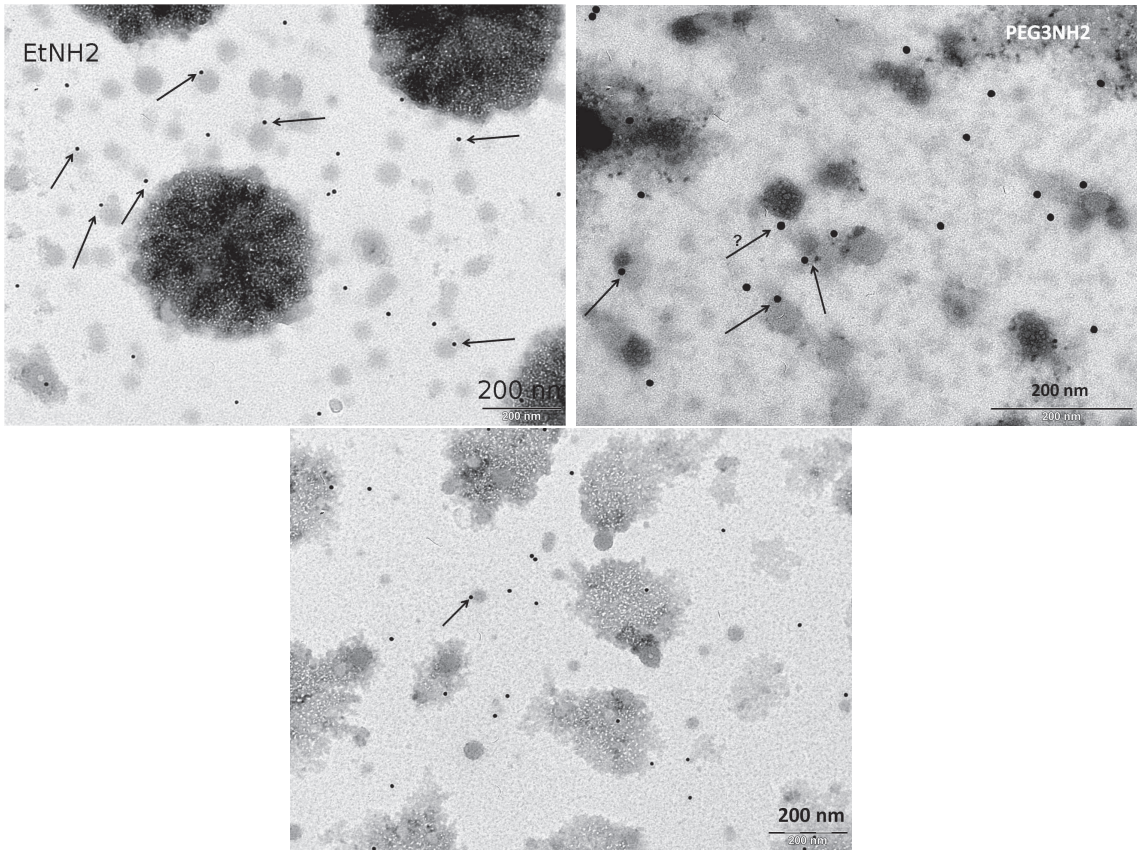


FIGURE 6.21 – Clichés de MET obtenus après incubation des NPs d'or-streptavidine avec les NPs à couronne PEO-*b*-PAA greffées biotine présentant différents liens entre la biotine et l'AA. Gauche : $EtNH_2$. Droite : $PEO_3(NH)_2$. Bas : NPs greffées $EtNH_2$ mais sans biotine. Les flèches représentent les possibles complexes NPs or-streptavidine/NPs polymères-biotine.

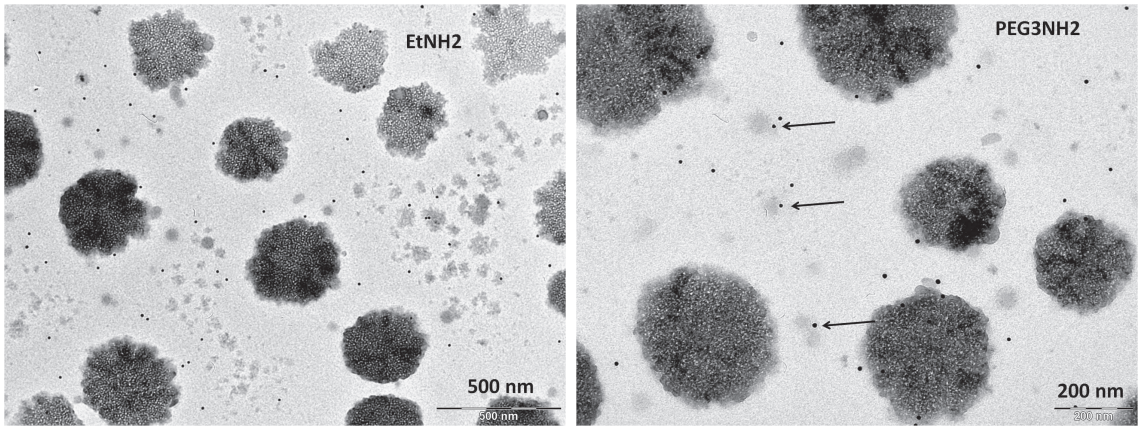


FIGURE 6.22 – Clichés de MET obtenus après incubation des NPs d'or-streptavidine avec les NPs à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ greffées biotine présentant différents liens entre la biotine et l'AA. Gauche : $EtNH_2$. Droite : $PEO_3(NH)_2$. Les flèches représentent les possibles complexes NPs or-streptavidine/NPs polymères-biotine.

6.5 Fonctionnalisation par des protéines

Un autre approche dans l'élaboration de marqueurs spécifiques pour une application en biologie consiste à couvrir les NPs de protéines. Les exemples de couplage polymères/protéines sont nombreux comme en atteste une revue relativement récente [374]. Généralement les protéines sont greffées aux acides carboxyliques *via* les fonctions amines primaires de certains acides aminés comme la lysine.

6.5.1 Greffage d'albumine de sérum bovin

Dans un premier temps, nous avons essayé de greffer de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme protéine modèle sur des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA_{15}. Cette protéine de 66 kDa mesure environ 4 nm de diamètre dans l'eau. Deux greffages ont été réalisés, en mettant 1 BSA pour 10 chaînes de PEO-*b*-PAA ($n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 10 : 1) ou 1 BSA par chaîne de PEO-*b*-PAA ($n_{\text{chaînes NPFs}}$:BSA = 1 : 1). Les expériences sont réalisées dans les conditions classiques de greffage (cf. §6.1.1) et purifiées par dialyse sur pores 300 kDa pendant une semaine à 4°C.

Les couplages ont tout d'abord été caractérisés par le test de Bradfort, un test colorimétrique caractéristique des protéines. Il est basé sur le changement de couleur du bleu de Coomassie dont le maximum d'absorption est déplacé de 465 nm à 595 nm après complexation avec une protéine [375]. Après l'établissement d'une droite d'étalonnage pour la protéine d'intérêt, il est possible de déterminer la concentration en protéines dans la solution à analyser.

Pour le greffage de la BSA dans les conditions les plus diluées ($n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 10 : 1), la concentration après dialyse est de 0,9 g/L. Pour l'échantillon le plus concentré ($n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 1 : 1), la concentration après dialyse est de 1,0 g/L. Il semble donc que, quelle que soit la quantité de BSA introduite lors du greffage, la quantité de BSA après dialyse soit similaire. Cette méthode permet de quantifier la BSA mais ne permet pas de conclure à un greffage covalent ou à une simple adsorption de la BSA sur les NPs polymères. En effet, bien que les NPs soient couvertes de PEO, leur couronne hydrophile contient également du PAA. Or, il est connu que la BSA a une forte affinité avec ce polyélectrolyte [343].

L'électrophorèse sur gel est une méthode de caractérisation et de séparation de choix pour l'analyse des protéines. Il s'agit de faire migrer une solution de protéines dénaturées déposées dans un tampon aqueux par l'application d'un champ électrique. Les protéines les plus grosses migreront le plus lentement, elles sont donc observées le plus près du dépôt dans le puits. Des chaînes polymères greffées par des protéines peuvent être analysées par cette technique en comparant la signature de la protéine seule à celle de la protéine greffée (qui migre plus lentement) [376, 377]. Les NPs fluorescentes greffées BSA ont ainsi été

analysées par électrophorèse sur gel de type SDS-PAGE [4].

La FIGURE 6.23 présente le gel d'électrophorèse après migration et révélation par du bleu de Coomassie. L'analyse des puits 3, 4 et 5 montre que la BSA migre sur le gel au niveau attendu, malgré un co-dépôt avec des NPFs, et que les NPFs ne migrent pas sur le gel. De plus, ce test révèle que les NPFs sont colorées par le bleu de Coomassie. Cette coloration est problématique car nous aurions souhaité que seuls les puits où les NPFs greffées BSA soient colorés en bleu par la présence de la BSA greffée. Il ne sera donc pas possible de discriminer par cette coloration les NPs non greffées des NPs greffées. Les puits 7 et 11 permettent de mettre en évidence la présence de BSA libre avant dialyse des NPFs "greffées". Les puits 13 et 15, concernant les NPFs "greffées" BSA, respectivement pour $n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 1 : 1 et $n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 10 : 1, montrent que, malgré la dialyse, il reste de la BSA libre. Les puits contenant les NPFs "greffées" et la BSA (7, 9, 11, 13, 15) semblent colorés d'une manière plus significative que les puits 4 et 5. Cela signifie que la quantité de BSA estimée par le test de Bradford correspond à de la BSA libre en solution et/ou adsorbée aux NPFs ainsi que certainement à de la BSA liée de manière covalente aux NPFs.

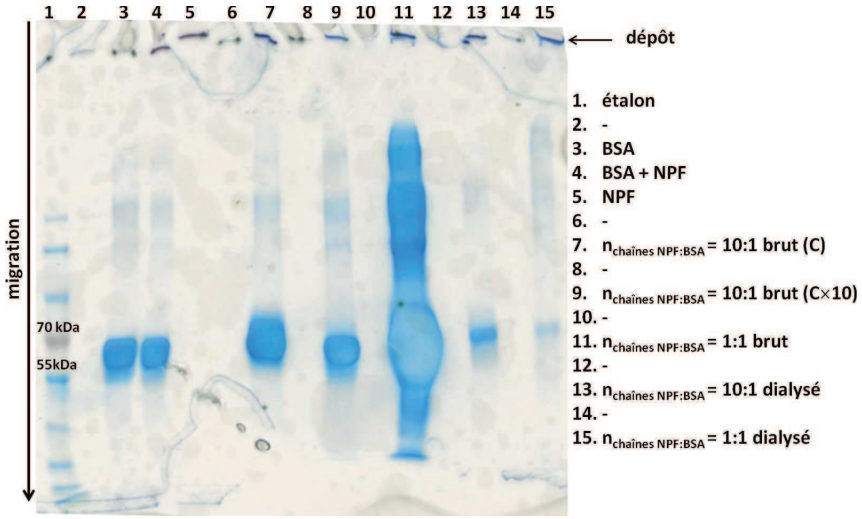


FIGURE 6.23 – SDS-PAGE des NPFs à couronne PEO-*b*-PAA_{15} "greffées" BSA ($n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 1 : 1 et $n_{\text{chaînes NPFs}}$: BSA = 10 : 1), révélé par du bleu de Coomassie.

Afin de pouvoir conclure d'une manière plus affirmée au greffage de protéines sur les NPFs, nous avons envisagé la stratégie inverse, *i.e.* greffer une protéine fluorescente sur des NPs polymères non fluorescentes.

4. Gel SDS-PAGE, 4 % de polyacrylamide, tampon d'analyse pH 8, 130 V, ≈ 60 min.

6.5.2 Greffage de la protéine anti-IgG marquée par un fluorophore

La protéine fluorescente anti-IgG de la souris marquée par le fluorophore Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, dans l'eau : λ_{abs} = 495 nm, λ_F = 519 nm) a été choisie comme protéine fluorescente. Il s'agit de l'anti-corps de l'immunoglobine (IgG) de la souris. Elle est constituée de quatre brins, dont 2 chaînes dites lourdes (50 kDA) et deux chaînes dites légères (25 kDa). Cette protéine fluorescente a ainsi été "greffée" à des NPs polymères à cœur PS seul et couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ dans les mêmes conditions que la protéine BSA. Ainsi, l'analyse des gels d'électrophorèse devrait permettre, par une révélation de fluorescence, de discriminer plus facilement les protéines greffées des protéines adsorbées sur les NPs.

Le gel d'électrophorèse [5] est présenté FIGURE 6.24. L'analyse des puits 1, 2 et 4 montre que la protéine seule ou en présence de NPs migre de la même manière. Les puits 6 et 8 correspondent respectivement aux NPs à couronne $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ "greffées" avant et après dialyse. Là encore, les gels montrent qu'il reste des protéines libres ou adsorbées après dialyse. Néanmoins, la signature de la protéine a changé comparativement à celle de la protéine non greffée (puits 1 et 2 et 4) : il n'y a plus de constituants de faible masse molaire de la protéine après migration. Il est possible que l'emploi de EDC ait réticulé les protéines sur elles-même ou entre elles par réaction entre acides aminés. Les même observations peuvent être faites sur les puits 10 et 11 correspondants au greffage de la protéine fluorescente sur les couronnes des NPs de type PEO-*b*-PAA.

Pour ces deux types de greffage, il est encore une fois difficile par simple lecture du gel d'électrophorèse de conclure à l'efficacité du greffage.

Afin de quantifier le greffage, l'intensité de fluorescence respective de quatre bandes caractéristiques des gels a été comparée (FIGURE 6.25). La bande 4 correspond aux NPs greffées par la protéine fluorescente et les bandes 1, 2 et 3 à une signature de la protéine libre. L'intensité de la bande 4 est quasiment nulle pour les puits 1, 2 et 4, ce qui signifie que la protéine fluorescente, même en présence de NPs, ne reste pas dans le puits de dépôt. En revanche, pour les NPs greffées, la bande 4 est plus intense dans les puits 6, 8, 10 et 12. Il est donc possible qu'une partie des protéines soient greffées. L'intensité des bandes 2 et 3 augmente significativement dans le cas où la protéine a subi l'étape de greffage sur les NPs. Cela pourrait être dû, comme cela a été évoqué plus tôt, à une "réticulation" des protéines entre elles ou sur elles-mêmes.

Il est donc possible de greffer des protéines sur les NPs à couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$. Cependant, l'étape de purification des NPs après greffage reste à améliorer. Une méthode par ultra-centrifugation est peut être envisageable. Enfin, avant

5. Gel commercial SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium) Mini-Protean Biorad, 7,5 % de poly(acrylamide), tampon d'analyse 6× Laemmli, 200 V, 30 min.

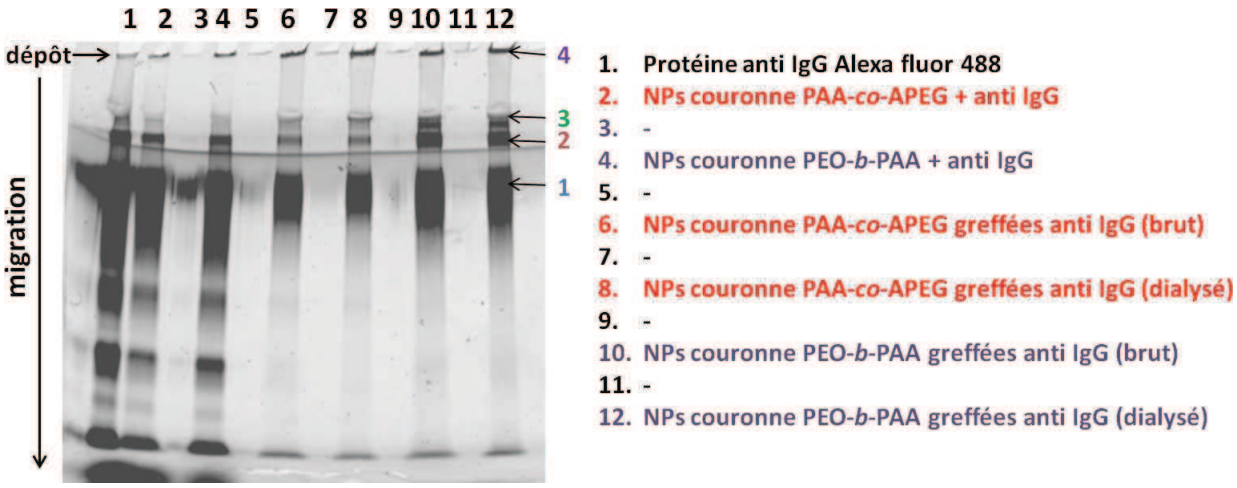


FIGURE 6.24 – SDS-PAGE des NPFs à cœur PS et à couronne PEO-*b*-PAA_{19} ou $P(AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5})_{22}$ "greffées" par la protéine fluorescente anti-IgG de la souris marquée par le fluorophore Alexa Fluor®488. Révélation par analyse de fluorescence réglée sur le maximum d'émission de fluorescence de l'Alexa Fluor®488. Les numéros 1, 2, 3 , 4 correspondent aux bandes analysées FIGURE 6.25.

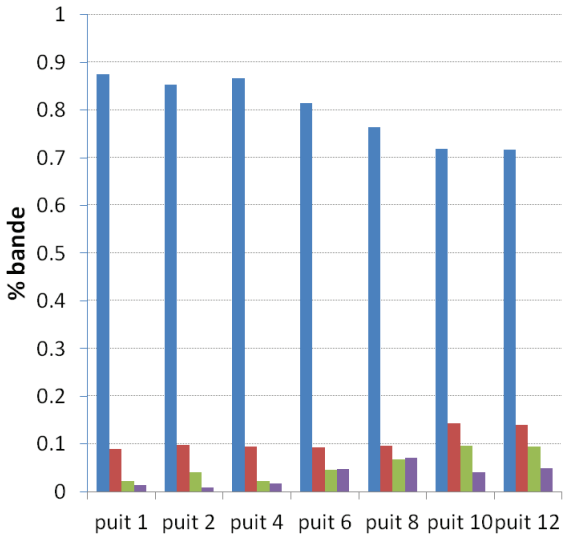


FIGURE 6.25 – Comparaison des intensités de fluorescence de différentes bandes du gel d'électrophorèse de la FIGURE 6.24 (4 : NPs greffées par la protéine, 1, 2 et 3 : signatures spécifiques de la protéine libre).

toute utilisation en milieu biologique, il faudrait vérifier la non-dénaturation des protéines par la méthode de greffage employée.

6.6 Conclusion

Á travers ce chapitre il a été vu que les NPs à cœur PS ou P(S-*co*-BDPMA) et à couronne PEO-*b*-$PAA_{\approx 10}$ ou $P(AA_{0,5}\text{-}co\text{-}APEO_{0,5})_{22}$ pouvaient être fonctionnalisées par une molécule à fonction amine.

Ces molécules peuvent notamment être des fluorophores dont la fluorescence varie avec le pH. Dans ce cas, des senseurs de pH ratiométriques ont pu être synthétisés en greffant de la Fluorescéine à la surface de NPs à cœur BDPMA copolymérisé au styrène. Ces senseurs présentent une brillance très intéressante et ont pu être utilisés avec succès pour cartographier le pH de cellules cancéreuses.

Il serait intéressant de fonctionnaliser la surface de NPFs similaires avec des senseurs de métaux ou de pesticides afin d'obtenir des senseurs plus élaborés.

Enfin, la surface des NPFs a été fonctionnalisée avec une biotine, molécule pouvant former un complexe avec la streptavidine. Malheureusement, il est difficile de conclure à la formation d'un complexe biotine/streptavidine. Il faudrait greffer d'autres molécules sondes afin de tester si ces NPFs peuvent servir de marqueurs en milieux biologiques. Dans ce but, des protéines ont également été greffées à la surface des NPFs. Le greffage de telles macromolécules semble possible mais l'étape de purification afin d'éliminer les protéines non greffées reste à améliorer. Par ailleurs, il faudrait vérifier si les protéines ne sont pas dénaturées suite aux conditions de greffage.

Conclusion générale et perspectives de recherche

L'ensemble de ce travail avait pour but la synthèse et l'étude de NPs polymères fluorescentes à cœur BODIPY et à couronne hydrophile et fonctionnalisable, pour une application principalement en milieu biologique. Dans ce but, une méthode de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT en miniémulsion a été développée et mise au point. Les objets obtenus ont principalement été caractérisés par spectroscopie de fluorescence.

Dans un premier temps, la synthèse de NPs à cœur fluorescent à base de méthacrylate de BODIPY (BDPMA) copolymérisé avec du styrène et à couronne hydrophile PEO-*b*-PAA, par une polymérisation RAFT en miniémulsion, a été mise au point. Toute la difficulté de ce type de synthèse était de réaliser des NPs auto-stabilisées de très faible taille (D $<$ 100 nm), composées de chaînes présentant les caractéristiques d une polymérisation contrôlée. Après optimisation des conditions de synthèse, un procédé "one-pot" a été développé. Les NPs obtenues présentaient une taille inférieure à 100 nm et la polymérisation des chaînes qu'elles contenaient était contrôlée.

Dans le second chapitre, les propriétés spectroscopiques des NPFs synthétisées par le procédé "one-pot" ont été étudiées. Des NPFs contenant environ 5300 BDPMA par particule présentaient un rendement quantique de fluorescence diminué comparativement au fluorophore en solution, mais leur brillance était 100 à 1000 fois supérieure à celle de NPFs classiquement utilisées. L'effet de la concentration en BDPMA au cœur des NPFs a été étudié par spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps. Il s'est avéré qu'en concentrant les BDPMA au cœur des NPFs, il devait certainement y avoir formation d'agrégats peu ou pas fluorescents, jouant le rôle de pièges énergétiques.

Par ailleurs, des études d'anisotropie stationnaire et résolue en temps ont montré que les transferts d'énergie entre fluorophores au sein d'une NPF étaient efficaces quelle que soit la concentration en BDPMA, mais que cette efficacité était tout de même accrue avec l'augmentation de la concentration en BDPMA.

Dans le but de diminuer la formation d'agrégats peu ou pas fluorescents dans le cœur des NPs, la nature du BODIPY polymérisable a été modifiée selon deux approches. La première approche a consisté à synthétiser des BODIPY dont les pyrroles ont été fonctionnalisés par des groupements aromatiques. Ces BODIPY encombrés émettant vers le

rouge ont été copolymérisés avec du styrène, mais seulement en faible proportion. Seules les NPs à cœur BODIPY substitués par des aromatiques méthylnaphtalène ont présenté des caractéristiques intéressantes d'un point de vue efficacité de synthèse (stabilité du BODIPY et conversion en monomères) et spectroscopie de fluorescence (longueur d'onde d'émission de fluorescence, rendement quantique, durée de vie). Il serait intéressant d'optimiser la synthèse de ce type de dérivés BODIPY afin de pouvoir les concentrer au cœur des NPFs.

Une seconde approche a consisté à modifier la nature de la fonction polymérisable portée par le BODIPY. Il a ainsi été possible de moduler la répartition des fluorophores le long de la chaîne de copolymère. Le rendement quantique de fluorescence des NPs obtenues a pu être modifié en changeant la nature du fluorophore mais malheureusement il a été difficile d'établir une corrélation entre la répartition des BODIPY et les propriétés spectroscopiques des NPFs. La brillance des NPFs a tout de même été multipliée par 1,5 en ne faisant varier que la nature de la fonction polymérisable du monomère BODIPY.

La nature de la couronne hydrophile des NPFs a également été changée. Des NPFs d'une taille comprise entre 70 et 100 nm et à couronne de type PAPEO ou P($AA_{0,5}$-*co*-$APEO_{0,5}$) ont ainsi pu être synthétisées par un procédé "one-pot". Toutes ces polymérisations étaient contrôlées. Un comparatif des différentes synthèses a été dressé afin de souligner les critères menant au succès d'une polymérisation en miniémulsion en présence de macro-agents RAFT amphiphiles.

Ces NPFs à différentes couronnes hydrophiles ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence. Étonnamment, la nature de la couronne hydrophile module le rendement quantique de fluorescence des NPFs. Ce phénomène a été attribué à la présence de groupements plus ou moins polaires portés par la couronne hydrophile, à proximité du BDPMA principalement localisé à la surface du cœur fluorescent.

Enfin, dans le but de créer des NPFs à différentes fonctionnalités, des molécules à fonction amine ont été greffées sur la surface des NPFs à différentes couronnes hydrophiles à base d'acide acrylique et d'oxyde d'éthylène. Ainsi, des nano-senseurs de pH ont pu être élaborés en greffant la Fluorescéinamine sur les NPFs. Des cellules cancéreuses ont été incubées en présence de ces objets et la valeur du pH cellulaire a pu être mesuré *in situ* par imagerie de fluorescence.

Des molécules cibles en biologie et des protéines ont également été greffées mais leur reconnaissance spécifique par des molécules hôtes n'a pas pu être prouvée. Dans le cas des protéines, il faudrait certainement améliorer les conditions de greffage et de purification.

Ces NPFs ont fait l'objet de diverses études en collaboration avec deux laboratoires de biologie.

Au Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée (LBPA UMR 8113) de l'ENS

Cachan, ces NPFs ont été étudiées par Bianca Sclavi et Yang Si en présence de bactéries *Escherichia coli*. L'idée de ces travaux est de suivre la dynamique interne des bactéries à l'aide des NPFs. Les mouvements des bactéries sont suivis sur des temps suffisamment longs pour pouvoir permettre d'étudier les processus cellulaires qui caractérisent la capacité d'adaptation des bactéries et leur réponse au stress. Ce sont ces phénomènes d'adaptation qui conduisent à des variations de la vitesse de croissance des bactéries et dans certains cas à leur résistance. Il s'est avéré que suite à une incubation ou à un traitement chimique, les NPFs ne pénétraient pas dans les bactéries. La perméabilisation de la membrane bactérienne par électroporation a permis de marquer les bactéries. Cependant le pourcentage de mort cellulaire est élevé. Il semblerait que la combinaison d'un fort voltage et d'une concentration élevée de NPFs soient délétères pour les bactéries. Par ailleurs, même si les NPFs ont une taille équivalente à trois ribosomes, ce sont de relativement gros objets, difficiles à internaliser. Ces NPFs ayant certainement un trop gros diamètre pour permettre une internalisation par les bactéries, des chaînes de copolymères fluorescentes de type P(AA-*co*-APEO-*co*-BDPMA)-TTC ou P(APEO-*co*-BDPMA)-TTC ont été synthétisées. Cette fois, les bactéries incubées en présence des chaînes fluorescentes en-dessous de leur CMC étaient toutes marquées. Les copolymères étaient présents à l'intérieur des bactéries et pas seulement sur la paroi. À l'aide des fonctions acides présentes sur un des deux types de chaînes, il doit être possible de les fonctionnaliser par des molécules cibles et de les fixer en des endroits spécifiques des bactéries. Ces études préliminaires encourageantes sont poursuivies dans le cadre de la thèse de Yang Si qui s'effectuera au PPSM et au LBPA à partir de la rentrée 2012.

Dans le cadre d'une collaboration avec Marie-Pierre Fontaine-Aupart (ISMO UMR 8214, Orsay) et Romain Briendet et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine (Institut MICALIS, équipe bioadhésion, biofilms), les NPFs développées au PPSM ont été étudiées dans des biofilms par Baptiste Chappaz, étudiant en thèse. Le but du projet est d'étudier les paramètres physico-chimiques des biofilms (intérieur et extérieur des bactéries) afin de comprendre et prévenir leur formation. D'autres NPFs polymères de taille nanométrique (positivement chargées) et des QDs (D $\approx$ 10 nm) sont utilisés en parallèle par l'ISMO. Des tests prélimaires réalisés avec les NPFs du PPSM ont montré que, quel que soit le type de bactéries étudié, les NPs n'avaient pas d'interaction spécifique avec la surface des bactéries, contrairement aux NPs polymères positivement chargées. Cela permettra à terme de pouvoir marquer l'espace inter-bactérien (matrice d'exopolymères secrétés par les bactéries pour former des colonies) avec les particules du PPSM, la surface des bactéries avec les NPs positivement chargées, et le compartiment intra-cellulaire avec les QDs de plus petite taille.

Par ailleurs, Tristan Doussineau et Rodolphe Antoine au Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire (LASIM UMR 5579) de Lyon, dans le cadre d'une collaboration avec Bernadette Charleux du C2P2, ont mis au point la mesure de masses molaires de

NPs polymères par spectrométrie de masse. Les chercheurs du LASIM souhaiteraient développer une détection parallèle en fluorescence afin de corréler masse molaire des objets et propriétés spectroscopiques. Ce travail fait actuellement l'objet d'études préliminaires.

Enfin, ces NPFs pourraient être utilisées dans des cavités laser afin de mettre à profit les propriétés d'émission stimulée du BDPMA. L'équipe de Mélanie Lebental au Laboratoire de Photonique Quantique et Moléculaire (LPQM UMR 8537) de l'ENS Cachan a obtenu un financement auprès de l'Institut d'Alembert de l'ENS Cachan à ce titre.

Chapitre 7 : Partie Expérimentale

7.1 Techniques de caractérisation

7.1.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F et ^{11}B ont été enregistrés sur un spectromètre JEOL ECS (400 MHz) équipé d'une sonde large bande auto-accordable. Les déplacements chimiques sont déterminés en utilisant le Me_4Si comme référence interne (δ = 0 ppm). Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz. Les spectres RMN sont décrits de la façon suivante : déplacement chimique, multiplicité (s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, qt : quintuplet, st : sextuplet, m : multiplet), intégrale, constante de couplage, attribution. Les solvants deutérés proviennent de la société euriso-top.

7.1.2 Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

Contrairement aux méthodes de chromatographie conventionnelle pour la séparation de molécules de faibles masses molaires, le phénomène physique permettant la séparation des différentes macromolécules constituant le polymère n'est pas basé sur l'affinité chimique avec le support, mais simplement sur la taille des macromolécules (leur volume hydrodynamique). En effet, suivant leur taille, les molécules éluées peuvent plus ou moins pénétrer dans les pores du gel poreux rigide (phase stationnaire) dont sont remplies les colonnes. Ainsi, les molécules les plus petites sont davantage retenues que les plus grosses, d'où un temps de rétention plus long pour les premières que pour les secondes. En sortie de colonne, des détecteurs (viscosimètre, photomètre, réfractomètre) fournissent le nombre de macromolécules sortant de la colonne à un instant donné.

Les masses molaires moyennes en nombre M_n, les masses molaires moyennes en masse M_w, ainsi que les indices de polymolécularité ($I_P = M_w/M_n$) ont été déterminés par un appareil de CES dans le THF, muni de deux détecteurs : indice de réfraction (VE 3580 RI de Viscotek) et absorbance (UV-waters 486, $190 < \lambda < 600$ nm). Cet appareil est équipé d'un injecteur automatique Viscotek VE 2001. Les deux colonnes (PLgel Mixed, 7,5 mm x 300 mm, diamètre des pores : 5 μm, gamme de séparation : 200 - 20^6 Da) sont thermostatées à 40°C. Le débit de la pompe est de 1 mL/min. La concentration des échantillons injectés est comprise entre 4 mg/mL et 10 mg/mL. Les masses molaires moyennes obtenues sont issues d'une calibration conventionnelle basée sur un étalonnage

réalisé avec des standards polystyrène provenant de Polymer Laboratories ($M_{n,\,CES}^{PS}$). La concentration des échantillons injectés est d'environ 5 mg/mL. Le logiciel utilisé pour le traitement des chromatogrammes est le logiciel OmniSEC de Viscotek (version 4.6.2).

Méthylation des polymères comportant des fonctions acide carboxylique

Les homo- ou copolymères comprenant des unités acides, comme l'acide acrylique ne peuvent être injectés tels quels dans les colonnes : il faut transformer les fonctions acides carboxyliques présentes dans certains polymères en fonctions ester. Le produit utilisé est le triméthylsilyldiazométhane (TMS) [378]. L'échantillon à analyser est dissous dans un mélange THF/eau. L'eau est nécessaire pour aider à solubiliser le polymère et sa proportion doit être d'autant plus importante que le nombre d'unités acide est grand. Dans le cas où les fonctions acide sont sous forme carboxylate, il est nécessaire d'ajouter une quantité suffisante d'une solution de HCl, de manière à retrouver les fonctions carboxylate sous leur forme protonée, afin que la réaction de méthylation ait lieu. Quelques gouttes de la solution de TMS sont ajoutées dans le milieu réactionnel à température ambiante et un dégagement gazeux (N_2) se produit instantanément. La coloration jaune du milieu s'estompe peu à peu et il est alors nécessaire de rajouter du TMS jusqu'à ce que la coloration jaune persiste et que le dégagement gazeux ait disparu (signe que le TMS a été introduit en excès). La solution est ainsi placée sous agitation durant trois à quatre heures, puis laissée sous évaporation à l'air libre puis à l'étuve. Le polymère séché est directement dissous dans le THF pour être analysé par CES.

7.1.3 Détermination de la conversion des monomères

Par RMN du proton

Lors des synthèses réalisées en milieu homogène (synthèse de macro-agents RAFT typiquement), les conversions molaires des monomères à fonctions styrènes, acrylates, méthacrylates peuvent être déterminées par RMN ^{1}H en utilisant un étalon interne comme le DMF. En effet, en suivant la diminution de l'intégrale des protons de la fonction polymérisable du monomère à analyser par rapport à celle du signal de référence (7,95 ppm - proton de l'amide) entre le moment initial de la polymérisation (t_0, pris au moment où le ballon est placé à chauffer) et un moment t, il est possible de déterminer la conversion molaire du monomère. En pratique, le suivi a toujours été fait en utilisant le $CDCl_3$ comme solvant d'analyse, avec un rapport molaire monomère/DMF = 5. Pour l'acide acrylique par exemple, les protons analysés sont ceux à 6,35, 6,04 et 5,80 ppm.

Par gravimétrie

La gravimétrie est une technique de choix pour déterminer la conversion des monomères volatiles. Le principe de cette méthode repose sur le fait que certains monomères présentent des pressions de vapeur saturante élevées, contrairement aux polymères : ainsi, la formation de polymère conduira à une diminution de la fraction en espèce volatiles.

En pratique, une masse précisément pesée du milieu réactionnel brut (environ 0,2 g) est placée à sécher sous hotte à température ambiante puis dans une étuve à 80°C jusqu'à masse constante. La valeur de l'extrait sec permet d'accéder à la conversion du monomère au moyen de la relation suivante :

$$\chi = \frac{\tau_{\text{polymère}}}{\tau_{\text{monomère}}} = \frac{ES - \tau_{NV}}{\tau_{\text{monomère}}} \tag{7.1}$$

où :

χ	conversion du monomère
$\tau_{\text{polymère}}$	taux de polymère formé expérimental
$\tau_{\text{monomère}}$	taux de monomère initial introduit (masse de monomère à t_0/ masse totale)
ES	extrait sec (proportion de tous les composés non volatiles)
τ_{NV}	taux de composés non volatiles (hors polymère)

Dans notre cas, les conversions du styrène et de l'acide acrylique ont été déterminées par gravimétrie, contrairement à celles des monomères non volatiles comme les dérivés BODIPY ou l'acrylate de PEO.

Par CES à l'aide d'une détection UV-vis.

La conversion des monomères dérivés du BODIPY a pu être déterminée par CES à l'aide d'une détection UV-visible réglée sur la longueur d'onde d'absorption maximale du monomère à analyser ($\lambda = 528$ nm pour le BDPMA). En effet, en comparant les intégrales (calculées sous Igor Pro) correspondant aux signaux du polymère et du monomère, il est possible de déterminer le taux de monomère libre par rapport au taux de monomère ayant polymérisé. Pour cela, l'approximation $\varepsilon_{monom.} \approx \varepsilon_{polym.}$ a été faite. Cette approximation semble acceptable dans la mesure où les BODIPY sont des chromophores connus pour avoir des propriétés photophysiques peu dépendantes de leur environnement. Ainsi, la conversion des monomères dérivés BODIPY peut être calculée avec l'équation suivante :

$$\chi_{BODIPY} = \frac{S_{PBDPMA}}{S_{PBDPMA} + S_{BDPMA}} \tag{7.2}$$

où :

χ_{BODIPY}	conversion du monomère dérivé BODIPY
S_{PBDPMA}	intégration du signal UV-vis. correspondant au signal du BODIPY polymérisé (PBDPMA)
S_{BDPMA}	intégration du signal UV-vis. correspondant au signal du BODIPY n'ayant pas réagi (BDPMA)

Remarque : dans le cas de l'utilisation de la GPC THF, le pic du dérivé BODIPY monomère est donné pour un volume de rétention d'environ 18 mL, et celui du polymère correspondant entre 13 et 16 mL, selon la conversion.

Conversion molaire globale

La conversion molaire globale est donnée par l'équation suivante :

$$X_n = \sum_i \chi_i n_i \tag{7.3}$$

où :

X_n	conversion molaire globale
χ_i	conversion individuelle du monomère i
n_i	fraction molaire du monomère i

Conversion massique globale

La conversion massique globale est donnée par l'équation suivante :

$$X_m = \sum_i \chi_i w_i \tag{7.4}$$

où :

X_m	conversion massique globale
χ_i	conversion individuelle du monomère i
w_i	fraction massique du monomère i

Degré de polymérisation moyen en nombre (DP_n) et masse molaire moyenne en nombre théorique ($M_{\mathrm{n,\ th}}$)

Le degré de polymérisation moyen en nombre et la masse molaire moyenne en nombre théorique sont définis à l'aide des deux équations ci-dessous :

$$DP_n = \sum_i \chi_i \frac{n_{\mathrm{i,\ 0}}}{n_{\mathrm{RAFT}}} \tag{7.5}$$

$$M_{\mathrm{n,\ th}} = M_{\mathrm{n\ RAFT}} + \frac{1}{n_{\mathrm{RAFT}}}(\sum_i \chi_i m_i) \tag{7.6}$$

où :

DP_n	degré de polymérisation moyen en nombre
χ_i	conversion individuelle du monomère i
$n_{i,0}$	nombre de moles initiales en monomère i
n_{RAFT}	nombre de moles du (macro)agent de transfert
$M_{\mathrm{n,\ th}}$	masse molaire moyenne en nombre théorique
$M_{\mathrm{n\ RAFT}}$	masse molaire (moyenne en nombre) du (macro)agent de transfert
χ_i	conversion individuelle du monomère i
m_i	masse du monomère i

Dans le cas où une perte de styrène par évaporation est constatée suite à l'étape de sonification (typiquement perte de 25 %), le degré de polymérisation moyen en nombre du bloc polystyrène peut s'exprimer sous la forme :

$$DP_n = \frac{[\mathrm{S}]_0}{[\mathrm{RAFT}]_0} \times (1 - P_S) \times \chi_{\mathrm{S\ corrigée}} \tag{7.7}$$

où :
- $[S]_0$ concentration molaire en styrène initiale
- $[RAFT]_0$ concentration molaire en (macro-)agent RAFT initiale
- P_S perte en styrène, typiquement de 25 %
- $\chi_{S\ corrigée}$ conversion en styrène corrigée de la perte par évaporation

Le nombre d'unités monomères BODIPY par chaîne de copolymère peut être évalué par :

$$n_{BODIPY} = \frac{[BODIPY]_0}{[RAFT]_0} \tag{7.8}$$

où :
- $[BODIPY]_0$ concentration molaire en monomère BODIPY initiale
- $[RAFT]_0$ concentration molaire en (macro-)agent RAFT initiale

7.1.4 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés à la plateforme CNRS Imagif (spectromètre Waters) ou au centre régional de mesures physiques de l'ouest (spectromètre Varian Mat 311).

7.1.5 Microanalyse élémentaire

Les mesures de microanalyse élémentaire de l'oxygène, de l'azote et du soufre ont été réalisées au service de microanalyse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette. Avant toute analyse, les nanoparticules polymères sont purifiées par dialyse puis lyophilisées. Pour doser ces trois éléments, environ 15 mg de polymère purifié doivent être fournis. Les valeurs sont données à $\pm$ 0,30 %.

7.1.6 Points de fusion

Les points de fusion des molécules synthétisées ont été mesurés sur un banc Kofler et ne sont pas corrigés.

7.1.7 Potentiel Hydrogène

Les mesures de pH ont été réalisées à l'aide d'une électrode de verre combinée, reliée à un pH-mètre PHM210 de Meterlab.

7.1.8 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les nanoparticules polymère ont été analysées par microscopie électronique à transmission par Mme Patricia Beaunier (service de microscopie électronique de l'UPMC). Les clichés de microscopie ont été réalisés sur un microscope électronique à transmission JEOL

JEM CX II UHR opérant à 100 keV et équipé d'une caméra CCD Keen View (Soft Imaging System - Olympus). Les échantillons à analyser sont déposés sur une grille carbonnée après dilution dans l'eau.

7.1.9 Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière permettent de déterminer le rayon hydrodynamique de nanoparticules dans un solvant. Le principe repose sur la mesure des fluctuation d'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps ; ces fluctuations résultent du mouvement brownien des objets et permettent d'estimer un coefficient de diffusion. Ainsi, la fonction d'auto-corrélation $g(\tau)$ de l'intensité de diffusion est tracée selon l'équation suivante :

$$g(\tau) =< I(t) \bullet I(t+\tau) > \tag{7.9}$$

Pour calculer g, l'intensité de diffusion est découpée en intervalles de temps τ suffisamment petits pour que $I(t)$ varie peu. Les fluctuations rapides de l'intensité de diffusion sont attribuables à des petites particules qui se déplacent rapidement alors que les fluctuations lentes correspondent à de grosses particules. Dans le cas d'échantillons **monodisperses**, la fonction d'auto-corrélation peut être ajustée grâce à la méthode des cumulants :

$$g(\tau) = A(1 + Be^{-2Dq^2\tau}) \tag{7.10}$$

où :

D	coefficient de diffusion
q	vecteur d'onde
τ	temps d'échantillonage
A	ligne de base de la fonction d'autocorrélation
B	intersection de la fonction avec l'axe des ordonnées

Le vecteur d'onde est défini par :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} sin(\frac{\theta}{2}) \tag{7.11}$$

où :

λ	longueur d'onde du laser
θ	angle d'observation
n	indice de réfraction du solvant

Enfin, en ajustant le logarithme de la fonction d'auto-corrélation par un polynôme du second degré, il est possible de remonter à un coefficient de diffusion moyen (pente de la droite), ainsi qu'à un indice de polydispersité (σ, écart de la droite ajustée à la fonction mesurée). Le coefficient de diffusion et l'indice de polydispersité ainsi calculés sont basés sur des résultats en intensité et non en nombre ou en masse.

Une fois le coefficient de diffusion évalué par cette méthode, il est possible de déterminer le rayon hydrodynamique des nanoparticules à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein :

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \tag{7.12}$$

où :

D	Coefficient de diffusion
k_B	constante de Boltzmann ($= 1{,}38 \times 10^{-23}$J.K^{-1})
T	température
η	viscosité du solvant
r	rayon hydrodynamique de la particule

Deux types d'appareils ont été utilisés, selon le laboratoire où ont été effectuées les analyses :

- **Malvern, Zeta Sizer Nano S90** (LCP, UPMC). Laser He-Ne (4mW) à 633 nm, 90°. Le calcul des diamètres hydrodynamiques (D_z) et des indices de polydispersité (σ) est effectué à l'aide du logiciel NanoDTS en utilisant un modèle de latex de polystyrène.
- **Cordouan Technologies, VASCO-1** (PPSM, ENS Cachan). Diode laser (15mW) à 658 nm, 135°. Le calcul des diamètres hydrodynamiques (D_h) est effectué à l'aide de logiciel Rean de Cordouan Technologies.

Dans tous les cas, les échantillons de nanoparticules dans l'eau ont été analysés à une concentration d'environ 0,01% en masse, à 20°C, sans être filtrés au préalable (sauf lorsque cela est précisé dans le texte). Les deux types d'appareils donnant les mêmes résultats, l'un ou l'autre peut être utilisé pour la détermination des diamètres hydrodynamiques des nanoparticules. Les diamètres hydrodynamiques sont déterminés avec une erreur d'environ 5 %.

7.1.10 Diffusion statique de la lumière (DSL)

La diffusion statique de la lumière est une méthode d'analyse de choix lorsque l'on veut déterminer le rayon de giration et le second coefficient du viriel de latex de polymères, ainsi que leur masse molaire moyenne en masse (et donc leur nombre d'agrégation). Tout comme en diffusion dynamique de la lumière, une solution diffusante de nanoparticules est éclairée par une source lumineuse telle qu'un laser. Contrairement à la DDL, ce ne sont pas les fluctuations d'intensité dans le temps qui sont mesurées, mais l'intensité moyenne diffusée. Si la taille des nanoparticules est petite devant la longueur d'onde du laser, la diffusion est de type Rayleigh.

La relation générale permettant de déterminer les paramètres moléculaires des particules étudiées est l'équation de Rayleigh :

$$\frac{Kc}{R_\theta} = (\frac{1}{M_w} + 2A_2c)(1 + \frac{q^2R_g^2}{3}) \tag{7.13}$$

où :

R_θ	rapport de Rayleigh (cm^{-1})
c	concentration en polymère ($g.cm^{-3}$)
A_2	second coefficient du viriel ($cm^3.mol.g^{-2}$)

M_w	masse molaire moyenne en masse des objets diffusants ($g.mol^{-1}$)
q	vecteur d'onde (nm^{-1}, équation 7.11)
R_g	rayon de giration (nm)
K	constante optique ($cm^2.mol.g^{-2}$, équation 7.14)

La constante optique est donnée par :

$$K = \frac{4\pi^2 n_{réf}^2 (\frac{dn}{dc})^2}{\lambda_0^4 N_A} \tag{7.14}$$

où :

n	indice de réfraction du solvant de référence (toluène)
dn/dc	incrément d'indice de réfraction de la solution de polymère ($cm^3.g^{-1}$)
λ_0	longueur d'onde du laser (cm)
N_A	nombre d'Avogadro (mol^{-1})

Le rapport de Rayleigh, R_θ est donné par :

$$R_\theta = \frac{I(\theta,T)_{échantillon} - I(\theta,T)_{solvant}}{I(\theta,T)_{référence}}.R(T)_{référence} \tag{7.15}$$

où :

$I(\theta,T)_{échantillon}$	intensité diffusée par l'échantillon
$I(\theta,T)_{solvant}$	intensité diffusée par le solvant (eau)
$I(\theta,T)_{référence}$	intensité diffusée par la référence (toluène)
R	Rapport de Rayleigh
θ	angle d'analyse
T	température d'analyse

Les mesures de DSL ont été réalisées au laboratoire Polymères, Colloïdes et Interfaces (UMR 6120) de l'Université du Maine, avec la collaboration du Pr. Christophe Chassenieux. L'appareil utilisé est un goniomètre (ALV/CGS-3) de longueur d'onde $\lambda = 632.8$ nm couplé avec un corrélateur (ALV/LSE-5004). Les données sont acquises à l'aide du logiciel ALV-correlator software. Les échantillons de nanoparticules ont été analysés à des concentrations comprises entre 5×10^{-5} et 5×10^{-6} g/mL et passés sur un filtre de 0,45 μm avant analyses. Les solutions doivent être suffisamment diluées afin d'éviter les phénomènes de diffusions multiples, mais néanmoins assez concentrées pour que l'intensité diffusée soit supérieure à celle du toluène. Les mesures ont été enregistrées pour des angles allant de 15 à 150° par pas de 15°, à 20°C, en effectuant deux scans de 80 s chacun. Le bain adaptateur d'indice employé est un bain de toluène, le toluène étant également utilisé comme référence.

Concrètement, pour un échantillon donné, 4 à 5 concentrations sont analysées. Pour chaque concentration, l'intensité moyenne diffusée est enregistrée en fonction de l'angle. Ainsi, les paramètres moléculaires sont déterminés à l'aide de l'équation 7.13.

Le second coefficient du viriel est obtenu après extrapolation à angle nul (Figure 7.1 A.) et le rayon de giration par extrapolation à concentration nulle (Figure 7.1 B.). La

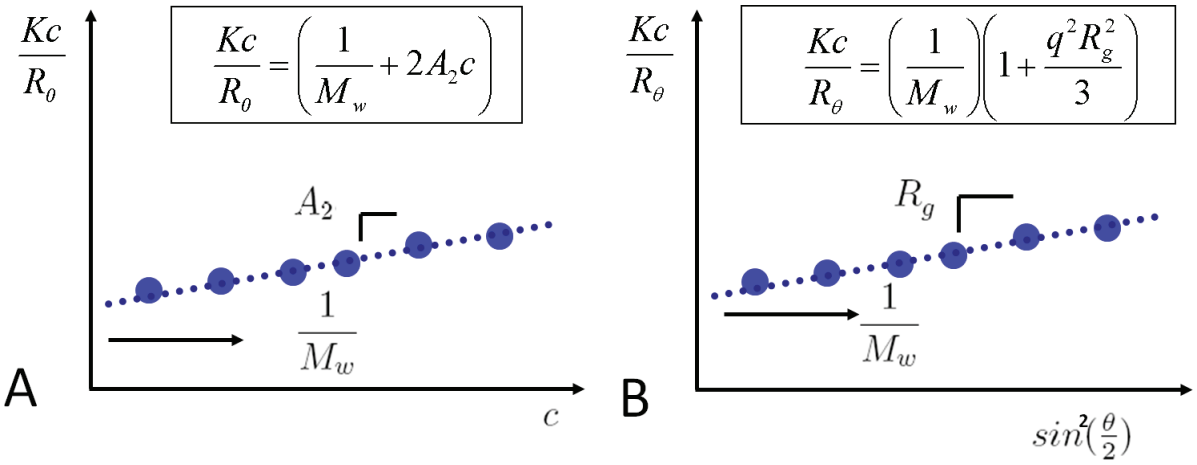


FIGURE 7.1 – A. Extrapolation à angle nul et B. Extrapolation à concentration nulle.

masse molaire peut être estimée par les deux extrapolations. Ces graphiques sont appelés tracés de Debye.

Les valeurs des incréments d'indice de réfraction (dn/dc) pour les nanoparticules dans l'eau ont été déterminées au laboratoire de Physico-chimie des Polymères et Milieux Dispersés Sciences et Ingénierie de la Matière Molle de l'ESPCI (UMR 7615). Le réfractomètre utilisé provient de la société Cordouan Technologies (Arago ∞, diode laser 658 nm). Les mesures sont réalisées à 25 °C avec des concentrations en latex de 0,5 % à 3 % en masse. La même valeur moyenne a été utilisée pour les échantillons à couronne PEO-*b*-PAA et à cœur PS (0,16) et pour l'échantillon à couronne P(APEO$_{0,5}$-*co*-AA$_{0,5}$)$_{22}$ et cœur PS (0,20).

7.1.11 Potentiel Zeta

Les mesures de potentiel Zeta (ζ) ont été réalisées au Laboratoire Physico-Chimie Curie (UMR 168) de l'Institut Curie avec l'aide de Mme Min-Hui Li et de Mme Sabrina Hocine.

L'appareil utilisé est un ZetaSizer Nanoseries de Malvern. Les NPFs sont préparées à des concentrations d'environ 0,005 wt % dans 14 mM de NaCl et 1 mM de tampon phosphate/citrate (pH ajustés entre 4 et 8). Les échantillons sont analysés dans des cuves DTS 1060 jetables, à 25°C, en effectuant trois mesures de dix balayages.

7.1.12 Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les mesures de spectrosocopie d'absorption ont été réalisées sur des appareils Cary-5 ou Cary-5000 (Varian). Ces spectromètres UV-visible à double faisceau permettent une utilisation allant de 175 à 3300 nm avec une précision inférieure à 0,05 nm. Les échantillons sont analysés, selon la longueur d'onde et la nature du solvant utilisés, dans des cuves en verre, en quartz, ou en polystyrène, d'un trajet optique de 1 cm.

Mesure du coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction molaire (ε) traduit la faculté qu'a une solution de chromophores à absorber ou non la lumière. Il est défini à l'aide de la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon l C \tag{7.16}$$

où :

A	absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée
l	trajet optique dans la solution (cm)
ε	coefficient d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
C	concentration en chromophore ($mol.L^{-1}$)

La loi de Beer-Lambert est applicable si la solution est homogène, suffisamment diluée pour que les chromophores puissent être considérés comme indépendants les uns des autres et si le rayonnement est monochromatique. La mesure de ε est réalisée en enregistrant différents spectres à différentes concentrations en chromophore, puis en effectuant une régression linéaire entre l'absorbance à la longueur d'onde λ et la concentration.

7.1.13 Spectroscopie d'émission et d'excitation de fluorescence

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été enregistrés sur des spectrofluorimètres Fluorolog-3 ou Fluoromax-3 de la marque Jobin-Yvon. Dans les deux cas, la lampe d'excitation est une lampe au Xénon d'une puissance de 450 W allant de 200 à 850 nm. Les bandes passantes sont ajustées au moyen de fentes motorisées de 0,1 à 18,9 nm pour le Fluoromax-3 et de 0 à 14 nm pour le Fluorolog-3. Tous les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence sont corrigés d'une fonction d'appareil et enregistrés en mode "right angle" (faisceau sortant à 90° du faisceau entrant) sur des échantillons présentant une absorbance inférieure à 0,1 à la longueur d'onde d'excitation afin de limiter les phénomènes de réabsorption multiples.

Mesure du rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence est défini comme étant la proportion de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 avec émission de fluorescence 1.4.

Le rendement quantique d'un composé (ech) est calculé par rapport à une référence (ref), chacun dans un solvant donné, à l'aide de la relation suivante :

$$\Phi_{F,ech} = \Phi_{F,ref} \frac{1 - 10^{-A_{ref}}}{1 - 10^{-A_{ech}}} \frac{S_{ech}}{S_{ref}} (\frac{n_{ech}}{n_{ref}})^2 \tag{7.17}$$

où :

Φ_F	rendement quantique de fluorescence
A	absorbance à la longueur d'onde d'excitation
S	intégrale de la bande d'émission de fluorescence
n	indice de réfraction du solvant utilisé

Si $A_{ref} \approx A_{ech}$ et si les absorbances sont inférieures à 0,1, l'expression précédente peut être simplifiée comme ci-dessous :

$$\Phi_{F\ ech} = \Phi_{F\ ref} \frac{A_{ref}}{A_{ech}} \frac{S_{ech}}{S_{ref}} \left(\frac{n_{ech}}{n_{ref}} \right)^2 \tag{7.18}$$

La référence employée pour les mesures de rendement quantique des différents dérivés de BODIPY ainsi que des particules absorbant à des longueurs d'onde inférieures à 530 nm est la Rhodamine 590 ($\Phi_F = 95\%$ dans l'éthanol [19]). Pour les molécules absorbant à des longueurs d'onde comprises entre 530 et 620 nm, la sulforhodamine 101 est utilisée ($\Phi_F = 90\%$ dans l'éthanol [379]). Les rendements quantiques sont déterminés à 5% près.

7.1.14 Fluorimétrie impulsionnelle : mesure des déclins de fluorescence

La durée de vie de fluorescence correspond au temps moyen de résidence des molécules dans l'état excité S_1 (équations 1.2 et 1.3).

Elle dépend bien évidemment de la nature du fluorophore, mais également de son état chimique (espèces acides-bases...) et de son environnement (solvant, viscosité du milieu...). La technique de fluorimétrie impulsionnelle permet d'étudier la dynamique des états excités en excitant l'échantillon par un train d'impulsions lumineuses très courtes envoyées par un laser et en comptant les photons émis en fonction du temps.

Dans le plus simple des cas, la réponse de l'échantillon décroît alors de façon simplement exponentielle car elle suit une cinétique de premier ordre. C'est le cas des fluorophores isolés en solution.

Néanmoins, le déclin peut être une fonction plus complexe comme une somme d'exponentielles discrètes (cas de fluorophore agrégés, présence d'un inhibiteur...) :

$$I_N(t) = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \tag{7.19}$$

où :

I_N	intensité de fluorescence normalisée
t	temps
a	coefficient préexponentiel normalisé
τ	durée de vie de fluorescence

Le montage expérimental (Figure 7.2) pour mesurer les durées de vie de fluorescence est composé d'une source de lumière, d'un échantillon en cuve et d'une détection.

La source est un laser accordable à modes bloqués comportant un barreau de saphir dopé par des ions titane et pompé par un laser à argon ionisé. L'ensemble délivre des impulsions de 1,3 ps de largeur à mi-hauteur avec un taux de récurrence de 82 MHz dans un domaine de longueurs d'onde comprises entre 700 et 1000 nm. Le taux de répétition du train d'impulsions du laser est ramené à 4 MHz (soit 250 ns entre deux impulsions)

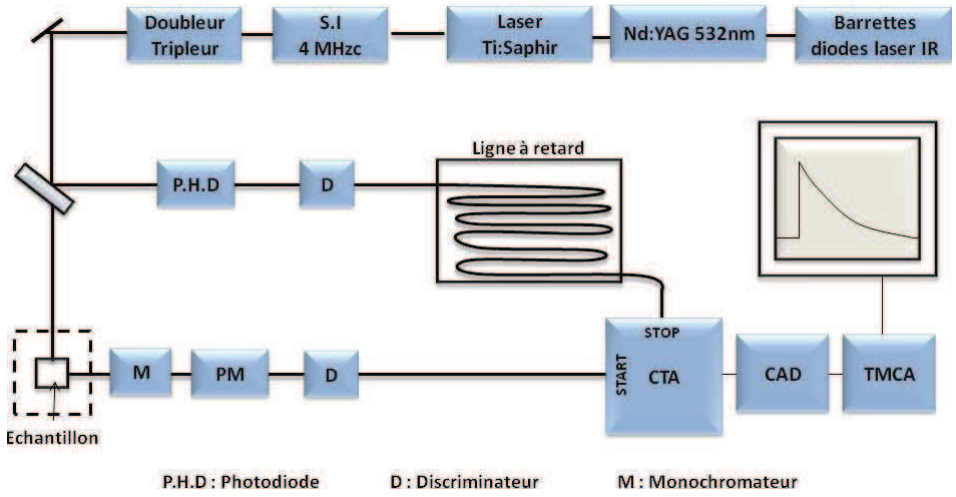


FIGURE 7.2 – Montage expérimental utilisé pour enregistrer les déclins de fluorescence.

à l'aide d'un sélecteur d'une cellule de Bragg. D'une part cela permet la relaxation complète des échantillons entre deux excitations successives ; et d'autre part cela limite le photoblanchiment de l'échantillon en modérant la quantité de lumière qu'il reçoit en une impulsion. Le faisceau laser passe ensuite dans un module comprenant des cristaux non linéaires qui, par doublage et triplage de fréquences, permettront de travailler à des longueurs d'onde d'excitation respectivement de 420 à 500 nm et 280 à 330 nm. Dans notre cas, nous travaillerons toujours à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm.

Le faisceau laser est ensuite envoyé sur l'échantillon par un jeu de miroirs. Des fentes de différentes largeurs ainsi qu'un filtre neutre sont applicables afin de moduler l'intensité lumineuse envoyée sur l'échantillon. Nous avons toujours utilisé des fentes de 0,3 mm.

Les photons de fluorescence sont enfin détectés par un photomultiplicateur (PM) à galette de micro-canaux (Hamamatsu Multi Channel Plate R3809U). La longueur d'onde d'émission de fluorescence est choisie pour chaque système. Un discriminateur à fraction constante, placé derrière le PM, permet de sélectionner les signaux qui ont une amplitude convenable (élimination d'une partie du bruit et des impulsions parasites). Le signal électrique délivré est envoyé à la chaîne de comptage et déclenche le convertisseur temps-amplitude. Une partie du faisceau laser d'excitation est prélevée et envoyée sur une photodiode. L'impulsion délivrée par celui-ci caractérise l'instant d'émission d'une impulsion laser. Elle est retardée par des câbles BNC et une boîte à retards et arrête le convertisseur temps-amplitude. Celui-ci délivre alors une impulsion dont la hauteur est proportionnelle à l'intervalle de temps qui s'est écoulé entre le signal START et le signal STOP. Les signaux sont envoyés sur un micro-ordinateur par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition fournie avec le logiciel permettant d'enregistrer les déclins de fluorescence.

Le temps d'acquisition d'une courbe de déclin est ici d'une dizaine de minutes. La fenêtre temporelle choisie est dans la plupart des cas de 30 à 40 ns et le nombre de canaux sur lequel est enregistré le déclin est de 4096. L'impulsion laser est enregistrée en plaçant un échantillon de silice (Ludox) et en enregistrant les photons diffusés à $\lambda_{exc} = \lambda_F$.

Les déclins de fluorescence sont ensuite ajustés par des modèles mathématiques, généralement des sommes d'exponentielles. L'ajustement numérique des différents paramètres du modèle s'effectue selon la méthode des moindres carrés non linéaire [380]. Le critère déterminant est la quantité χ^2, qui mesure l'erreur entre les données expérimentales et le modèle mathématique. Un ajustement numérique satisfaisant doit fournir une valeur de χ^2 proche de 1, c'est-à-dire comprise entre 0,8 et 1,2 puisque la statistique de comptage suit une distribution de Poisson [381].

Les déclins ont généralement été analysés grâce au programme Globals (Globals Unlimited, University of Illinois at Urbana-Champaign, Laboratory for Fluorescence Dynamics) qui permet d'effectuer rapidement un ajustement de déclin jusqu'à 4 exponentielles en tenant compte de l'impulsion, via une minimisation de type Levenberg-Marquardt [382, 383]. En vertu du critère χ^2, le logiciel ajuste numériquement la fonction calculée au déclin expérimental en faisant varier les paramètres a_i et τ_i ainsi que le décalage temporel entre l'impulsion laser, le déclin et le bruit de fond. Dans la plupart des cas l'ajustement numérique est effectué sur les 3500 premiers canaux et le niveau de bruit choisi à 10.

Les déclins de fluorescence sont donnés à $\pm$0,05 ns.

7.1.15 Anisotropie de fluorescence

Les mesures d'anisotropies de fluorescence permettent d'obtenir des informations sur l'arrangement de fluorophores au sein d'un matériau et également sur les transferts d'énergie entre ces fluorophores.

L'appareil utilisé pour les mesures d'anisotropies stationnaire présente une géométrie de type L : deux polariseurs sont utilisés, un en amont et l'autre en aval de l'échantillon. Ces polariseurs tournent automatiquement de 90° durant la mesure pour enregistrer les mesures de I_{HH}, I_{HV}, I_{VV}, I_{VH} et ainsi déduire G, A et P.

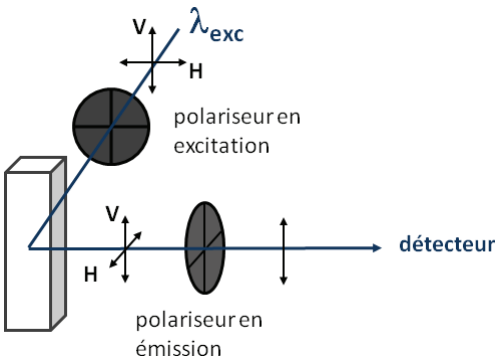


FIGURE 7.3 – Mesures d'anisotropie stationnaire.

Les mesures d'anisotropies résolues en temps sont effectuées sur le montage utilisé pour mesurer les déclins de fluorescence (7.1.14). La géométrie est également de type L, mais cette fois-ci il faut tourner manuellement les polariseurs de Fresnel (amont) et de fluorescence (aval). Pour un même échantillon, quatre déclins sont donc enregistrés. Il

faut veiller à ne pas bouger le filtre neutre et à ce que l'intensité du laser ne fluctue pas durant l'acquisition des mesures et entre chaque mesure pour un même échantillon. Il faut également acquérir les données pendant un laps de temps constant (10 min). Typiquement, pour une mesure d'anisotropie, les fenêtres utilisées sont de 12,5 ns, les filtres de 0,3 mm et la longueur d'onde d'excitation de 495 nm.

7.2 Modes opératoires

7.2.1 Réactifs employés

Les réactifs utilisés sont résumés dans les tableaux suivants, selon leur utilisation : monomères et amorceurs de polymérisation radicalaire (Tableau 7.1) et solvants (Tableau 7.2). D'une manière générale, les produits proviennent de la société Sigma-Aldrich et ne sont pas purifiés avant utilisation. Seuls les produits notifiés sont distillés sous pression réduite avant utilisation. L'eau est permutée sur des membranes échangeuses d'ion d'un système Milli-Q de chez Millipore avec une résistivité de 15 MΩ.cm à 20°C. L'eau de qualité ultra pure est permutée une seconde fois avec une résistivité de 18 MΩ.cm à 20°C. Les solvants employés ainsi que la silice proviennent de la société Carlo Erba. Deux types de silice ont été utilisés : lorsque la qualité n'est pas précisée dans le texte, il s'agit de silice 60A (70-200 μm) et lorsque le terme "silice fine" est employé, il s'agit de silice 60A (40-63 μm). Enfin, certains produits ont été purifiés sur plaques préparatives de silice (couche 2 mm, silice 60A 15 μm).

Tableau 7.1 – Monomères et amorceurs radicalaires.

Réactif	Abréviation
acide 4,4'-azobis-4-cyanopentanoïque	ACPA
2,2'-azobisisobutyronitrile [1]	AIBN
acide acrylique	AA
acide méthacrylique	AMA
acrylate de butyle [2]	ABu
acrylate de méthoxy poly(oxyde d'éthylène) M_n = 454 g/mol	APEO
méthacrylate de méthyle [2]	MMA
styrène [2]	S

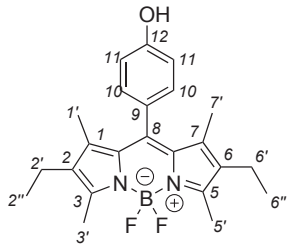
[1] Recristallisé dans le $CHCl_3$ et quelques gouttes d'EP. [2] Monomères distillés sous pression réduite avant utilisation.

Tableau 7.2 – Solvants

Solvant	Abréviation	Remarques
acétate d'éthyle	AcOEt	
dichlorométhane	DCM	
diméthylformamide	DMF	
diméthylsulfoxide	DMSO	
1,4-dioxane	dioxane	
éthanol	EtOH	
éther de pétrole	EP	T_{eb} = 40-65°C
méthanol	MeOH	
tétrahydrofurane	THF	

7.2.2 Synthèse moléculaire

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-hydroxyphényl)-1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



2

La synthèse de cette molécule a été réalisée suivant la procédure décrite dans la littérature (composé 1b [384]).

Dans un ballon tricol, le 4-hydroxybenzaldéhyde (20,30 mmol, 2,48 g) est mis en suspension dans 500 mL de dichlorométhane sec, à température ambiante. À cette suspension est ajouté le kryptopyrrole (2 équiv., 40,60 mmol, 5,00 g). Environ une heure plus tard (après consommation du pyrrole, suivi CCM), la poudre de chloranile est ajoutée (1 équiv., 20,30 mmol, 4,95 g) et deux minutes après la *N,N*-diisopropyléthylamine (7 équiv., 142,10 mmol, 19,37 g). Enfin, 15 minutes plus tard, l'éthérate de trifluorure de bore (11 équiv., 223,30 mmol, 31,69 g) est lentement additionné. L'expérience est stoppée au bout d'une heure environ. Le solvant est évaporé et le mélange purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM). Une poudre orange-verte foncée est obtenue avec un rendement de 80%.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,12 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{10}), 6,94 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{11}), 5,23 (s, 1H, -O*H*), 2,53 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, J_{H-H} = 7,6 Hz, 4H, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,35 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, J_{H-H} = 7,6 Hz , 6H, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 156,2 (C_{12}), 153,7, 138,6, 132,9, 131,3, 129,9 (C_{10}), 128,3, 116,2 (C_{11}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,8 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 12,0 ($C_{1'}$, $C_{7'}$).

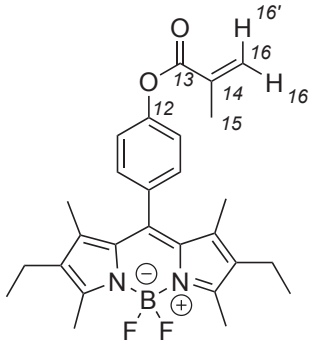
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = - 145,6 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = - 0,13 (t, J_{B-F} = 33,2 Hz) ppm.

F > 260°C.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{23}H_{27}BF_2N_2ONa$: 419,2082, trouvé : 419,2097.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(méthacryloyloxy)phényl)- 1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



1

Dans un ballon tricol équipé d'une garde à $CaCl_2$, le BODIPY phénol **2** (1,2 mmol, 475 mg) est dissous dans 50 mL de dichlorométhane anhydre à température ambiante. Puis la DBU (2 équiv., 2,4 mmol, 365 mg) est lentement ajoutée au milieu réactionnel à l'aide d'une seringue. Enfin, le chlorure de méthacryloyle (1,5 équiv., 1,8 mmol, 190 mg) est ajouté au mélange devenu noir. La réaction est arrêtée après 24h, après disparition du BODIPY phénol sur plaque CCM. Le solvant est évaporé et le mélange purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/EP : 70/30). 432 mg de produit sont obtenus (78% de rendement).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,32 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{10}), 7,27 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{11}), 6,39 (s, 1H, $H_{16'}$), 5,80 (s, 1H, H_{16}), 2,52 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,29 (q, J_{H-H} = 7,6 Hz, 4H, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 2,08 (s, 3H, H_{15}), 1,33 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,97 (t, J_{H-H} = 7,6 Hz, 6H, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 165,7 (C_{13}), 154,0, 151,4, 139,2, 138,5, 135,8, 133,3, 133,0, 130,9, 129,5 (C_{10}), 127,7 (C_{16}), 122,6 (C_{11}), 18,5 (C_{15}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,7 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 11,9 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

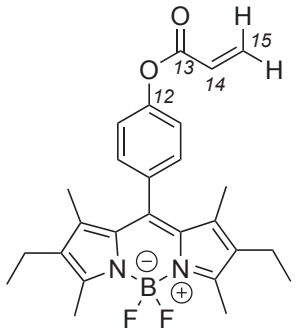
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,9 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,15 (t, J_{B-F} = 32,9 Hz) ppm.

F = 186°C.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{27}H_{31}BF_2N_2O_2Na$: 487,2344 ; trouvé : 487,2349.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(acryloyloxy)phényl)- 1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



12

Le même protocole que pour la synthèse du BODIPY **1** a été suivi, le composé de départ étant le BODIPY **2**. L'estérification est faite en présence de chlorure d'acryloyle. 565 mg d'une poudre rose sont obtenus avec un rendement de 50%.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,33-7,27 (m, 4H, H_{10}, H_{11}), 6,65 (dd, J_{H-H} = 1,2 Hz, J_{H-H} = 17,4 Hz, 1H, H_{15}), 6,36 (dd, J_{H-H} = 17,2 Hz, J_{H-H} = 10,3 Hz, 1H, H_{14}), 6,06 (dd, J_{H-H} = 1,2 Hz, J_{H-H} = 10,5 Hz, 1H, $H_{15'}$), 2,53 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, J_{H-H} = 7,8 Hz, 4H, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,34 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, J_{H-H} = 7,3 Hz, 6H, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 164,3 (C_{13}), 154,0, 151,1, 139,2, 138,4, 133,4, 133,1 (C_{15}), 130,9, 129,5 (C_{10}), 127,8 (C_{14}), 122,4 (C_{11}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,7 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 11,9 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

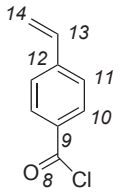
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,15 (t, J_{B-F} = 34,5 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + H]^+$ calculé pour $C_{26}H_{29}BF_2N_2O_2H$: 451,2368 ; trouvé : 451,2359.

F = 175°C.

Chlorure de 4-vinylbenzoyle



17

La synthèse de ce réactif a été réalisée en quatre étapes selon des protocoles décrits dans la littérature.

Première étape : synthèse de l'acide 4-bromométhylbenzoïque

L'acide 4-bromométhylbenzoïque est obtenu à partir de l'acide 4-méthylbenzoïque, selon un protocole issu de la référence [385], composé 5c. 7,90 g de produit sont obtenus avec un rendement quantitatif.

Deuxième étape : synthèse du bromure de (4-carboxybenzyl)triphénylphosphonium

Le bromure de (4-carboxybenzyl)triphénylphosphonium est obtenu à partir de l'acide 4-bromométhylbenzoïque, selon un protocole issu de la référence [386]. 6,49 g de produit sont obtenus avec un rendement de 45%.

Troisième étape : synthèse de l'acide 4-vinylbenzoïque

L'acide 4-vinylbenzoïque est obtenu à partir du bromure de (4-carboxybenzyl) triphénylphosphonium, selon un protocole issu de la référence [386]. 2,14 g de produit sont obtenus avec un rendement de 79%.

Quatrième étape : synthèse de chlorure de 4-vinylbenzoyle

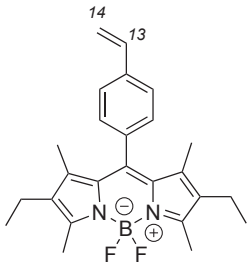
L'acide 4-vinylbenzoïque (3,38 mmol, 0,5 g) est dissous dans 12 mL de chloroforme puis le chlorure de thionyle (10 équiv., 33,8 mmol, 4,02 g) est ajouté rapidement. Enfin, une goutte de DMF est ajoutée au mélange réactionnel. La solution est placée à reflux pendant 5h. Le mélange réactionnel est purifié par une courte chromatographie sur gel de silice(DCM). Une huile jaune est obtenue avec un rendement quantitatif.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,08 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{10}), 7,52 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{11}), 6,77 (dd, 1H, J_{H-H} = 11,0, 17,4 Hz, H_{13}), 5,95 (d, 1H, J_{H-H} = 17,4 Hz, H_{14}), 5,49 (d, 1H, J_{H-H} = 17,4 Hz, $H_{14'}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 168,0 (C_8), 144,5 (C_{12}), 135,5 (C_{13}), 132,0 (C_9), 131,9 (C_{10}), 126,7 (C_{11}), 118,6 (C_{14}) ppm.

$C_9H_{17}ClO$: 166,02.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-vinylphényl)- 1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a- diaza-*s*-indacène



15

Le chlorure de 4-vinylbenzoyle **17** (2,0 mmol, 332 mg) est dissous dans 50 mL de dichlorométhane sec. À cette solution est ajouté le kryptopyrrole (2,1 équiv., 4,2 mmol,

570 μL) et le mélange placé à reflux du DCM pendant deux heures. Le mélange est alors replacé à température ambiante et la *N,N*-diisopropyléthylamine (8 équiv., 16,0 mmol, 2,07 g) est ajoutée puis, 15 min. après, l'éthérate de trifluorure de bore (11 équiv., 22 mmol, 3,12 g). La solution est rouge bordeaux, très peu fluorescente. Le solvant est évaporé et le mélange purifié par deux chromatographies sur gel de silice (DCM). 60 mg de produit sont obtenus (7 % de rendement).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,53 (d, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_{11}), 7,24 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_{10}), 6,79 (dd, 1H, J_{H-H} = 10,8, 17,4 Hz, H_{13}), 5,86 (d, 1H, J_{H-H} = 17,4 Hz, H_{14}), 5,35 (d, 1H, J_{H-H} = 11,0, $H_{14'}$), 2,53 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, 4H, J_{H-H} = 7,56, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,32 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, 6H, J_{H-H} = 7,6, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 153,8, 140,1, 138,5, 138,1, 136,4 (C_{13}), 135,4, 132,9, 130,9, 128,7 (C_{10}), 126,9 (C_{11}), 114,9 (C_{14}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,8 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 12,0 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

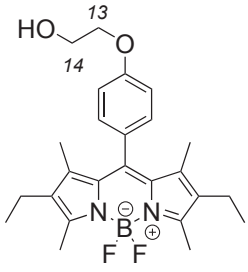
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,9 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,15 (t, J_{B-F} = 33,2 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{25}H_{29}BF_2N_2Na$: 429,2284 ; trouvé : 429,2289.

F = 250 °C.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(2-hydroxyéthoxy)phényl)- 1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



16

Le 4-(2-hydroxyéthoxy)benzaldéhyde utilisé dans cette synthèse a au préalable été synthétisé selon un protocole décrit dans la littérature (schéma 1B, [321]) (325 mg, 66% de rendement).

Dans 25 mL de dichlorométhane anhydre sont dilués le 4-(2-hydroxyéthoxy) benzaldéhyde (1 mmol, 0,17 g) et le kryptopyrrole (2 équiv., 2 mmol, 0,25 g). L'ensemble est placé sous argon et une garde à $CaCl_2$ est ajoutée. 4 gouttes de TFA sont ajoutés à la solution et la réaction est laissée pendant une heure à température ambiante. Le chloranile (1 équiv., 1 mmol, 0,24g) est ajouté au milieu réactionnel puis 2 min après la *N,N*-diisopropyléthylamine (7 équiv., 7 mmol, 0,9 g) est ajoutée à la seringue et enfin 15 min plus tard, l'éthérate de trifluorure de bore (11 équiv., 11 mmol, 1,56 g). La réaction

est stoppée après 2 h. Le produit brut est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif et purifié sur gel de silice ($CHCl_3$). 318 mg d'une poudre rose sont obtenus avec un rendement de 72%.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,18 (d, 2H, J_{H-H} = 6,4 Hz, H_{10}), 7,03 (d, 2H, J_{H-H} = 6,9 Hz, H_{11}), 4,16 (t, 2H, J_{H-H} = 4,6 Hz, H_{13}), 4,03 (t, 2H, J_{H-H} = 4,4 Hz, H_{14}), 2,53 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, 4H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,33 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, 6H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

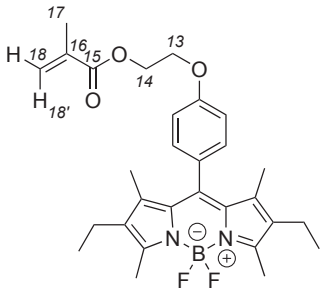
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 159,2 (C_{12}), 153,7, 140,2, 138,4, 132,8, 131,3, 129,7 (C_{10}), 128,5, 115,1 (C_{11}), 69,3 (C_{13}), 61,6 (C_{14}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,8 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 12,0 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,15 (t, J_{B-F} = 34,5 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{25}H_{31}N_2O_2F_2BNa$: 463,2339 ; trouvé : 463,2342.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(2-(méthacryloyloxy)éthoxy)phényl)-1,3,5,7-tétraméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



13

Le BODIPY **16** (0,43 mmol, 190 mg) est dissous dans le dichlorométhane (4 mL) sous argon. Le milieu réactionnel est refroidi par un bain de glace et la triéthylamine (7 équiv., 3,0 mmol , 0,41 mL) est ajoutée. Le chlorure de méthacryloyle (1,5 équiv., 0,65 mmol, 60 μL) dilué dans 1 mL de dichlorométhane est alors lentement additionné pendant environ 3 min à l'aide d'une seringue. La réaction est poursuivie pendant une nuit. Le mélange est lavé deux fois avec environ 50 mL d'eau puis une fois avec 50 mL de solution NaCl saturée. Les phases aqueuses sont réunies et extraites une fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, séchées sur $MgSO_4$, filtrées sur coton et évaporées sous vide à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié sur gel de silice (EP/DCM : 1/2). 100 mg d'une poudre rose sont obtenus avec un rendement de 50 %.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,17 (d, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{10}), 7,02 (d, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{11}), 6,19 (s, 1H, H_{18}), 5,62 (s, 1H, $H_{18'}$), 4,54 (t, 2H, J_{H-H} = 4,1 Hz, H_{14}), 4,29 (t, 2H, J_{H-H} = 3,7 Hz, H_{13}), 2,52 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, 4H, J_{H-H} = 7,3

Hz, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,98 (s, 3H, H_{17}), 1,33 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, 6H, J_{H-H} = 7,3 Hz, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 167,5 (C_{15}), 159,1 (C_{12}), 153,7, 140,2, 138,5, 136,1, 132,8, 131,3, 129,7 (C_{10}), 128,6, 126,3 (C_{18}), 115,3 (C_{11}), 66,1 (C_{13}), 63,1 (C_{14}), 18,5 (C_{17}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,8 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 12,0 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

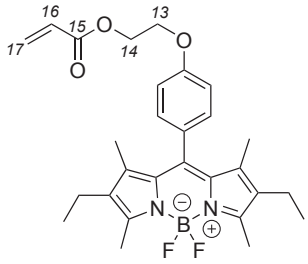
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,17 (t, J_{B-F} = 32,0 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{29}H_{35}N_2O_3F_2BNa$: 531,2607, trouvé : 531,2604.

F = 169 °C.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(2-(acryloyloxy)éthoxy)phényl)-1,3,5,7-tétraméthyl--4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



14

Le même protocole que pour la synthèse du monomère **13** a été suivi, le BODIPY de départ utilisé étant également le composé **16**. L'estérification est faite en présence de chlorure d'acryloyle. 43 mg d'une poudre rose sont obtenus avec un rendement de 44 %.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,18 (d, 2H, J_{H-H} = 8,7 Hz, H_{10}), 7,02 (d, 2H, J_{H-H} = 9,1 Hz, H_{11}), 6,50 (d, 1H, J_{H-H} = 17,4 Hz, H_{17}), 6,21 (dd, 1H, J_{H-H} = 17,2, J_{H-H} = 10,3 Hz, H_{16}), 5,90 (d, 1H, J_{H-H} = 10,5 Hz, $H_{17'}$), 2,53 (s, 6H, $H_{3'}$, $H_{5'}$), 2,30 (q, 4H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 1,33 (s, 6H, $H_{1'}$, $H_{7'}$), 0,98 (t, 6H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2''}$, $H_{6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 166,3 (C_{15}), 159,0 (C_{12}), 153,7, 138,5, 132,8, 131,7, 131,3, 129,7 (C_{10}), 128,6, 128,2, 115,3 (C_{11}), 66,1 (C_{13}), 63,0 (C_{14}), 17,2 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,8 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 12,6 ($C_{3'}$, $C_{5'}$), 12,0 ($C_{1'}$, $C_{7'}$) ppm.

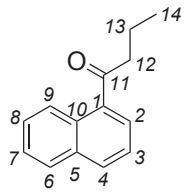
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -145,7 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,15 (t, J_{B-F} = 33,2 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{28}H_{33}N_2O_3F_2BNa$: 517,2445, trouvé : 517,2447.

F = 172 °C.

1-(naphthalène-1-yl)butane-1-one



25

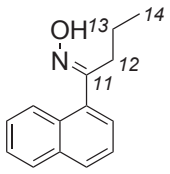
Le naphtalène (39 mmol, 5g) est placé dans un ballon de 250 mL plongé dans la glace, sous atmosphère d'argon. 100 mL de de dichlorométhane sec sont ajoutés à l'aide d'une ampoule de coulée. Une fois le naphtalène dissous, une solution d'$AlCl_3$ (1,75 équiv., 68 mmol, 9 g) et de chlorure de butyryle (1 équiv., 39 mmol, 4,4 g) dans 50 mL de dichlorométhane est ajoutée à l'ampoule de coulée. La réaction est arrêtée après 2h en jetant le milieu réactionnel sur de la glace et de l'eau dans un erlenmeyer sous vive agitation. La phase organique se décolore et passe d'une couleur marron à une couleur vert/jaune. Après 1h30, la phase organique est séparée puis lavée deux fois avec une solution de $KHCO_3$ saturée et une fois avec une solution de NaCl saturée. Les phases aqueuses sont réunies et extraites une fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, séchées sur $MgSO_4$, filtrées sur coton et évaporées sous vide à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié sur gel de silice (EP/DCM : 2/1). Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 93% (7,1 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,57 (d, J_{H-H} = 8,7 Hz, 1H, H_9), 7,92 (d, J_{H-H} = 8,2 Hz, 1H, H_4), 7,81 (m, 2H, H_2, H_6), 7,50 (m, 3H, H_3, H_7, H_8), 2,99 (t, J_{H-H} = 6,9 Hz, 2H, H_{12}), 1,80 (m, 2H, H_{13}), 1,00 (t, J_{H-H}= 7,3 Hz, 3H, H_{14}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 205,0 (C_{11}), 136,3 (C_1), 134,0 (C_5), 132,3, 130,1, 128,4, 127,8, 127,3, 126,4, 125,8, 124,4, 44,1 (C_{12}), 18,2 (C_{13}), 13,9 (C_{14}) ppm.

$C_{14}H_{14}O$: 198,10.

Oxime de la 1-(naphthalène-1-yl)butane-1-one (Z,E)



26

Le chlorure d'hydroxylamonium (2 équiv., 48 mmol, 3,3 g) est dissous dans 50 mL d'éthanol et 20 mL de pyridine. Puis la cétone **25** (24 mmol, 4,78 g), dissoute au préalable dans 50 mL d'éthanol est ajoutée. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 24h. Une fois la réaction revenue à température ambiante, 200 mL d'éther diéthylique y sont ajoutés. Un lavage à l'eau de la phase organique est réalisé, puis celle-ci est séchée sur

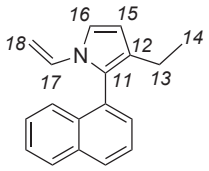
$MgSO_4$, filtrée et évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif. Une huile marron-orangée d'un mélange de stéréoisomères (Z, E : 30, 70) est obtenue avec un rendement > 95%. Le composé est utilisé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,99 (m, 0,67H, H_2), 7,86 (m, 2H), 7,73 (m, 0,33H, H_2), 7,50-7,40 (m, 3H), 7,28 (m, 1H), 2,86 (td, J_{H-H} = 3,4 Hz, 7,7 Hz, 1,25H, H_{12}), 2,60 (td, J_{H-H} = 1,8, 7,1 Hz, 0,75H, H_{12}), 1,50 (m, 2H, H_{13}), 0,99-0,89 (m, 3H, H_{14}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 134,6 (C_{11}), 133,9 (C_{11}), 133,5, 133,3, 131,5, 129,6, 129,1, 128,9, 128,6, 128,5, 126,6, 128,5, 126,6, 126,3, 126,2, 126,1, 125,7, 125,4, 125,3, 125,2, 124,2, 38,7 (C_{12}), 32,1 (C_{12}), 19,9 (C_{13}), 19,4 (C_{13}), 14,5 (C_{14}), 14,1 (C_{14}) ppm.

$C_{14}H_{15}NO$: 213,12.

3-éthyl-2-(naphthalène-1-yl)-1-vinyl-1*H*-pyrrole



27

La synthèse des pyrroles **28**, **29**, **30** et des *N*-vinyl pyrroles **27**, **31**, **32** est inspirée de la littérature [44].

L'oxime **26** (15 mmol, 3,2 g), le KOH (2 équiv., 30 mmol, 1,9 g) et le DMSO (100 mL) sont introduits dans un ballon tricol de 250 mL. Le milieu réactionnel est porté à 110 °C dans un bain d'huile sous agitation, équipé d'un réfrigérant et d'une garde de KOH dans le DMSO. Le mélange réactionnel est alors placé sous flux d'acétylène. La réaction est stoppée après 5h (suivi CCM sur silice : 0,5 mL de la solution placés dans NH_4Cl aqueux et extraits à l'éther - éluant : EP / éther diéthylique : 2/1). Après retour à température ambiante de la solution, celle-ci est transvasée dans un bécher auquel de l'eau est ajoutée puis 2 équiv. de NH_4Cl sont additionnés pour neutraliser la phase aqueuse. Cette phase est extraite à l'éther diéthylique (5 fois 200 mL). La phase organique est enfin lavée par une solution de NaCl saturée et séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur coton et évaporée à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel d'alumine neutre (EP : éther diéthylique 4 : 1 pour commencer jusqu'à éther diéthylique seul pour la dernière fraction (pyrrole)). Trois fractions sont collectées :

- *N*-vinyl pyrrole
- cétone
- pyrrole

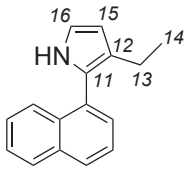
Dans notre cas, seul le *N*-vinyl pyrrole a pu être isolé, le pyrrole et la cétone étant retrouvés à l'état de traces. Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 26% (3,94 mmol).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,90 (m, 1H, H_9), 7,53-7,35 (m, 6H, H_{Ar}), 7,18 (d, 1H, J_{H-H} = 3,2 Hz, H_{16}), 6,33 (m, 2H, H_{15}, H_{17}), 5,01 (dd, 1H, J_{H-H} = 15,6 et 0,9 Hz, H_{18}), 4,33 (dd, 1H, J_{H-H} = 9,2 et 0,9 Hz, $H_{18'}$), 2,24 (m, 2H, H_{13}), 1,04 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{14}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 134,0 ($C_{q,Ar}$), 133,7 ($C_{q,Ar}$), 131,8, 130,2, 128,8, 128,3, 126,6, 126,4, 126,1, 125,4, 116,0 (C_{16}), 110,0 (C_{15}), 96,2 (C_{18}), 19,5 (C_{13}), 15,7 (C_{14}) ppm.

$C_{18}H_{17}N$: 247,33.

3-éthyl-2-(naphthalène-1-yl)-1*H*-pyrrole



28

La déprotection des *N*-vinyl pyrroles en pyrroles se fait selon un protocole issu de la littérature [315].

Le *N*-vinyl pyrrole **27** (2,6 mmol, 700 mg) est dissous dans 15 mL d'acétonitrile. En parallèle est préparée une solution d'acétate de mercure (3 équiv., 7,7 mmol, 2452 mg) dans 15 mL d'acétonitrile et 15 mL d'eau. Cette solution est ajoutée goutte à goutte à la pipette pasteur à la solution contenant le *N*-vinyl pyrrole. Le mélange est chauffé à 55°C pendant 30 min. La solution devient noire. Une fois le mélange refroidi, le $NaBH_4$ ($\approx$ 6 équiv., 15,5 mmol, 600 mg) est ajouté en 10 min. environ à la spatule. La suspension est filtrée puis 20 mL d'éther diéthylique y sont ajoutés. Le produit est purifié par un lavage avec une solution de saumure (3 fois 20mL) et séché sur K_2CO_3 pendant 30 min. Une huile est obtenue avec un rendement de 46%.

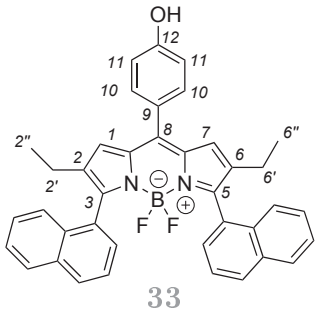
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,86 (m, 3H, H_{Ar}), 7,49 (m, 4H, H_{Ar}), 6,90 (t, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{16}), 6,32 (t, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{15}), 2,44 (q, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{13}), 1,13 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{14}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 128,4 (C_{Ar}), 128,3 (C_{Ar}), 128,0 (C_{Ar}), 126,35 (C_{Ar}), 126,28 (C_{Ar}), 126,0 (C_{Ar}), 125,5 (C_{Ar}), 117,4 (C_{16}), 108,9 (C_{15}), 19,6 (C_{13}), 15,8 (C_{14}) ppm.

$C_{16}H_{15}N$: 221,12.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-hydroxyphényl)-5,3-(1-naphtyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène : mélange de conformères

Le même mode opératoire que pour le BODIPY **2** a été suivi, en partant du pyrrole **28**. Le mélange réactionnel est purifié par deux chromatographies successives sur gel de



33

silice fine (EP/DCM : gradient de EP pur vers DCM pur). Une poudre rose-violet foncé est obtenue avec un rendement de 4% (20 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,80 (m, 4H, H_{Ar}), 7,64 (m, 4H, H_{Ar}), 7,55-7,30 (m, 8H, H_{Ar}), 7,05 (d, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_{11}), 6,81 (s, 2H, $H_{1,7}$), 2,04 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 1,92 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 0,90 (m, 6H, $H_{2'',6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 157,6 (C_{12}), 137,2, 134,5, 133,2, 132,5, 132,4, 129,8, 128,2, 128,6, 128,6, 128,4 (C_{10}), 127,1, 126,4, 126,3, 126,2, 125,9, 125,8, 125,1, 115,5 (C_{11}), 30,3 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 27,0 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,3 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 14,2 ($C_{2''}$, $C_{6''}$) ppm.

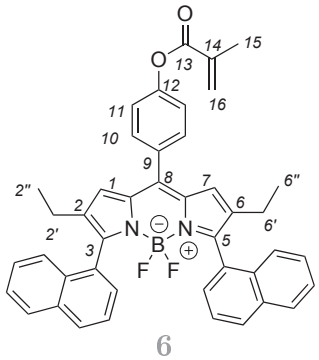
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -126,4 (m, 0,7F), -137,5 (q, 2F, J_{F-B} = 32,3 Hz), -147,4 (m, 0,7F) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,29 (t, J_{B-F} = 30,8 Hz) ppm.

F $\approx$ 250°C.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{39}H_{31}BF_2N_2ONa$ = 615,2395, trouvé 615,2469.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(méthacryloylloxy)phényl)-5,3-(1-naphtyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène : mélange de conformères



6

Le même mode opératoire que pour le BODIPY phénol **2** a été suivi en partant du pyrrole **28**. Une poudre grasse rose-violet est obtenue avec un rendement d'environ 50 %.

La RMN du ^{1}H est ininterprétable, la RMN du ^{13}C est très difficile à interpréter mais contient entre autres les signaux suivants :

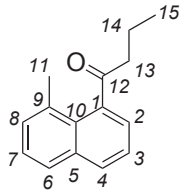
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 155,9, 137,6, 134,5, 132,2, 132,3, 131,0, 130,0-128,0 (massif), 127,0-125,0 (massif), 115,9, 38,5, 29,8, 14,3, 14,2 ppm.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -126,3 (m, 0,7F), -137,5 (q, 2F, J_{F-B} = 32,3 Hz), -147,4 (m, 0,7F) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,29 (t, J_{B-F} = 29,5 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{43}H_{35}BF_2N_2O_2Na$ = 683,2657 trouvé 683,2657.

1-(8-méthylnaphthalène-1-yl)butane-1-one



34

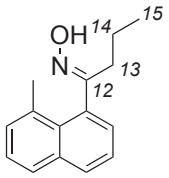
Le même mode opératoire que pour la cétone **25** a été suivi. Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 86% (10,24 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,64 (m, 1H, H_{Ar}), 7,76 (d, 1H, H_{Ar}, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{Ar}), 7,58 (m, 2H, H_{Ar}), 7,34 (dd, 1H, J_{H-H} = 7,3, 0,9 Hz, H_{Ar}), 3,02 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3, H_{13}), 2,74 (s, 3H, H_{11}), 1,82 (m, 2H, H_{14}), 1,03 (t, 3H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{15}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 205,0 (C_{12}), 139,4, 134,9, 133,1, 130,4, 127,5, 127,4, 126,5, 126,4, 125,4, 125,4, 44,1 (C_{13}), 20,2 (C_{11}), 18,5 (C_{14}), 14,0 (C_{15}) ppm.

$C_{15}H_{16}O$: 212,12.

Oxime de la 1-(8-méthylnaphthalène-1-yl)butane-1-one (Z,E)



35

Le même mode opératoire que pour l'oxime **26** a été suivi, en partant du composé **34**. Un solide jaune/marron est obtenu avec un rendement de 90% (9,85 g).

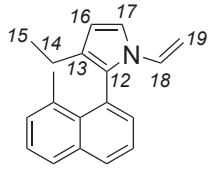
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,02-7,17 (m, 6H, H_{Ar}), 2,84 (m, 1,1H, H_{13}), 2,69 (s, 3H, H_{11}), 2,58 (m, 0,9H, H_{13}), 2,50 (m, 2H, H_{14}), 0,90 (m, 3H, H_{15}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 161,6 (C_{12}), 159,4 (C_{12}), 135,4 ($C_{q,Ar}$), 135,4 ($C_{q,Ar}$), 133,0 ($C_{q,Ar}$), 132,9 ($C_{q,Ar}$), 132,6 ($C_{q,Ar}$), 131,6 ($C_{q,Ar}$), 129,6 ($C_{q,Ar}$), 126,3-126,0 ($C_{H,Ar}$), 124,7 ($C_{H,Ar}$), 124,6 ($C_{H,Ar}$), 123,9 ($C_{H,Ar}$), 38,8 (C_{13}), 32,3 (C_{13}), 20,0 (C_{14}), 19,7 (C_{11}), 19,7 (C_{14}), 14,5 (C_{15}), 14,0 (C_{15}) ppm.

F = 75°C.

$C_{15}H_{17}NO$: 227,13.

3-éthyl-2-(8-méthylnaphthalène-1-yl)-1-vinyl-1*H*-pyrrole



31

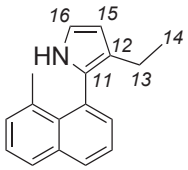
Le même mode opératoire que pour le composé **28** a été suivi en partant du composé **35**, mais seul le *N*-pyrrole a pu être isolé (le pyrrole étant retrouvé à l'état de traces). Une huile marron est obtenue avec un rendement de 12% (430 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,05 (d, 1H, H_{Ar}), 7,55-7,32 (m, 5H, H_{Ar}), 7,17 (d, 1H, J_{H-H} = 3,2 Hz, H_{17}), 6,32 (m, 2H, H_{16}, H_{18}), 4,98 (d, 1H, J_{H-H} = 16,0 Hz, H_{19}), 4,32 (d, 1H, J_{H-H} = 9,2 Hz, $H_{19'}$), 2,75 (s, 3H, H_{11}), 2,23 (m, 2H, H_{14}), 1,03 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{15}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 135,3 ($C_{q,Ar}$), 134,0 ($C_{q,Ar}$), 132,8 ($C_{q,Ar}$), 131,8 ($C_{H,Ar}$), 130,0 ($C_{H,Ar}$), 127,2-124,4 (C_{Ar}), 115,7 (C_{17}), 110,0 (C_{16}), 96,0 (C_{19}), 19,7 (C_{11}), 19,5 (C_{14}), 15,7 (C_{15}) ppm.

$C_{19}H_{19}N$: 261,15.

3-éthyl-2-(8-méthylnaphthalène-1-yl)-1*H*-pyrrole



29

Le même mode opératoire que pour le composé **28** a été suivi en partant du composé **31**. Une huile est obtenue avec un rendement quantitatif (370 mg).

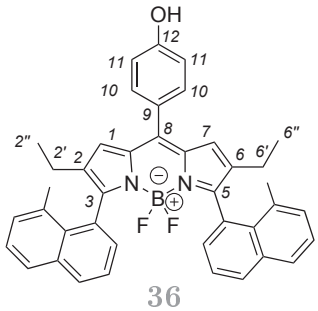
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,05 (m, 2H, H_{Ar}), 7,84 (m, 1H, H_{Ar}), 7,55-7,32 (m, 3H, H_{Ar}), 6,89 (t, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{17}), 6,31 (t, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{16}), 2,74 (s, 3H, H_{11}), 2,42 (m, 2H, H_{14}), 1,12 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{15}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 132,9, 128,0, 126,9, 126,2, 125,9, 125,8, 124,5, 117,2 (C_{17}), 108,8 (C_{16}), 19,6 (C_{14}), 15,8 (C_{15}) ppm.

$C_{17}H_{17}N$: 235,14.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-hydroxyphényl)-5,3-(9-méthyl-1-naphtyl)-4-bora--3a,4a-diaza-*s*-indacène

Le même mode opératoire que pour les BODIPY phénol **2** et **33** a été suivi en partant du pyrrole **29**. Le produit brut est purifié par deux colonnes sur gel de silice successives :



36

la première sur silice normale (EP puis EP/DCM pour finir DCM seul) et la seconde sur gel de silice fine (cyclohexane/DCM : 2/1 puis DCM seul). Une poudre rose-violet est obtenue avec un rendement d'environ 10% (50 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,96 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_{Ar}), 7,90 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_{Ar}) , 7,6-7,1 (m, 12H, H_{Ar}), 6,75 (m, 2H, $H_{1,7}$), 2,64 (s, 6H, CH_3), 2,03 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 1,91 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 0,90 (m, 6H, $H_{2'',6''}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 156,2, 137,6, 135,7, 134,4, 132,4, 130,0, 128,9, 128,3, 126,7, 126,0, 125,7, 125,6, 124,5, 115,2 (C_{11}), 19,9 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 19,7 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,4 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 14,2 ($C_{2''}$, $C_{6''}$) ppm.

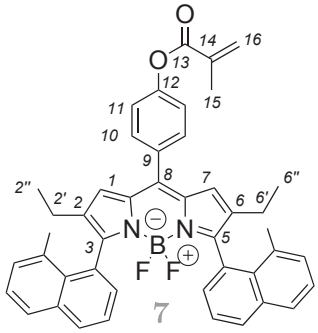
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -125,9 (m, 0,8F), -137,5 (q, 2F, J_{F-B} = 32,3 Hz), -147,7 (m, 0,8F) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,29 (t, J_{B-F} = 29,5 Hz) ppm.

F > 260°C.

HRMS (ESI) m/z $[M - H]^+$ calculé pour $C_{41}H_{34}BF_2N_2O$: 619,2749, trouvé : 619,2732.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(méthacryloylloxy)phényl)-5,3-(9-méthyl-1-naphtyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



7

Le même protocole d'estérification que pour la synthèse du BODIPY méthacrylate **1** a été utilisé, en partant du BODIPY **36**. Le produit brut est d'abord purifié sur gel de silice fine (cyclohexane puis cyclohexane/DCM : 4/1), puis une seconde fois sur plaque préparatrice (chloroforme/EP : 2/1).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,89 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_{Ar}), 7,83 (d, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_{Ar}), 7,76 (m, 2H, H_{Ar}), 7,71 (m, 1H, H_{Ar}), 7,47-7,19 (m, 8H, H_{Ar}),7,21

(m, 1H, H_{Ar}), 6,69 (s, 2H, $H_{1,7}$), 6,38 (s, 1H, H_{16}), 5,78 (s, 1H, $H_{16'}$), 2,64 (s, 6H, CH_3), 2,14 (s, 3H, H_{15}), 2,02 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 1,88 (m, 2H, $H_{2',6'}$, 0,88 (m, 6H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2'',6''}$) ppm.

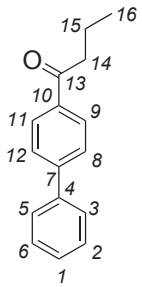
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 165,8 (C_{13}),156,4 (C_{12}), 152,4, 137,7, 135,8, 135,7, 134,5, 132,45, 132,36, 132,1, 132,0, 131,8, 131,0, 128,9, 128,2, 128,1 (C_{16}), 127,0, 126,8, 126,0, 125,74, 125,66, 124,5, 121,8 (C_{11}), 19,7 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 19,4 ($C_{2'}$, $C_{6'}$), 14,3 ($C_{2''}$, $C_{6''}$) ppm.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -125,8 (m, 0,8F), -137,6 (q, 2F, J_{F-B} = 32,3 Hz), -147,7 (m, 0,8F) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,25 (t, J_{B-F} = 30,8 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calculé pour $C_{45}H_{39}BF_2N_2O_2Na$: 711,2992, trouvé : 711,2970.

1-(1-biphényl-4-yl)butane-1-one



37

Le même mode opératoire que pour la synthèse des molécules **25** et **34** a été suivi. Des cristaux blancs sont obtenus avec un rendement de 72% (8,33 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,05 (d, 2H, J_{H-H} = 6,9 Hz, H_9, H_{11}), 7,69 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_8, H_{12}), 7,63 (d, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_3, H_5), 7,48 (t, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_2, H_6), 7,40 (t, 1H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_1), 2,98 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{14}), 1,82 (m, 2H, H_{15}), 1,03 (t, 3H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{16}) ppm.

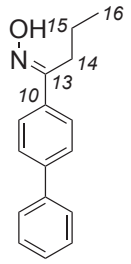
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 200,1 (C_{13}), 145,6 (C_7), 140,0 (C_4), 135,9 (C_{10}), 129,1 (C_2, C_6), 128,8 (C_9, C_{11}), 128,3 (C_1), 127,4 (C_3, C_5), 127,3 (C_8, C_{12}), 40,7 (C_{14}), 18,0 (C_{15}), 14,1 (C_{16}) ppm.

F = 100°C.

$C_{16}H_{16}O$: 224,12.

Oxime de la 1-(1-biphényl-4-yl)butane-1-one (Z,E)

Le même mode opératoire que pour la synthèse des molécules **26** et **35** a été suivi, en partant du composé **37**. Une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 95% (7,12 g).



38

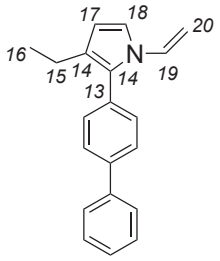
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 9,54 (s, 1H, O*H*), 7,72 (d, 2H, J_{H-H} = 8,2 Hz, H_9, H_4), 7,64 (m, 4H, H_3, H_5, H_8, H_{12}), 7,48 (t, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_2, H_6), 7,39 (t, 1H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_1), 2,88 (t, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_{14}), 1,68 (m, 2H, H_{15}), 1,05 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{16}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 159,5 (C_{13}), 142,0 (C_7), 140,5 (C_4), 134,8 (C_{10}), 129,0, 127,7 (C_1), 127,4, 127,3, 126,9, 28,2 (C_{14}), 20,0 (C_{15}), 14,5 (C_{16}) ppm.

F = 117°C.

$C_{16}H_{17}NO$: 239,13.

3-éthyl-2-(1-biphényle-4-yl)-1-vinyle-1*H*-pyrrole



32

Le même mode opératoire que pour les composés **28** et **29** a été utilisé, en partant de l'oxime **38**. Un solide marron est obtenu avec un rendement de 20% (700 mg).

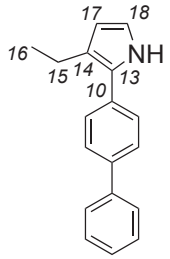
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,70-7,64 (m, 4H, H_8, H_9, H_{11}, H_{11}), 7,47 (m, 2H, H_3, H_5), 7,37 (m, 3H, H_1, H_2, H_6), 7,10 (d, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{18}), 6,77 (dd, 1H, J_{H-H} = 15,6 Hz, 8,7 Hz, H_{19}), 6,27 (d, 1H, J_{H-H} = 2,8 Hz, H_{17}), 5,10 (d, 1H, J_{H-H} = 15,6 Hz, H_{20}, 4,59 (d, 1H, J_{H-H} = 9,2 Hz, $H_{20'}$), 2,49 (q, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{15}), 1,18 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{16}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 140,8 (C_7), 140,1 (C_4), 132,1 (C_{19}), 131,4 (C_2, C_6), 130,8 (C_{10}), 129,6 (C_{13}), 129,0 (C_3, C_5), 127,6 (C_1), 127,2 (C_9, C_{11}), 127,0 (C_8, C_{12}), 125,7 (C_{14}), 116,7 (C_{18}), 110,2 (C_{17}), 97,2 (C_{20}), 19,5 (C_{15}), 15,9 (C_{16}) ppm.

F = 78°C

$C_{20}H_{19}N$: 273,15.

3-éthyl-2-(1-biphényl-4-yl)-1-pyrrole



30

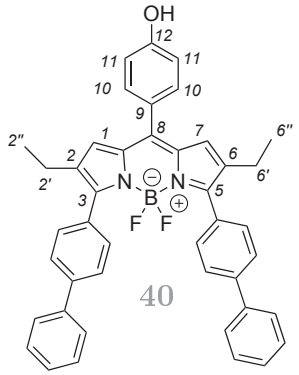
Le composé **30** est obtenu de la même façon que les composés **28** et **39**, c'est à dire par déprotection du composé **32**. Des cristaux oranges sont obtenus avec un rendement de 95% (600 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,17 (s, 1H, N*H*), 7,69-7,64 (m, 4H, H_8, H_9, H_{10}, H_{11}), 7,50-7,45 (m, 4H, H_2, H_3, H_5, H_6), 7,36 (m, 1H, H_1), 6,84 (t, 1H, J_{H-H} = 2,5 Hz, H_{18}), 6,27 (t, 1H, J_{H-H} = 2,5 Hz, H_{17}), 2,74 (q, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{15}), 1,29 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{16}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 140,8 (C_7), 138,9 (C_4), 132,9 (C_{13}), 129,0 (C_2, C_6), 127,5 (C_9, C_{11}), 127,4, 127,2, 127,1 (C_3, C_5, C_8, C_{12}), 123,5 (C_{14}), 117,8 (C_{18}), 110,2 (C_{17}), 19,9 (C_{15}), 15,7 (C_{16}) ppm.

$C_{18}H_{17}N$: 247,14.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-hydroxyphényl)-5,3-biphényl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacène



40

Le même mode opératoire que pour les BODIPY phénol **2**, **33**, **36** a été suivi en partant du pyrrole **30**. Le produit brut est purifié sur gel de silice (EP puis EP/DCM : 1/1). Une poudre violette est obtenue avec un rendement de 16 % (130 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,65-7,58 (m, 16H, H_{Ar}), 7,42 (m, 4H, H_{Ar}), 7,33 (m, 2H, H_{Ar}), 6,76 (s, 2H, H_1, H_7), 2,39 (m, 4H, $H_{2',6'}$), 1,08 (m, 6H, $H_{2'',6''}$) ppm.

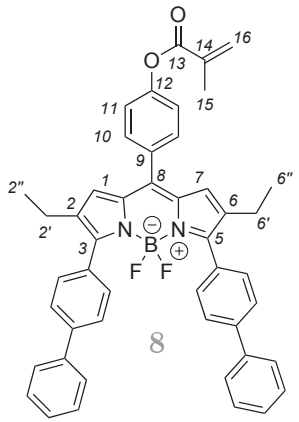
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 156,5 (C_{12}), 141,5, 140,7, 136,3, 134,4, 132,5, 131,0, 130,2, 129,1, 128,8, 127,9, 127,5, 127,3, 126,7, 115,2 (C_{11}), 19,6 ($C_{2',6'}$), 14,7 ($C_{2'',6''}$) ppm.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = - 133,2 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = - 0,03 (t, J_{B-F} = 32,0 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z [M - H]$^+$ calculé pour $C_{43}H_{34}BF_2N_{20}$: 643,2752, trouvé : 643,2732.

2,6-diéthyl-4,4-difluoro-8-(4-(méthacryloylloxy)phényl)-5,3-biphényl-4-bora-3a,-4a-diaza-*s*-indacène



8

Le même protocole d'estérification que pour la synthèse du BODIPY méthacrylate **1** a été utilisé, en partant du BODIPY **40**. Le produit brut est purifié une première fois sur gel de silice (EP puis gradient EP/DCM) et une seconde fois sur gel de silice fine (cyclohexane puis cyclochexane/DCM : 1/2). Une poudre violette est obtenue avec un rendement de 30% (42 mg).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,68-7,60 (m, 16H, H_{Ar}), 7,42 (m, 4H, H_{Ar}), 7,35 (m, 2H, H_{Ar}), 6,74 (s, 2H, $H_{1,7}$), 6,44 (s, 1H, H_{16}), 5,85 (s, 1H, $H_{16'}$), 2,39 (q, 4H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2',6'}$), 2,13 (s, 3H, H_{15}), 1,08 (t, 6H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{2'',6''}$) ppm.

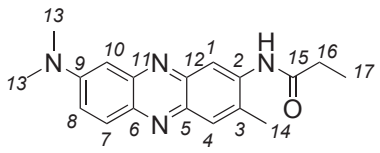
RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 165,8 (C_{13}),156,8 (C_{12}), 152,4, 141,6, 140,8, 136,5, 135,8, 134,5, 132,4, 131,8, 131,1, 130,3, 128,9, 128,1 (C_{16}), 128,0, 127,6, 127,3, 126,7, 121,8 (C_{11}), 19,6 ($C_{2',6'}$), 18,6 (C_{15}), 14,6 ($C_{2'',6''}$) ppm.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) : δ = -133,3 (q, J_{F-B} = 32,3 Hz) ppm.

RMN ^{11}B (128 MHz, $CDCl_3$) : δ = -0,02 (t, J_{B-F} = 30,8 Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calculé pour $C_{47}H_{39}BF_2N_2O_2Na$: 735,2953, trouvé : 735,2970.

N-(9-(diméthylamino)-3-méthylphénazine-2-yl)propionamide



19

Dans un ballon monocol de 100mL, le chlorure de propionyle (1,2 équiv., 0,6 mmol, 66 μL) et l'EDC (1,5 équiv., 0,75 mmol, 155 mg) sont dilués dans 20 mL de THF fraîchement distillé. Le Neutral Red (1 équiv., 0,5 mmol, 145 mg) est ajouté 20 minutes plus tard, suivi par un ajout de triéthylamine (3 équiv., 1,5 mmol, 152 mg). La solution initialement violette devient marron. La réaction est poursuivie pendant 48 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est dissous dans 100 mL de dichlorométhane et lavé par 100 mL d'eau basique, puis 100 mL d'eau distillée, puis enfin par 100 mL d'une solution saturée de NaCl. Les phases aqueuses réunies sont à nouveau extraites au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et filtrée. Le solvant est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié sur gel de silice (DCM/EtOH : 95/5). Une poudre rouge sombre est obtenue avec un rendement de 20%.

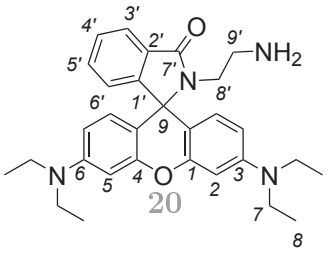
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 8,73 (s, 1H, N*H*), 7,95 (d, 1H, H_{10}, J_{H-H} = 9,6 Hz), 7,87 (s, 1H, H_1), 7,50 (dd, 1H, J_{H-H} = 9,6, 2,8 Hz, H_8), 7,36 (s, 1H, H_4), 7,02 (d, 1H, J_{H-H} = 2,8 H_7), 3,16 (s, 6H, H_{13}), 2,50 (m, 5H, H_{14}, H_{16}), 1,32 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_{17}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 172,3 (C_{15}), 151,0 (C_9), 145,6, 143,9, 138,9, 138,7, 138,3, 130,1, 129,7, 122,2, 103,0, 40,6 (C_{13}), 31,1 (C_{16}), 18,6 (C_{14}), 10,0 (C_{17}) ppm.

F = 250°C.

$C_{18}H_{20}N_4O$: 308,16.

3,6-bis(diéthylamino)-spiro[isoindoline-1',9-xanthène]-2'-amidoéthylamine



20

La synthèse de ce réactif a été réalisée selon des protocoles décrits dans la littérature (composé 3 [355], composé 1 [356]). À une solution d'éthylènediamine (4 équiv., 2 mmol, 130 μL) dans l'éthanol (5mL) est ajoutée en 5 min à l'ampoule de coulée une solution de Rhodamine B acide (0.5 mmol, 240 mg) dans l'éthanol (20mL). Après ajout, le mélange est porté à reflux pendant une nuit. La réaction n'étant que partiellement terminée, un excès d'éthylènediamine (2 mL) est ajouté au milieu réactionnel et le mélange est à nouveau porté à reflux pendant 4h, jusqu'à décoloration partielle du milieu. Le solvant est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif. 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 1M sont ajoutés, puis au goutte à goutte environ 50 mL d'une solution de soude à 1M, jusqu'à obtenir un pH d'environ 9. La rhodamine précipitée en phase aqueuse basique est extraite 3 fois avec 100 mL de dichlorométhane puis la phase organique est lavée avec 100 mL

d'une solution de saumure. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée sous vide. Une poudre légère orange pâle est obtenue avec un rendement de 85% (211 mg).

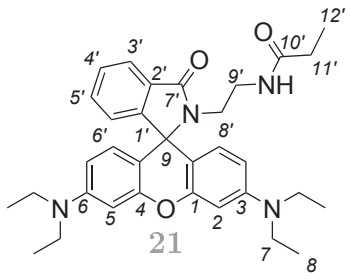
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,78 (s, 1H, $H_{3'}$), 7,43 (m, 2H, $H_{4'}$, $H_{5'}$), 7,10 (d, J_{H-H} = 7,3 Hz, $H_{6'}$), 6,48 (d, 2H, J_{H-H} = 9,2 Hz, H_{xan}), 6,37 (d, 2H, J_{H-H} = 2,3 Hz, H_{xan}), 6,28 (dd, 2H, J_{H-H} = 2,8, 8,7 Hz, H_{xan}), 3,32 (m, 10H, H_7, $H_{8'}$), 2,45 (t, 2H, J_{H-H} = 6,4 Hz, $H_{9'}$), 1,16 (t, 12H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_8) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 169,0($C_{7'}$), 153,7, 153,3, 148,9, 132,6, 131,1, 128,8, 128,2, 123,9, 122,9, 108,3 (C_{xan}), 105,5 (C_{xan}), 97,8 (C_{xan}), 65,2 (C_9), 44,5 (C_7), 43,2 ($C_{8'}$), 40,9 ($C_{9'}$), 12,7 (C_8) ppm.

F = 190°C.

$C_{30}H_{36}N_4O_2$: 484,28.

3,6-bis(diéthylamino)-spiro[isoindoline-1',9-xanthène]-2'-(amidoéthyl) propionamide



21

À une solution de chlorure de propionyle (1,2 équiv., 0,12 mmol, 13 μL) dans le dichlorométhane sec (5 mL) est ajouté l'EDC (1,5 équiv., 0,15 mmol, 31 mg). Le mélange est dégazé à l'argon pendant 15 minutes. La Rhodamine **20** (1 équiv., 0,1 mmol, 48 mg) est alors ajoutée. Le mélange est rose fluorescent. Enfin, la triéthylamine (3 équiv., 0,3 mmol, 40 μL) est ajoutée et le mélange devient rose pâle. L'expérience est poursuivie pendant 5 jours à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif et purifié par chromatographie sur gel de silice fine (DCM puis DCM/EtOH : 90/10). Une poudre rose-orangé pâle est obtenue avec un rendement d'environ 50% ($\approx$ 25 mg).

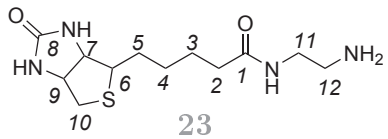
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 7,89 (m, 1H, $H_{3'}$), 7,44 (m, 2H, $H_{4'}$, $H_{5'}$), 7,07 (m, 1H, $H_{6'}$), 6,79 (s, 1H, N*H*), 6,41 (m, 2H, H_{xan}), 6,36 (d, 2H, J_{H-H} = 2,3 Hz, H_{xan}), 6,26 (dd, 2H, J_{H-H} = 2,5, 10,1 Hz, H_{xan}), 3,31 (m, 10H, H_7, $H_{8'}$), 3,05 (m, 2H, $H_{9'}$), 2,08 (q, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{11'}$), 1,15 (t, 12H, J_{H-H} = 7,2 Hz, H_8), 1,09 (t, 3H, J_{H-H} = 7,6 Hz, $H_{12'}$) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 174,0 ($C_{10'}$), 170,0 ($C_{7'}$), 153,9, 153,4, 149,0, 132,9, 130,6, 128,5, 128,3, 124,0, 122,9, 108,3 (C_{xan}), 104,8 (C_{xan}), 97,8 (C_{xan}), 65,8 (C_9), 44,4 (C_7), 40,6 ($C_{8'}$), 40,4 ($C_{9'}$), 29,8 ($C_{11'}$), 12,7 (C_8), 10,0 ($C_{12'}$) ppm.

F = 165°C.

$C_{33}H_{40}N_4O_3$: 540,31.

N-(2-aminoéthyl)biotinamide



23

La synthèse de cette molécule a été réalisée en adaptant deux protocoles décrits dans la littérature (composé 0076 [371], composé B-ED [370]).

Dans un ballon monocol, placé sous atmosphère d'argon, la biotine (1 mmol, 244 mg) est dissoute dans 20 mL de DMF à 50°C. Une fois la biotine solubilisée, la solution est thermostatée à 4°C. Une solution de DCC (1,3 équiv., 1,3 mmol, 268 mg) et de NHS (2 équiv., 2 mmol, 230 mg) dans 2 mL de DMF est ajoutée. Enfin, 15 minutes après, l'éthylènediamine (20 équiv., 20 mmol, 1,3 mL) est ajoutée à la micropipette. On observe la formation d'un précipité blanc. La réaction est poursuivie durant une nuit. Le précipité est filtré sur fritté et rincé au DCM.

CCM (1-propanol : acide acétique : eau, 80 : 8 : 12) : une tache présentant un rapport frontal de 0,18, positive à une révélation à l'iode et à la ninhydrine.

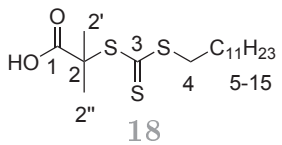
IR : 3510 (élongation NH), 1672, 1638 (vibration C=O amide), 1629 (vibration C=O amide), 1539 (vibration CNH), 1413, 1240, 1089 cm^{-1}.

HRMS (ESI) m/z : $[M + Na]^+$ calculé pour $C_{12}H_{22}N_{402}SNa$, trouvé : 535,2124. Cette masse molaire correspondond au dimère de la biotinamide ($C_{22}H_{36}N_6O_4S_2Na$).

7.2.3 Synthèse macromoléculaire

Synthèse d'agents RAFT

Acide 2-(dodécylthiocarbonothioylthio)-2-méthylpropanoïque : TTCA



18

La synthèse de cet agent de transfert a été réalisée au Laboratoire de Chimie des Polymères par M. Chuong Bui, selon un protocole décrit dans la littérature [387].

Le bromure de tétraéthylammonium (0,04 équiv., 0,01 mol, 3,24 g) est mis en solution dans 300 mL d'acétone. L'ensemble est placé dans un bain de glace. Le dodécane-1-thiol (0,25 mol, 60 mL) est ensuite ajouté. Le milieu réactionnel est dégazé pendant 20 min. à l'azote. 42 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 25 M sont alors ajoutés à l'aide

d'une ampoule de coulée pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est blanc laiteux. Une solution de sulfure de carbone (1 équiv., 0,25 mol, 15 mL) dans l'acétone (38 mL) est ensuite ajoutée à l'aide de l'ampoule de coulée en 1h30 : la solution passe du blanc au jaune. Le milieu réactionnel est encore agité pendant 50 min. puis 250 mL de chloroforme sont ajoutés. Par la suite, 200 mL d'une solution de NaOH à 25 M sont ajoutés pendant 3 à 5 heures. Le mélange est alors agité à température ambiante pendant une nuit. Le lendemain, la phase aqueuse est devenue jaunâtre alors que la phase organique est marron. Le mélange est transvasé dans un bécher dans lequel est ajouté 330 mL d'eau distillée. 65 mL d'acide chlorhydrique concentré sont alors ajoutés, le mélange étant maintenu dans un bain de glace. Le produit est extrait à l'aide de 2x600 mL de dichlorométhane puis la phase organique évaporée à l'évaporateur rotatif. Enfin, le produit est purifié par deux recristallisations dans l'hexane puis séché sous vide à température ambiante. Un solide jaune est obtenu avec un rendement de 42%.

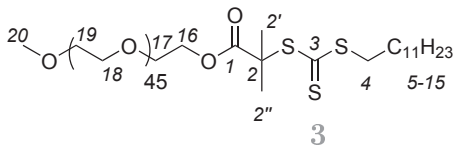
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 3,29 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_4), 1,74 (s, 6H, $H_{2'}$, $H_{2''}$), 1,66 (qt, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_5), 1,38 (m, 2H, H_6), 1,25 (m, 16H, H_{7-14}), 0,88 (t, 3H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{15}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 221,1 (C_3), 176,8 (C_1), 55,5 (C_2), 37,2 (C_4), 32,0, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 29,1, 27,9 (C_5-C_{13}), 25,4 ($C_{2'}$, $C_{2''}$), 22,8 (C_{14}), 14,2 (C_{15}) ppm.

CAS : 461642-78-4.

$C_{17}H_{32}O_2S_3$: 364,16.

Macro-agent RAFT à base de PEO dérivé du TTCA : PEO-TTC



3

La synthèse de ce macro-agent de transfert a été réalisée au Laboratoire de Chimie des Polymères (UMR 7610) par Mme Jutta Rieger, selon un protocole décrit dans la littérature [272].

Le polyéthylène oxyde monométhoxy (PEO) fonctionnalisé alcool (2000 g/mol, 2,5 mmol, 5g) est d'abord séché avec du toluène en réalisant un montage azéotropique sous la rampe à vide/azote. L'opération est réalisée 3 fois et le PEO est laissé une nuit sous vide. Une solution de TTCA **18** (2 équiv., 5 mmol, 1,82 g), de DCC (2 équiv., 5 mmol, 1,03 g) et de DMAP (0,2 équiv., 0,5 mmol, 0,06 g) dans 40 mL de DCM anhydre est alors introduite sous atmosphère d'azote à l'aide d'une canule dans un ballon contenant le PEO sec. La réaction d'estérification est poursuivie pendant 120 h à température ambiante. Le polymère est purifié par précipitation dans l'éther diéthylique froid. Après filtration, le produit est séché sous vide à 40°C. Une poudre jaune est obtenue avec un rendement de 90%. Fonctionnalisation des chaînes > 95% (RMN ^{1}H).

M_n (RMN ^{1}H) = 2420 g/mol, DP_n = 45.

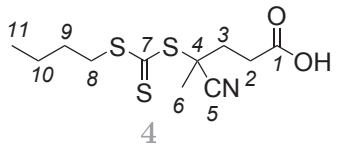
CES (THF, calibration PMMA) = M_n = 3380 g/mol, I_P = 1,06.

CES (THF, calibration PS) = M_n = 3320 g/mol, I_P = 1,06.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ = 4,23 (t, 2H, J_{H-H} = 4,8 Hz, H_{16}), 3,6 (m, 182H, H_{17}, H_{18}, H_{19}), 3,36 (s, 3H, H_{20}), 3,24 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_4), 1,67 (s, 6H, $H_{2'}$, $H_{2''}$), 1,62 (m, 2H, H_5), 1,23 (m, 18H, H_6 - H_{14}), 0,86 (t, 3H, J_{H-H} = 6,6 Hz, H_{15}) ppm. .

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 221,5 (C_3), 172,9 (C_1), 72,0 ($C_{19\ term.}$), 70,6 (C_{18}, C_{19}), 68,9 (C_{17}), 65,1 (C_{16}), 59,1 (C_{20}), 56,0 (C_2), 37,0 (C_4), 32,0, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 29,2, 29,0, 27,9 (C_5-C_{13}), 25,4 ($C_{2'}$, $C_{2''}$), 22,7 (C_{14}), 14,2 (C_{15}) ppm.

Acide 4-cyano-4-(thio-thiobutylsulfanyl) pentanoïque : CN-TTCA



4

La synthèse de cet agent de transfert a été réalisée en quatre étapes ; elle est adaptée d'un protocole fourni par le Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation de Lyon, lui-même inspiré de la littérature [388, 389].

Première étape

Le butane-1-thiol (224 mmol, 24 mL) est dissous dans 100 mL d'éther diéthylique dans un ballon de 250 mL, mis sous agitation et dégazé à l'argon. L'hydrure de sodium (1,2 équiv., 269 mmol, 10,75 g) est ajouté en solide par petites portions puis la réaction est poursuivie pendant 15 min. Le buthylthiolate de sodium précipite et est isolé par essorage sur fritté, lavé avec de l'éther diéthylique (2 fois 25 mL) et enfin séché sous vide. Une poudre blanche est obtenue dans un rendement quantitatif.

Deuxième étape

Dans un ballon tricol équipé d'un thermomètre, d'un réfrigérant avec bulleur et d'une ampoule de coulée, le buthylthiolate (240 mmol, 26,9 g) est dissous dans 300 mL de THF anhydre. Le ballon est alors placé dans un bain d'azote liquide, sous flux d'azote. Une fois la température stabilisée vers 0°C, le flux d'azote est arrêté et le sulfure de carbone (1,2 équiv., 288 mmol, 17,4 mL) placé dans l'ampoule de coulée avec 15 mL de THF anhydre. L'ajout se fait en une heure, en contrôlant toujours que la température n'excède pas 0°C. La solution incolore prend une couleur jaune-orangé. Une fois l'ajout terminé, la réaction est laissée revenir à température ambiante. Le produit brut est purifié par filtration sur fritté, le filtrat récupéré et évaporé à sec à l'évaporateur rotatif. Une huile jaune-orangé est obtenue avec un rendement quantitatif.

Troisième étape

Dans un ballon tricol, le sel de trithiocarbonate précédemment obtenu (240 mmol, 45 g) est dissout dans 60 mL d'eau. Une solution de ferricyanure de potassium (1,15 équiv., 276 mmol, 91 g) dans 300 mL d'eau permutée est ajoutée à l'ampoule de coulée pendant trois heures. Après addition, la solution est encore agitée pendant une heure. Le produit brut est extrait avec 4 fois 200 mL d'éther diéthylique puis les phases organiques réunies sont alors lavées à l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif. 31 g d'une huile rouge-orangé sont obtenus avec un rendement de 78%. Une brève analyse en RMN ^{13}C dans le $CDCl_3$ montre un pic à 221 ppm (C=S) ainsi que des pics caractéristiques d'une chaîne butane.

Quatrième étape

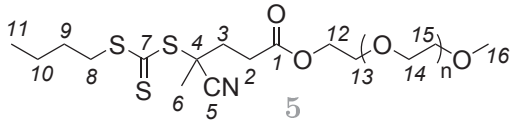
Le dimère de trithiocarbonate (94 mmol, 31g) et l'ACPA (1,1 équiv., 103 mmol, 29 g) sont dissous dans 300 mL d'acétate d'éthyle. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit. Le produit brut est évaporé sous vide à l'évaporateur rotatif puis purifié sur une colonne flash de silice. L'éluant de départ est l'héxane afin d'éliminer le dimère puis il est progressivement remplacé par l'acétate d'éthyle afin de récupérer le produit désiré. Une deuxième colonne (AcOEt/EtP : 3/20) est nécessaire afin d'obtenir le produit totalement pur. Une huile jaune-orangé est obtenue avec un rendement de 70%.

RMN ^1H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ = 11,22 (s, 1H, OH), 3,29 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_8), 2,62 (m, 2H, H_2), 2,36 (m, 2H, H_3), 1,82 (s, 3H, H_6), 1,63 (qt, 2H, J_{H-H} = 7,4 Hz, H_9), 1,38 (st, 2H, J_{H-H} = 7,1 Hz, H_{10}), 0,88 (t, 3H, J_{H-H} = 7,2 Hz, H_{11}) ppm.

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) : δ = 216,7 (C_7), 176,9 (C_1), 118,7 (C_5), 46,1 (C_4), 36,6 (C_8), 33,3, 29,6, 29,4, 24,6, 21,9, 13,5 (C_{11}) ppm.

$C_{11}H_{17}NO_2S_3$: 291,05.

Macro-agent RAFT à base de PEO dérivé du CN-TTCA : PEO-CN-TTC



5

La synthèse de ce macro-agent de transfert a été réalisée suivant la procédure donnée dans la littérature [271, 390].

Le poly(pxyde d'éthylène) monométhoxy (PEO) fonctionnalisé alcool (2000 g/mol, 9,75 mmol, 19,5 g) est d'abord séché avec du toluène en réalisant un montage azéotropique sous la rampe à vide/azote. L'opération est réalisée trois fois et le PEO est laissé une nuit sous vide. Le PEO est alors dissout dans un minimum de dichlorométhane sec. Parallèlement à cela, l'agent RAFT **4** (2,1 équiv., 20,5 mmol, 6 g) est dissout dans 70 mL de dichlorométhane sec auquel est ajoutée la DMAP (0,2 équiv., 1,8 mmol, 0,64 g). La solution est transférée par canule au ballon contenant le PEO. Enfin, le DCC

(2,2 équiv., 21,5 mmol, 4,4 g) est dissout dans 18 mL de dichlorométhane et ajouté à l'ampoule de coulée pendant 1h30 à température ambiante. La réaction est poursuivie pendant 6 jours. Le produit est purifié par deux précipitations dans l'éther diéthylique à froid puis une dernière fois de la même manière mais en l'ayant au préalable dissout dans du dichlorométhane. Une poudre jaune est obtenue.

M_n (RMN ^{1}H) = 2290 g/mol.

CES (THF, calibration PMMA) : M_n = 3370 g/mol, I_P = 1,06.

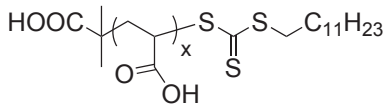
CES (THF, calibration PS) : M_n = 3320 g/mol, I_P = 1,07.

RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ = 4,24 (m, 2H, H_{12}), 3,63 (m, 214H, H_{13}, H_{14}, H_{15}), 3,37 (s, 3H, H_{16}), 3,33 (t, 2H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_8), 2,65 (t, 2H, J_{H-H} = 11 Hz, H_2), 2,50 (m, 2H, H_3), 2,37 (m, 2H, $H_{3'}$), 1,86 (s, 3H, H_6), 1,67 (qt, 2H, J_{H-H} = 7,6 Hz, H_9), 1,42 (st, 2H, J_{H-H} = 7,8 Hz, H_{10}), 0,93 (t, 3H, J_{H-H} = 7,3 Hz, H_{11}) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ = 217,0 (C_7), 171,5 (C_1), 119,1 (C_5), 72,0 (C_{14} et C_{15}), 70,7 (C_{14} et C_{15}), 69,1 (C_{14} et C_{15}), 64,2 (C_{12}), 59,1 (C_{16}), 46,4 (C_4), 36,8 (C_8), 33,9, 29,8, 24,9, 22,2, 13,7 (C_{11}) ppm.

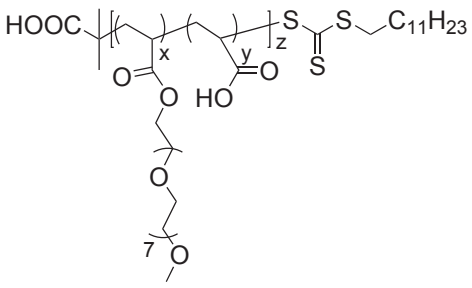
Polymérisation en milieu homogène : synthèse de macro-agents RAFT à base de poly(oxyde d'éthylène) et d'acide acrylique

Macro-agents RAFT PEO_{45}-*b*-PAA_{7-19}-TTC



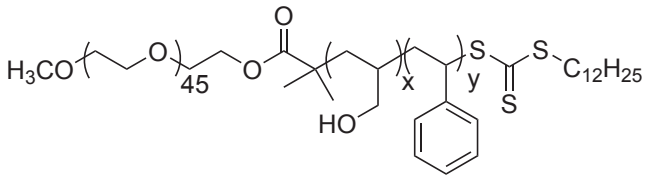
Les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-TTC-C_{12} sont synthétisés dans le 1,4-dioxane à 75°C. Dans une expérience classique, le macro-agent RAFT PEO-TTC (0,5 mmol, 1,21 g, M_n = 2420 g/mol), l'acide acrylique (20 équiv., 10 mmol, 720 mg) et le DMF (4 équiv., 2 mmol, 146 mg) (utilisé comme référence interne pour la RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ pour quantifier la conversion de l'acide acrylique) sont dissous dans 4.9 mL de dioxane à température ambiante. Puis 0,1 mL d'une solution à 0,33 M d'ACPA dans le dioxane (fraîchement réalisée) est ajoutée au mélange réactionnel. L'ensemble est dégazé à l'argon pendant 30 min dans un bain de glace, puis placé dans un bain d'huile thermostaté à 75°C. Le temps initial (ou t_0) est pris comme étant le moment où le ballon est placé dans le bain d'huile. Après 90 min, la réaction est stoppée à l'aide d'une trempe dans l'eau à 0°C. La conversion du monomère est déterminée par RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ ou par gravimétrie (équation 7.1). Les copolymères présentant un nombre d'acide acrylique supérieur à 15 ont pu être précipités dans le *n*-pentane à 0°C. Enfin, le produit est séché sous rampe à vide en chauffant à 50°C environ afin d'éliminer les traces d'acide acrylique et de solvants.

Macro-agents RAFT P(APEO$_x$-*co*-AA$_y$)-TTC



Les macro-agents RAFT P(APEO$_x$-*co*-AA$_y$) ont été synthétisés suivant le même protocole général que les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA. L'agent RAFT moléculaire TTCA **18** (1 équiv., 1,3 mmol, 485 mg), l'acide acrylique (7,5 équiv., 10 mmol, 720 mg), l'acrylate de PEO (7,5 équiv., 10 mmol, 4540 mg) et le DMF (3 équiv., 4 mmol, 292 mg) sont dissous dans 9 mL de dioxane à température ambiante. Ensuite, 1 mL d'une solution d'ACPA à 0,09 M dans le dioxane est ajouté au mélange réactionnel. L'ensemble est dégazé à l'argon pendant 30 min dans un bain de glace, puis placé dans un bain d'huile thermostaté à 75°C. Après 2h environ, la réaction est stoppée à l'aide d'une trempe dans l'eau à 0°C. Les conversions des monomères sont déterminées par RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$. Le copolymère est ensuite purifié par deux précipitations dans le *n*-pentane refroidi dans un bain eau/glace puis séché sous vide en chauffant à 50°C environ et sous agitation. En variant les rapports entre acide acrylique, acrylate de PEO et agent RAFT, il est possible d'obtenir par le même protocole des homopolymères de poly(acide acrylique), ou de poly(acrylate de PEO), ou des copolymères à rapports variables en monomères.

Macro-agents RAFT PEO$_{45}$-*b*-PAA$_{7-19}$-*b*-PS$_y$-TTC



Les macro-agents RAFT PEO-*b*-PAA-*b*-PS ont été synthétisés suivant le même protocole général que leurs précurseurs PEO-*b*-PAA. Le macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA (0,135 mmol, 443 mg), le styrène (100 équiv., 13,5 mmol, 1400 mg), le DMF (20 équiv., 2,7 mmol, 197 mg) sont dissous dans 3 mL de dioxane. Puis, 1 mL d'une solution d'ACPA dans le dioxane à 0,027 M est ajouté. L'ensemble est dégazé à l'argon pendant 30 min dans un bain de glace, puis placé dans un bain d'huile thermostaté à 80°C. Après 3h, la réaction est stoppée à l'aide d'une trempe dans l'eau glacée. La conversion du monomère est déterminée par RMN ^{1}H dans le $CDCl_3$ ou par gravimétrie. Le copolymère est ensuite séché sous rampe à vide en chauffant à 50°C environ afin d'éliminer les traces de styrène et de solvants. En variant le rapport entre styrène et macro-agent RAFT, il est possible

d'obtenir par le même protocole des copolymères à bloc possédant différentes tailles de bloc hydrophobe.

Polymérisation en milieu hétérogène

Synthèse en miniémulsion des nanoparticules à cœur styrène : synthèse en une étape

Le macro-agent RAFT PEO-*b*-PAA-*b*-PS (1 équiv., 0,027 mmol, 137 mg) et l'hexadécane (5% masse / styrène) sont dissous dans une solution d'AIBN (0,5 équiv., 0,013 mmol, 2,2 mg) dans le styrène (160 équiv., 4,3 mmol, 447 mg). Une fois le mélange homogène, 3 mL d'une solution basique de soude à 0,1 mM sont ajoutés. La dispersion est alors placée dans un bain de glace et agitée à l'aide d'une pointe à ultrasons (Bandelinelectronics, Sonoplus HD2200) réglée sur 130 W pendant 10 min. Enfin, la miniémulsion est placée dans un bain de glace et dégazée pendant 30 min à l'aide d'un flux d'argon puis fermée hermétiquement à l'aide d'un septum et placée dans un bain d'huile à 80°C. Des prélèvement réguliers peuvent être réalisés à l'aide d'une seringue et les conversions du styrène et du BODIPY sont respectivement déterminées par gravimétrie (équation 7.1) et par CES à l'aide d'une détection UV-vis. (équation 7.2).

Synthèse en miniémulsion des nanoparticules à cœur styrène et BODIPY : procédé "one-pot", deux étapes avec inversion de phase

Le macro-agent RAFT à base de PEO-*b*-PAA_{10} (1 équiv., $4{,}0 \times 10^{-2}$ mmol, 125 mg) est dissous dans un mélange de styrène (157 équiv., 6,3 mmol, 650 mg), d'AIBN (0,3 équiv., 2,2 mg, $1{,}3 \times 10^{-2}$ mmol) et de BDPMA (3,2 équiv., 0,13 mmol, 59 mg) dans un ballon de 5 mL fermé par un septum. La solution est placée dans un bain de glace et dégazée pendant 30 min à l'aide d'un flux d'argon, puis le ballon est placé dans un bain d'huile thermostaté à 80°C. La réaction est arrêtée 70 min plus tard par une trempe et 5 mL d'une solution de soude à 0,1 mM (12,5 équiv.) fraîchement préparée sont ajoutés. La solution est alors placée dans un bain de glace et agitée à l'aide d'une sonde à ultrasons (Bandelin electronic, Sonoplus HD2200) réglée sur 130 W pendant 10 min. Enfin, la miniémulsion est placée dans un bain de glace et dégazée pendant 30 min à l'aide d'un flux d'argon puis fermée hermétiquement à l'aide d'un septum et replacée dans un bain d'huile à 80°C afin de réamorcer la polymérisation. Des prélèvement réguliers peuvent être réalisés à l'aide d'une seringue et les conversions du styrène et du BODIPY peuvent être respectivement déterminées par gravimétrie (équation 7.1) et par CES à l'aide d'une détection UV-vis. (équation 7.2).

Remarque : le temps t_0 est pris comme étant le temps avant l'ajout d'eau basique (temps initial avant la miniémulsion).

Les mêmes protocoles de synthèse de nanoparticules en miniémulsion ont été employés pour les synthèses sans BODIPY ou à différents blocs hydrophiles ou hydrophobes (PAMA,

PMMA, P(APEO-co-AA)).

7.2.4 Greffages de molécules à fonction amine sur les unités acide acrylique de la couronne des nanoparticules

Les nanoparticules brutes après synthèse sont diluées dans l'eau à une concentration d'environ 1% (typiquement 0,5 mL de nanoparticules dans 4mL d'eau). Le nombre total d'unités acide acrylique présentes à la surface des nanoparticules est pris comme étant 1 équiv. En parallèle, si l'amine utilisée est un solide, celle-ci est dissoute dans l'éthanol (0,5 équiv. amine dans 0,5 mL d'éthanol). L'amine dissoute dans l'éthanol est ajoutée à la solution de nanoparticules (si l'amine est un liquide, comme l'éthanolamine, celle-ci est ajoutée directement) et le mélange placé à 4°C. Environ 10 min. plus tard, une solution d'EDC (4 équiv. dans 1mL) est ajoutée au mélange. La réaction est poursuivie pendant une nuit à 4°C et le mélange purifié par dialyse sur pores 12-14 kDa (Spectra/Por). L'eau utilisée pour les dialyses est de qualité ultra pure.

Dans le cas de greffage de protéines, celles-ci sont ajoutées après l'EDC et la suspension purifiée sur membranes de dialyse 300 kDa (Spectra/Por).

7.2.5 Culture cellulaire

La culture des cellules cancéreuses HeLa a été faite au laboratoire de biologie et pharmacologie appliquée de l'ENS Cachan (LBPA UMR 8113) avec l'aide de Mme Gladys Mbemba.

Les cellules adhérentes HeLa sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Gibco) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (décomplémenté à 56°C pendant 30 min - PAA Laboratoires), 1 % d'antibiotiques (pénicilline 50 U/mL/Streptomycine 50 μg/ml - Gibco) et 1 % de L-Glutamine (Gibco).

Les cellules sont maintenues à 37°C sous atmosphère contenant 100% d'humidité, 5% de CO_2. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine, après dissociation du tapis cellulaire avec un mélange trypsine/EDTA (Gibco).

Analyse par microscopie de fluorescence

Les cellules sont cultivées sur des plaques 48 puits (Falcon, S = 0,75 cm^2, V = 1,4 mL). Environ 2000 cellules sont déposées par puits. Vingt-quatre heure plus tard, les cellules sont rincées une fois par du PBS 1 ×. Puis 1 mL d'une solution de NPs (200 à 8 μg/mL) dans le PBS 1 × est ajouté. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C sous atmosphère saturée en humidité et à 5 % de CO_2. Les cellules sont alors rincées par 0,5 mL de PBS 1 × et placées dans 1 mL de PBS 1 ×. Après balayage de quelques concentrations, il s'avère que la concentration en NPFs la plus adaptée est de 67 μg/mL.

Les cellules incubées sont observées sous un microscope inversé Nikon Eclipse TE2000-U équipé d'un objectif longue distance CFI (Chrome-Free Infinity-Corrected) S Plan Fluor ELWD (Extra-Long Working Distance) (grossissement : × 20 (objectif) × 1,5 (lentille), ouverture numérique : 0,45, distance de travail : 8,2-6,9 mm). Les échantillons sont excités à l'aide d'un laser argon (Ion Laser Technology, OPTILAS, λ_{exc} = 488 nm, 0,027 W/μm^2). Deux filtres dichroïques sont utilisés. Le premier est un miroir dichroïque en excitation (MD499 - FITC Dichroic Filter, bande de réflexion : 470-490 nm (> 98%), bande passante : 508-675 nm , Thorlabs). Le second filtre dichroïque est placé en émission (LongPass Glass Filter, filtre passe haut : 523 nm).

Lorsque des NPFs présentent deux fluorophores comme le BDPMA et la FA, différents filtres en émission peuvent être utilisés : FA (517 nm, BandPass BrightLine FF01-517/20 Semrock) ou BDPMA (543 nm, BrightLine® Fluorescence Filters FF01-543/22-25 Semrock). À 517 nm, les échantillons sont observés durant 40 à 50 s et à 543 nm, durant 4 à 5 s.

La détection est réalisée à l'aide d'une caméra CCD CoolSNAP HQ2 Monochrome (taille des pixels : 6,45 μm × 6,45 μm, fréquence : 20 MHz).

Bibliographie

[1] B. Valeur, *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2002.

[2] S. E. Braslavsky, « Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006) », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 79, p. 293–465, 2007.

[3] T. Förster, « 10^{th} Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation », *Discussions of the Faraday Society*, vol. 27, p. 7–17, 1959.

[4] D. L. Dexter, « A theory of sensitized luminescence in solids », *Journal of Chemical Physics*, vol. 21, p. 836–850, 1953.

[5] R. R. Alfano, S. G. Demos et S. K. Gayen, « Advances in Optical Imaging of Biomedical Mediaa », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 820, p. 248–271, 1997.

[6] R. Weissleder, « A clearer vision for *in vivo* imaging », *Nature Biotechnology*, vol. 19, p. 316–317, 2001.

[7] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke et Y. Urano, « New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging », *Chemical Reviews*, vol. 110, p. 2620–2640, 2010.

[8] M. Monici, « Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications », *Biotechnology Annual Review*, vol. 11, p. 227–256, 2005.

[9] J. O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim et R. M. Strongin, « NIR dyes for bioimaging applications », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, p. 64–70, 2010.

[10] K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio et K. Suzuki, « Bright, Color-Tunable Fluorescent Dyes in the Vis/NIR Region : Establishment of New "Tailor-Made" Multicolor Fluorophores Based on Borondipyrromethene », *Chemistry - A European Journal*, vol. 15, p. 1096–1106, 2009.

[11] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng et C. Shi, « A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging », *Biomaterials*, vol. 32, p. 7127–7138, 2011.

[12] X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim et J. Yoon, « Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives », *Chemical Reviews*, vol. 112, p. 1910–1956, 2012.

[13] A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra et G. B. Behera, « Cyanines during the 1990s : A Review », *Chemical Reviews*, vol. 100, p. 1973–2012, 2000.

[14] Y. H. Lin, R. Weissleder et C. H. Tung, « Novel near-infrared cyanine fluorochromes : Synthesis, properties, and bioconjugation », *Bioconjugate Chemistry*, vol. 13, p. 605–610, 2002.

[15] K. Umezawa, D. Citterio et K. Suzuki, « Water-soluble NIR Fluorescent Probes Based on Squaraine and Their Application for Protein Labeling », *Analytical Sciences*, vol. 24, p. 213–217, 2008.

[16] L. Yuan, W. Lin, Y. Yang et H. Chen, « A Unique Class of Near-Infrared Functional Fluorescent Dyes with Carboxylic-Acid-Modulated Fluorescence ON/OFF Switching : Rational Design, Synthesis, Optical Properties, Theoretical Calculations, and Applications for Fluorescence Imaging in Living Animals », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, p. 1200–1211, 2012.

[17] Y.-S. Xie, K. Yamaguchi, M. Toganoh, H. Uno, M. Suzuki, S. Mori, S. Saito, A. Osuka et H. Furuta, « Triply N-Confused Hexaphyrins : Near-Infrared Luminescent Dyes with a Triangular Shape », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, p. 5496–5499, 2009.

[18] F. L. Arbeloa, T. L. Arbeloa, I. L. Arbeloa, I. Garcia-Moreno, A. Costela, R. Sastre et F. Amat-Guerri, « Photophysical and lasing properties of pyrromethene 567 dye in liquid solution : Environment effects », *Chemical Physics*, vol. 236, p. 331–341, 1998.

[19] R. F. Kubin et A. N. Fletcher, « Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes », *Journal of Luminescence*, vol. 27, p. 455–462, 1982.

[20] M. M. Martin et L. Lindqvist, « The pH dependence of fluorescein fluorescence », *Journal of Luminescence*, vol. 10, p. 381–390, 1975.

[21] M. Cooper, A. Ebner, M. Briggs, M. Burrows, N. Gardner, R. Richardson et R. West, « Cy3B^{TM} : Improving the Performance of Cyanine Dyes », *Journal of Fluorescence*, vol. 14, p. 145–150, 2004.

[22] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis et A. S. Waggoner, « Cyanine dye labeling reagents : Sulfoindocyanine succinimidyl esters », *Bioconjugate Chemistry*, vol. 4, p. 105–111, 1993.

[23] N. C. Shaner, P. A. Steinbach et R. Y. Tsien, « A guide to choosing fluorescent proteins », *Nature Methods*, vol. 2, p. 905–909, 2005.

[24] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke et T. Nann, « Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels », *Nature Methods*, vol. 5, p. 763–775, 2008.

[25] C.-C. Fu, H.-Y. Lee, K. Chen, T.-S. Lim, H.-Y. Wu, P.-K. Lin, P.-K. Wei, P.-H. Tsao, H.-C. Chang et W. Fann, « Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, p. 727–732, 2007.

[26] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen et Y.-C. Yu, « Bright Fluorescent Nanodiamonds : No Photobleaching and Low Cytotoxicity », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, p. 17604–17605, 2005.

[27] P. Zrazhevskiy, M. Sena et X. Gao, « Designing Multifunctional Quantum Dots for Bioimaging, Detection, and Drug Delivery », *Chemical Society Reviews*, vol. 42, p. 4326–4354, 2010.

[28] F. G. Prendergast et K. G. Mann, « Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from Aequorea forskalea », *Biochemistry*, vol. 17, p. 3448–3453, 1978.

[29] R. H. Newman, M. D. Fosbrink et J. Zhang, « Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells », *Chemical Reviews*, vol. 111, p. 3614–3666, 2011.

[30] M. Tantama, Y. P. Hung et G. Yellen, « Imaging Intracellular pH in Live Cells with a Genetically-Encoded Red Fluorescent Protein Sensor », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, p. 10034–10037, 2011.

[31] F. L. Arbeloa, J. Bañelos, V. Martãnez, T. Arbeloa et I. L. Arbeloa, « Structural, photophysical and lasing properties of pyrromethene dyes », *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 24, p. 339–374, 2005.

[32] A. Treibs et F.-H. Kreuzer, « Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen », *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 718, p. 208–223, 1968.

[33] A. Loudet et K. Burgess, « BODIPY Dyes and Their Derivatives : Syntheses and Spectroscopic Properties », *Chemical Reviews*, vol. 107, p. 4891–4932, 2007.

[34] H. L. Kee, C. Kirmaier, L. H. Yu, P. Thamyongkit, W. J. Youngblood, M. E. Calder, L. Ramos, B. C. Noll, D. F. Bocian, W. R. Scheidt, R. R. Birge, J. S. Lindsey et D. Holten, « Structural control of the photodynamics of boron-dipyrrin complexes », *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, p. 20433–20443, 2005.

[35] W. Qin, V. Leen, T. Rohand, W. Dehaen, P. Dedecker, M. V. der Auweraer, K. Robeyns, L. V. Meervelt, D. Beljonne, B. V. Averbeke, J. N. Clifford, K. Driesen, K. Binnemans et N. Boens, « Synthesis, Spectroscopy, Crystal Structure, Electrochemistry, and Quantum Chemical and Molecular Dynamics Calculations of a 3-Anilino Difluoroboron Dipyrromethene Dye », *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 113, p. 439–447, 2008.

[36] B. Hinkeldey, A. Schmitt et G. Jung, « Comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy », *ChemPhysChem*, vol. 9, p. 2019–2027, 2008.

[37] M. D. Rahn, T. A. King, A. A. Gorman et I. Hamblett, « Photostability enhancement of Pyrromethene 567 and Perylene Orange in oxygen-free liquid and solid dye lasers », *Applied Optics*, vol. 36, p. 5862–5871, 1997.

[38] M. Ahmad, T. A. King, D.-K. Ko, B. H. Cha et J. Lee, « Photostability of lasers based on pyrromethene 567 in liquid and solid-state host media », *Optics Communications*, vol. 203, p. 327–334, 2002.

[39] A. C. I. Garcia-Moreno, F. A.-G. L. Campo, R. Sastre, J. B. P. M. Liras, F. Lopez Arbeloa et I. L. Arbeloa, « 8-Phenyl-Substituted Dipyrromethene BF_2 Complexes as Highly Efficient and Photostable Laser Dyes », *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, p. 3315 – 3323, 2004.

[40] F. Amat-Guerri, M. Liras, M. L. Carrascoso et R. Sastre, « Methacrylate-tethered Analogs of the Laser Dye PM567 : Synthesis, Copolymerization with Methyl Methacrylate and Photostability of the Copolymers », *Photochemistry and Photobiology*, vol. 77, p. 577–584, 2003.

[41] M. K. Kuimova, G. Yahioglu, J. A. Levitt et K. Suhling, « Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, p. 6672–6673, 2008.

[42] A. B. Descalzo, H.-J. Xu, Z. Shen et K. Rurack, « Red/Near-infrared Boron-Dipyrromethene Dyes as Strongly Emitting Fluorophores », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1130, p. 164–171, 2008.

[43] K. Yamada, T. Toyota, K. Takakura, M. Ishimaru et T. Sugawara, « Preparation of BODIPY probes for multicolor fluorescence imaging studies of membrane dynamics », *New Journal of Chemistry*, vol. 25, p. 667–669, 2001.

[44] B. A. Trofimov, *Advances in Heterocylic chemistry - Preparation of pyrroles from Ketoximes and Acetylenes*, vol. 51. Academics Press, 1990.

[45] E. Y. Schmidt, N. V. Zorina, M. Y. Dvorko, N. I. Protsuk, K. V. Belyaeva, G. Clavier, R. Méallet-Renault, T. T. Vu, A. I. Mikhaleva et B. A. Trofimov, « A General Synthetic Strategy for the Design of New BODIPY Fluorophores Based on Pyrroles with Polycondensed Aromatic and Metallocene Substituents », *Chemistry - A European Journal*, vol. 17, p. 3069–3073, 2011.

[46] T. Rohand, W. W. Qin, N. Boens et W. Dehaen, « Palladium-catalyzed coupling reactions for the functionalization of BODIPY dyes with fluorescence spanning the visible spectrum », *European Journal of Organic Chemistry*, 2006.

[47] M. P. Shandura, V. P. Yakubovskyi, A. O. Gerasov, O. D. Kachkovsky, Y. M. Poronik et Y. P. Kovtun, « α-Polymethine-Substituted Boron Dipyrromethenes – BODIPY-Based NIR Cyanine-Like Dyes », *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2012, p. 1825–1834, 2012.

[48] V. Leen, M. V. der Auweraer, N. Boens et W. Dehaen, « Vicarious Nucleophilic Substitution of α-Hydrogen of BODIPY and Its Extension to Direct Ethenylation », *Organic Letters*, vol. 13, p. 1470–1473, 2011.

[49] Z. Dost, S. Atilgan et E. U. Akkaya, « Distyryl-boradiazaindacenes : facile synthesis of novel near IR emitting fluorophores », *Tetrahedron*, vol. 62, p. 8484–8488, 2006.

[50] O. Galangau, *Synthèses et études de systèmes multichromophoriques à base de Bodipy®*. Thèse doctorat, ENS Cachan, 2011.

[51] O. Galangau, C. Dumas-Verdes, R. Meallet-Renault et G. Clavier, « Rational design of visible and NIR distyryl-BODIPY dyes from a novel fluorinated platform », *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 8, 2010.

[52] J. Chen, A. Burghart, A. Derecskei-Kovacs et K. Burgess, « 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes Modified for Extended Conjugation and Restricted Bond Rotations », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 65, p. 2900–2906, 2000.

[53] M. Wada, S. Ito, H. Uno, T. Murashima, N. Ono, T. Urano et Y. Urano, « Synthesis and optical properties of a new class of pyrromethenes BF_2 complexes fused with rigid bicyclo rings and benzo derivatives », *Tetrahedron Letters*, vol. 42, p. 6711–6713, 2001.

[54] W. L. Zhao et E. M. Carreira, « Conformationally restricted aza-bodipy : A highly fluorescent, stable, near-infrared-absorbing dye », *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 44, p. 1677–1679, 2005.

[55] J. Killoran, L. Allen, J. F. Gallagher, W. M. Gallagher et D. F. O'Shea, « Synthesis of BF_2 chelates of tetraarylazadipyrromethenes and evidence for their photodynamic therapeutic behaviour », *Chemical Communications*, 2002.

[56] M. Benstead, G. H. Mehl et R. W. Boyle, « 4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes (BODIPYs) as components of novel light active materials », *Tetrahedron*, vol. 67, p. 3573–3601, 2011.

[57] B. C. Popere, A. M. D. Pelle et S. Thayumanavan, « BODIPY-Based Donor-Acceptor π-Conjugated Alternating Copolymers », *Macromolecules*, vol. 44, p. 4767–4776, 2011.

[58] C. Thivierge, A. Loudet et K. Burgess, « Brilliant BODIPY-Fluorene Copolymers with Dispersed Absorption and Emission Maxima », *Macromolecules*, vol. 44, p. 4012–4015, 2011.

[59] M. Zhu, L. Jiang, M. J. Yuan, X. F. Liu, C. B. Ouyang, H. Y. Zheng, X. D. Yin, Z. C. Zuo, H. B. Liu et Y. L. Li, « Efficient Tuning Nonlinear Optical Properties : Synthesis and Characterization of a Series of Novel Poly(aryleneethynylene)s Co-Containing BODIPY », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 46, p. 7401–7410, 2008.

[60] V. R. Donuru, S. Zhu, S. Green et H. Liu, « Near-infrared emissive BODIPY polymeric and copolymeric dyes », *Polymer*, vol. 51, p. 5359–5368, 2010.

[61] A. B. Nepomnyashchii, M. Bröring, J. Ahrens et A. J. Bard, « Synthesis, Photophysical, Electrochemical, and Electrogenerated Chemiluminescence Studies. Multiple Sequential Electron Transfers in BODIPY Monomers, Dimers, Trimers, and Polymer », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, p. 8633–8645, 2011.

[62] A. Costela, I. Garcia-Moreno, M. Pintado-Sierra, F. Amat-Guerri, R. Sastre, M. Liras, F. L. Arbeloa, J. B. Prieto et I. L. Arbeloa, « New Analogues of the BODIPY Dye PM597 : Photophysical and Lasing Properties in Liquid Solutions and in Solid Polymeric Matrices », *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 113, p. 8118–8124, 2009.

[63] J. S. Lee, N. Y. Kang, Y. K. Kim, A. Samanta, S. H. Feng, H. K. Kim, M. Vendrell, J. H. Park et Y. T. Chang, « Synthesis of a BODIPY Library and Its Application to the Development of Live Cell Glucagon Imaging Probe », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, p. 10077–10082, 2009.

[64] D. Marks, R. Bittman et R. Pagano, « Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells », *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 130, p. 819–832, 2008.

[65] M. L. Metzker, « Substitued 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene compounds for 8-color DNA sequencing », *WO/2003/066812*, 2003.

[66] C. N. Baki et E. U. Akkaya, « Boradiazaindacene-appended calix[4]arene : Fluorescence sensing of pH near neutrality », *Journal of Organic Chemistry*, vol. 66, p. 1512–1513, 2001.

[67] M. Baruah, W. Qin, N. Basaric, W. M. D. Borggraeve et N. Boens, « BODIPY-Based Hydroxyaryl Derivatives as Fluorescent pH Probes », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 70, p. 4152–4157, 2005.

[68] N. Boens, V. Leen et W. Dehaen, « Fluorescent indicators based on BODIPY », *Chemical Society Reviews*, vol. 41, p. 1130–1172, 2012.

[69] S. D. Conner et S. L. Schmid, « Regulated portals of entry into the cell », *Nature*, vol. 422, p. 37–44, 2003.

[70] W. Zauner, N. A. Farrow et A. M. R. Haines, « In vitro uptake of polystyrene microspheres : effect of particle size, cell line and cell density », *Journal of Controlled Release*, vol. 71, p. 39–51, 2001.

[71] V. Mailänder et K. Landfester, « Interaction of Nanoparticles with Cells », *Biomacromolecules*, vol. 10, p. 2379–2400, 2009.

[72] S. M. Moghimi, A. C. Hunter et J. C. Murray, « Long-circulating and target-specific nanoparticles : Theory to practice », *Pharmacological Reviews*, vol. 53, p. 283–318, 2001.

[73] V. P. Torchilin, « Polymeric micelles in diagnostic imaging », *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 16, p. 305–319, 1999.

[74] J. H. Lee, H. B. Lee et J. D. Andrade, « Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces », *Progress in Polymer Science*, vol. 20, p. 1043–1079, 1995.

[75] D. E. Owens et N. A. Peppas, « Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 307, p. 93–102, 2006.

[76] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade et P. G. D. Gennes, « Protein-Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 142, p. 149–158, 1991.

[77] F. H. Meng, G. H. M. Engbers et J. Feijen, « Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 70A, p. 49–58, 2004.

[78] P. Vermette et L. Meagher, « Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems : relation to physico-chemical properties and mechanisms », *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, vol. 28, p. 153–198, 2003.

[79] S. J. Sofia, V. Premnath et E. W. Merrill, « Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces : Grafting Density and Protein Adsorption », *Macromolecules*, vol. 31, p. 5059–5070, 1998.

[80] V. P. Torchilin, « Multifunctional nanocarriers », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, p. 1532–1555, 2006.

[81] Y.-K. Gong et F. M. Winnik, « Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications », *Nanoscale*, vol. 4, p. 360–368, 2012.

[82] C. Boyer, X. Huang, M. R. Whittaker, V. Bulmus et T. P. Davis, « An overview of protein-polymer particles », *Soft Matter*, vol. 7, p. 1599–1614, 2010.

[83] R.-M. Kong, X.-B. Zhang, Z. Chen et W. Tan, « Aptamer-Assembled Nanomaterials for Biosensing and Biomedical Applications », *Small*, vol. 7, p. 2428–2436, 2011.

[84] R. Matsuno et K. Ishihara, « Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications », *Nano Today*, vol. 6, p. 61–74, 2011.

[85] N. L. Rosi et C. A. Mirkin, « Nanostructures in Biodiagnostics », *Chemical Reviews*, vol. 105, p. 1547–1562, 2005.

[86] A. Louie, « Multimodality Imaging Probes : Design and Challenges », *Chemical Reviews*, vol. 110, p. 3146–3195, 2010.

[87] T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, K.-T. Yong, H. E. Pudavar et P. N. Prasad, « High-resolution light microscopy using luminescent nanoparticles », *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, p. 162–175, 2010.

[88] H. Koo, M. S. Huh, J. H. Ryu, D.-E. Lee, I.-C. Sun, K. Choi, K. Kim et I. C. Kwon, « Nanoprobes for biomedical imaging in living systems », *Nano Today*, vol. 6, p. 204–220, 2011.

[89] D. Lisse, V. Wilkens, C. You, K. Busch et J. Piehler, « Selective Targeting of Fluorescent Nanoparticles to Proteins Inside Live Cells », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 9352–9355, 2011.

[90] V. Sokolova et M. Epple, « Synthetic pathways to make nanoparticles fluorescent », *Nanoscale*, vol. 3, p. 1957–1962, 2011.

[91] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir et S. Weiss, « Quantum Dots for Live Cells, *in vivo* Imaging, and Diagnostics », *Science*, vol. 307, p. 538–544, 2005.

[92] W. W. Yu et X. Peng, « Formation of High-Quality CdS and Other II-VI Semiconductor Nanocrystals in Noncoordinating Solvents : Tunable Reactivity of Monomers », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 41, p. 2368–2371, 2002.

[93] K. J. Nordell, E. M. Boatman et G. C. Lisensky, « A Safer, Easier, Faster Synthesis for CdSe Quantum Dot Nanocrystals », *Journal of Chemical Education*, vol. 82, p. 1697, 2005.

[94] P. Reiss, M. Protière et L. Li, « Core/Shell Semiconductor Nanocrystals », *Small*, vol. 5, p. 154–168, 2009.

[95] B. Mahler, N. Lequeux et B. Dubertret, « Ligand-Controlled Polytypism of Thick-Shell CdSe/CdS Nanocrystals », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, p. 953–959, 2010.

[96] F. Dubois, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris et C. Mioskowski, « A Versatile Strategy for Quantum Dot Ligand Exchange », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, p. 482–483, 2007.

[97] F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. R. Gil, F. Yang, P. Mulvaney et W. J. Parak, « Polymer-Coated Nanoparticles : A Universal Tool for Biolabelling Experiments », *Small*, 2011.

[98] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou et A. Libchaber, « In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles », *Science*, vol. 298, p. 1759–1762, 2002.

[99] W. W. Yu, E. Chang, J. C. Falkner, J. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek et V. L. Colvin, « Forming Biocompatible and Nonaggregated Nanocrystals in Water Using Amphiphilic Polymers », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, p. 2871–2879, 2007.

[100] J. Nicolas, D. Brambilla, O. Carion, T. Pons, I. Maksimovic, E. Larquet, B. L. Droumaguet, K. Andrieux, B. Dubertret et P. Couvreur, « Quantum dot-loaded PEGylated poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* imaging », *Soft Matter*, vol. 7, p. 6187–6193, 2011.

[101] I. Yildiz, E. Deniz, B. McCaughan, S. F. Cruickshank, J. F. Callan et F. M. Raymo, « Hydrophilic CdSe-ZnS Core-Shell Quantum Dots with Reactive Functional Groups on Their Surface », *Langmuir*, vol. 26, p. 11503–11511, 2010.

[102] P. Das, W. Zhong et J. Claverie, « Copolymer nanosphere encapsulated CdS quantum dots prepared by RAFT copolymerization : synthesis, characterization and mechanism of formation », *Colloid & Polymer Science*, vol. 289, p. 1519–1533, 2011.

[103] Y. Chen, R. Thakar et P. T. Snee, « Imparting Nanoparticle Function with Size-Controlled Amphiphilic Polymers », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, p. 3744–3745, 2008.

[104] P. J. Roth, C. Boyer, A. B. Lowe et T. P. Davis, « RAFT Polymerization and Thiol Chemistry : A Complementary Pairing for Implementing Modern Macromolecular Design », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 32, p. 1123–1143, 2011.

[105] Z. Popovic, W. Liu, V. P. Chauhan, J. Lee, C. Wong, A. B. Greytak, N. Insin, D. G. Nocera, D. Fukumura, R. K. Jain et M. G. Bawendi, « A Nanoparticle Size Series for In Vivo Fluorescence Imaging », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, p. 8649–8652, 2010.

[106] X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons et S. Nie, « In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 16, p. 63–72, 2005.

[107] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss et A. P. Alivisatos, « Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels », *Science*, vol. 281, p. 2013–2016, 1998.

[108] W. C. W. Chan et S. Nie, « Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection », *Science*, vol. 281, p. 2016–2018, 1998.

[109] A. M. Derfus, W. C. W. Chan et S. N. Bhatia, « Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots », *Nano Letters*, vol. 4, p. 11–18, 2003.

[110] S. Santra et A. Malhotra, « Fluorescent nanoparticle probes for imaging of cancer », *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 3, p. 501–510, 2011.

[111] M. J. Murcia et C. A. Naumann, *Biofunctionalization of Fluorescent Nanoparticles*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2007.

[112] S.-T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. G. Luo, L. Cao, M. J. Meziani, J.-H. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang et Y.-P. Sun, « Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, p. 18110–18114, 2009.

[113] S.-T. Yang, L. Cao, P. G. Luo, F. Lu, X. Wang, H. Wang, M. J. Meziani, Y. Liu, G. Qi et Y.-P. Sun, « Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, p. 11308–11309, 2009.

[114] Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. A. S. Fernando, P. Pathak, M. J. Meziani, B. A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P. G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. Chen, L. M. Veca et S.-Y. Xie, « Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, p. 7756–7757, 2006.

[115] L. Wang et Y. Li, « Controlled Synthesis and Luminescence of Lanthanide Doped $NaYF_4$ Nanocrystals », *Chemistry of Materials*, vol. 19, p. 727–734, 2007.

[116] G. Yi, Y. Peng et Z. Gao, « Strong Red-Emitting near-Infrared-to-Visible Upconversion Fluorescent Nanoparticles », *Chemistry of Materials*, vol. 23, p. 2729–2734, 2011.

[117] R. A. Jalil et Y. Zhang, « Biocompatibility of silica coated $NaYF_4$ upconversion fluorescent nanocrystals », *Biomaterials*, vol. 29, p. 4122–4128, 2008.

[118] D. K. Chatterjee, A. J. Rufaihah et Y. Zhang, « Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals », *Biomaterials*, vol. 29, p. 937–943, 2008.

[119] M. Akbulut, P. Ginart, M. E. Gindy, C. Theriault, K. H. Chin, W. Soboyejo et R. K. Prud'homme, « Generic Method of Preparing Multifunctional Fluorescent Nanoparticles Using Flash NanoPrecipitation », *Advanced Functional Materials*, vol. 19, p. 718–725, 2009.

[120] S. Marre et K. F. Jensen, « Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems », *Chemical Society Reviews*, vol. 39, p. 1183–1202, 2010.

[121] S. Desportes, Z. Yatabe, S. Baumlin, V. Genot, Lefevre, H. Ushiki, Delaire et Pansu, « Fluorescence lifetime imaging microscopy for in situ observation of the nanocrystallization of rubrene in a microfluidic set-up », *Chemical Physics Letters*, vol. 446, p. 212–216, 2007.

[122] T. Asahi, T. Sugiyama et H. Masuhara, « Laser Fabrication and Spectroscopy of Organic Nanoparticles », *Accounts of Chemical Research*, vol. 41, p. 1790–1798, 2008.

[123] A. Patra, R. Metivier, J. Piard et K. Nakatani, « SHG-active molecular nanorods with intermediate photochromic properties compared to solution and bulk solid states », *Chemical Communications*, vol. 46, p. 6385–6387, 2010.

[124] V. Monnier, N. Sanz, E. Botzung-Appert, M. Bacia et A. Ibanez, « Confined nucleation and growth of organic nanocrystals in sol-gel matrices », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 16, p. 1401–1409, 2006.

[125] A. Ibanez, S. Maximov, A. Guiu, C. Chaillout et P. L. Baldeck, « Controlled Nanocrystallization of Organic Molecules in Sol-Gel Glasses », *Advanced Materials*, vol. 10, p. 1540–1543, 1998.

[126] Y. Tokoro, A. Nagai et Y. Chujo, « Nanoparticles via H-aggregation of amphiphilic BODIPY dyes », *Tetrahedron Letters*, vol. 51, p. 3451–3454, 2010.

[127] H. Nakanishi, H. Masuhara et K. Sasaki, *Single organic nanoparticles*. Springer, 2003.

[128] Y. Lioa, T.-T. Vu, V. Génot et R. Pansu , *résultats non publiés, PPSM, ENS Cachan*.

[129] F. Sousa, S. Mandal, C. Garrovo, A. Astolfo, A. Bonifacio, D. Latawiec, R. H. Menk, F. Arfelli, S. Huewel, G. Legname, H.-J. Galla et S. Krol, « Functionalized gold nanoparticles : a detailed *in vivo* multimodal microscopic brain distribution study », *Nanoscale*, vol. 2, p. 2826–2834, 2010.

[130] A.-H. Lu, E. L. Salabas et F. Schüth, « Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Protection, Functionalization, and Application », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, p. 1222–1244, 2007.

[131] D. F. Moyano et V. M. Rotello, « Nano Meets Biology : Structure and Function at the Nanoparticle Interface », *Langmuir*, vol. 27, p. 10376–10385, 2011.

[132] K. G. Neoh et E. T. Kang, « Surface modification of magnetic nanoparticles for stem cell labeling », *Soft Matter*, vol. 8, p. 2057–2069, 2012.

[133] A. Erten, W. Wrasidlo, M. Scadeng, S. Esener, R. M. Hoffman, M. Bouvet et M. Makale, « Magnetic resonance and fluorescence imaging of doxorubicin-loaded nanoparticles using a novel *in vivo* model », *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, p. 797–807, 2010.

[134] A. Nagai, R. Yoshii, T. Otsuka, K. Kokado et Y. Chujo, « BODIPY-Based Chain Transfer Agent : Reversibly Thermoswitchable Luminescent Gold Nanoparticle Stabilized by BODIPY-Terminated Water-Soluble Polymer », *Langmuir*, vol. 26, p. 15644–15649., 2010.

[135] W. Stöber, A. Fink et E. Bohn, « Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, p. 62–69, 1968.

[136] K. Osseo-Asare et F. J. Arriagada, « Growth Kinetics of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion : A Reverse Micellar Pseudophase Reaction Model », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 218, p. 68–76, 1999.

[137] S. W. Bae, W. Tan et J.-I. Hong, « Fluorescent dye-doped silica nanoparticles : new tools for bioapplications », *Chemical Communications*, 2012.

[138] A. V. Blaaderen et A. Vrij, « Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres », *Langmuir*, vol. 8, p. 2921–2931, 1992.

[139] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo et N. Zaccheroni, « Luminescent Silica Nanoparticles : Extending the Frontiers of Brightness », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 4056–4066, 2011.

[140] E.-B. Cho, D. O. Volkov et I. Sokolov, « Ultrabright Fluorescent Silica Mesoporous Silica Nanoparticles : Control of Particle Size and Dye Loading », *Advanced Functional Materials*, vol. 21, p. 3129–3135, 2011.

[141] M. Lal, L. Levy, K. S. Kim, G. S. He, X. Wang, Y. H. Min, S. Pakatchi et P. N. Prasad, « Silica Nanobubbles Containing an Organic Dye in a Multilayered Organic/Inorganic Heterostructure with Enhanced Luminescence », *Chemistry of Materials*, vol. 12, p. 2632–2639, 2000.

[142] R. Kumar, I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, L. N. Goswami, A. C. Bonoiu, E. J. Bergey, K. M. Tramposch, A. Maitra et P. N. Prasad, « Covalently Dye-Linked, Surface-Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging », *ACS Nano*, vol. 2, p. 449–456, 2008.

[143] D. Liu, R. C. Huxford et W. Lin, « Phosphorescent Nanoscale Coordination Polymers as Contrast Agents for Optical Imaging », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 3696–3700, 2011.

[144] A. Guerrero-Martínez, J. Pérez-Juste et L. M. Liz-Marzán, « Recent Progress on Silica Coating of Nanoparticles and Related Nanomaterials », *Advanced Materials*, vol. 22, p. 1182–1195, 2010.

[145] H. Y. Lee, D. R. Bae, J. C. Park, H. Song, W. S. Han et J. H. Jung, « A Selective Fluoroionophore Based on BODIPY-functionalized Magnetic Silica Nanoparticles : Removal of Pb^{2+} from Human Blood », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, p. 1239–1243, 2009.

[146] T. Doussineau, A. Schulz, A. Lapresta-Fernandez, A. Moro, S. Körsten, S. Trupp et G. Mohr, « On the Design of Fluorescent Ratiometric Nanosensors », *Chemistry - A European Journal*, vol. 16, p. 10290–10299, 2010.

[147] H. Son, G. Kang et J. H. Jung, « A thin-layer chromatography plate prepared from BODIPY-based receptor immobilized SiO_2 nanoparticles as a portable chemosensor for Pb^{2+} », *Analyst*, vol. 137, p. 163–169, 2012.

[148] C. J. Hawker et K. L. Wooley, « The Convergence of Synthetic Organic and Polymer Chemistries », *Science*, vol. 309, p. 1200–1205, 2005.

[149] K. Ho, W. Li, C. Wong et P. Li, « Amphiphilic polymeric particles with core-shell nanostructures : emulsion-based syntheses and potential applications », *Colloid Polymer Science*, vol. 288, p. 1503–1523, 2010.

[150] O. J. Cayre, N. Chagneux et S. Biggs, « Stimulus responsive core-shell nanoparticles : synthesis and applications of polymer based aqueous systems », *Soft Matter*, vol. 7, p. 2211–2234, 2011.

[151] S. Frein, F. Camerel, R. Ziessel, J. Barbera et R. Deschenaux, « Highly Fluorescent Liquid-Crystalline Dendrimers Based on Borondipyrromethene Dyes », *Chemistry of Materials*, vol. 21, p. 3950–3959, 2009.

[152] L. Albertazzi, B. Storti, L. Marchetti et F. Beltram, « Delivery and Subcellular Targeting of Dendrimer-Based Fluorescent pH Sensors in Living Cells », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, p. 18158–18167, 2010.

[153] C. Li et S. Liu, « Polymeric assemblies and nanoparticles with stimuli-responsive fluorescence emission characteristics », *Chemical Communications*, vol. 48, p. 3262–3278, 2012.

[154] J. Hu et S. Liu, « Responsive Polymers for Detection and Sensing Applications : Current Status and Future Developments », *Macromolecules*, vol. 43, p. 8315–8330, 2010.

[155] M. Elsabahy et K. L. Wooley, « Strategies toward well-defined polymer nanoparticles inspired by nature : Chemistry versus versatility », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 50, p. 1869–1880, 2012.

[156] A. M. Nyström et K. L. Wooley, « The Importance of Chemistry in Creating Well-Defined Nanoscopic Embedded Therapeutics : Devices Capable of the Dual Functions of Imaging and Therapy », *Accounts of Chemical Research*, vol. 44, p. 969–978, 2011.

[157] D. Crespy, S. Zuber, A. Turshatov, K. Landfester et A.-M. Popa, « A straightforward synthesis of fluorescent and temperature-responsive nanogels », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 50, p. 1043–1048, 2012.

[158] H. Sun, A. M. Scharff-Poulsen, H. Gu et K. Almdal, « Synthesis and Characterization of Ratiometric, pH Sensing Nanoparticles with Covalently Attached Fluorescent Dyes », *Chemistry of Materials*, vol. 18, p. 3381 – 3384, 2006.

[159] R. V. Benjaminsen, H. Sun, J. R. Henriksen, N. M. Christensen, K. Almdal et T. L. Andresen, « Evaluating Nanoparticle Sensor Design for Intracellular pH Measurements », *ACS Nano*, vol. 5, p. 5864–5873, 2011.

[160] C.-Y. Chen et C.-T. Chen, « A PNIPAM-based fluorescent nanothermometer with ratiometric readout », *Chemical Communications*, vol. 47, p. 994–996, 2011.

[161] G. Zenkl, T. Mayr et I. Klimant, « Sugar-Responsive Fluorescent Nanospheres », *Macromolecular Bioscience*, vol. 8, p. 146–152, 2008.

[162] D. Wang, R. Miyamoto, Y. Shiraishi et T. Hirai, « BODIPY-Conjugated Thermoresponsive Copolymer as a Fluorescent Thermometer Based on Polymer Microviscosity », *Langmuir*, vol. 25, p. 13176–13182, 2009.

[163] K. Zhou, Y. Wang, X. Huang, K. Luby-Phelps, B. D. Sumer et J. Gao, « Tunable, Ultrasensitive pH-Responsive Nanoparticles Targeting Specific Endocytic Organelles in Living Cells », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 1–7, 2011.

[164] J. Yin, H. Hu, Y. Wu et S. Liu, « Thermo- and light-regulated fluorescence resonance energy transfer processes within dually responsive microgels », *Polymer Chemistry*, vol. 2, p. 363–371, 2011.

[165] D. Wang, T. Liu, J. Yin et S. Liu, « Stimuli-Responsive Fluorescent Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels Labeled with Phenylboronic Acid Moieties as Multifunctional Ratiometric Probes for Glucose and Temperatures », *Macromolecules*, 2011.

[166] J. Hu, X. Zhang, D. Wang, X. Hu, T. Liu, G. Zhang et S. Liu, « Ultrasensitive ratiometric fluorescent pH and temperature probes constructed from dye-labeled thermoresponsive double hydrophilic block copolymers », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, p. 19030–19038, 2011.

[167] J. Chen, F. Zeng, S. Z. Wu, J. Q. Zhao, Q. M. Chen et Z. Tong, « Reversible fluorescence modulation through energy transfer with ABC triblock copolymer micelles as scaffolds », *Chemical Communications*, p. 5580–5582, 2008.

[168] J. Chen, F. Zeng et S. Wu, « Construction of Energy Transfer Systems within Nanosized Polymer Micelles and their Fluorescence Modulation Properties », *ChemPhysChem*, vol. 11, p. 1036 – 1043, 2010.

[169] K. Miki, A. Kimura, K. Oride, Y. Kuramochi, H. Matsuoka, H. Harada, M. Hiraoka et K. Ohe, « High-Contrast Fluorescence Imaging of Tumors In Vivo Using Nanoparticles of Amphiphilic Brush-Like Copolymers Produced by ROMP », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 6567–6570, 2011.

[170] H. Lu, F. Su, Q. Mei, X. Zhou, Y. Tian, W. Tian, R. H. Johnson et D. R. Meldrum, « A series of poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] copolymers with anthracene-derived fluorophores showing aggregation-induced emission properties for bioimaging », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 50, p. 890–899, 2012.

[171] C. Fillafer, D. S. Friedl, A. K. Ilyes, M. Wirth et F. Gabor, « Bionanoprobes to Study Particle-Cell Interactions », *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 9, p. 3239–3245, 2009.

[172] R. Reul, N. Tsapis, H. Hillaireau, L. Sancey, S. Mura, M. Recher, J. Nicolas, J.-L. Coll et E. Fattal, « Near infrared labeling of PLGA for *in vivo* imaging of nanoparticles », *Polymer Chemistry*, vol. 3, p. 694–702, 2012.

[173] I. Yildiz, S. Impellizzeri, E. Deniz, B. McCaughan, J. F. Callan et F. M. Raymo, « Supramolecular Strategies To Construct Biocompatible and Photoswitchable Fluorescent Assemblies », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, p. 871–879, 2011.

[174] J. S. Guo, M. S. El-Aasser et J. W. Vanderhoff, « Microemulsion polymerization of styrene », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 27, p. 691–710, 1989.

[175] F. Gouanvé, T. Schuster, E. Allard, R. Méallet-Renault et C. Larpent, « Fluorescence Quenching upon Binding of Copper Ions in Dye-Doped and Ligand-Capped Polymer Nanoparticles : A Simple Way to Probe the Dye Accessibility in Nano-Sized Templates », *Advanced Functional Materials*, vol. 17, p. 2746–2756, 2007.

[176] E. Allard et C. Larpent, « Core-shell type dually fluorescent polymer nanoparticles for ratiometric pH-sensing », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 46, p. 6206–6213, 2008.

[177] K. Ouadahi, K. Sbargoud, E. Allard et C. Larpent, « FRET-mediated pH-responsive dual fluorescent nanoparticles prepared via click chemistry », *Nanoscale*, vol. 4, p. 727–732, 2012.

[178] R. Méallet-Renault, R. Pansu, S. Amigoni-Gerbier et C. Larpent, « Metal-chelating nanoparticles as selective fluorescent sensor for Cu^{2+} », *Chemical Communications*, vol. 20, p. 2344–2345, 2004.

[179] R. Méallet-Renault, A. Herault, J.-J. Vachon, R. B. Pansu, S. Amigoni-Gerbier et C. Larpent, « Fluorescent nanoparticles as selective Cu(II) sensors », *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 5, p. 300–310, 2006.

[180] A. B. Descalzo, H. J. Xu, Z. L. Xue, K. Hoffmann, Z. Shen, M. G. Weller, X. Z. You et K. Rurack, « Phenanthrene-fused boron-dipyrromethenes as bright long-wavelength fluorophores », *Organic Letters*, vol. 10, p. 1581–1584, 2008.

[181] T. Behnke, C. Würth, K. Hoffmann, M. Hübner, U. Panne et U. Resch-Genger, « Encapsulation of Hydrophobic Dyes in Polystyrene Micro- and Nanoparticles via Swelling Procedures », *Journal of Fluorescence*, vol. 21, p. 937–944, 2011.

[182] A. Monguzzi, M. Frigoli, C. Larpent, R. Tubino et F. Meinardi, « Low-Power-Photon Up-Conversion in Dual-Dye-Loaded Polymer Nanoparticles », *Advanced Functional Materials*, vol. 22, p. 139–143, 2012.

[183] J. Napp, T. Behnke, L. Fischer, C. Wörth, M. Wottawa, D. M. Katschinski, F. Alves, U. Resch-Genger et M. Schäferling, « Targeted Luminescent Near-Infrared Polymer-Nanoprobes for In Vivo Imaging of Tumor Hypoxia », *Analytical Chemistry*, vol. 83, p. 9039–9046, 2011.

[184] X. Pan, J. Ju, Y. Zhan et D. Wu, « Preparation and Fluorescence Characteristics of Amido-Functionalized Dual-Fluorescent Microspheres with Core/Shell Structure », *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 211, p. 2347–2355, 2010.

[185] V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Landfester, M. R. Lorenz et V. Mailander, « Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells », *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 206, p. 2440–2449, 2005.

[186] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester et V. Mailander, « Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells », *Macromolecular Bioscience*, vol. 8, p. 1135–1143, 2008.

[187] H. Furukawa, M. Misu, K. Ando et H. Kawaguchi, « Light-Controlled On-Off Switch of a Fluorescent Nanoparticle », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 29, p. 547–551, 2008.

[188] H. Gao, Y. Zhao, S. Fu, B. Li et M. Li, « Preparation of a novel polymeric fluorescent nanoparticle », *Colloid & Polymer Science*, vol. 280, p. 653–660, 2002.

[189] T. Tamai, M. Watanabe, H. Maeda et K. Mizuno, « Fluorescent Polymer Particles Incorporating Pyrene Derivatives », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 46, p. 1470–1475, 2008.

[190] J. A. Chen, P. S. Zhang, X. Y. Yu, X. F. Li, H. W. Tao et P. G. Yi, « Fabrication of Novel Polymer Nanoparticle-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Systems and their Tunable Fluorescence Properties », *Journal of Macromolecular Science Part A : Pure and Applied Chemistry*, vol. 48, p. 219–226, 2011.

[191] K. Ando et H. Kawaguchi, « High-performance fluorescent particles prepared via miniemulsion polymerization », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 285, p. 619–626, 2005.

[192] A. Palma, M. Tasior, D. O. Frimannsson, T. T. Vu, R. Méallet-Renault et D. F. O'Shea, « New On-Bead Near-Infrared Fluorophores and Fluorescent Sensor Constructs », *Organic Letters*, vol. 11, p. 3638–3641, 2009.

[193] T. T. Vu, *Optimisation des propriétés émissives du BODIPY en phase condensée par modulation de la nature des substituants*. Thèse doctorat, ENS Cachan, 2011.

[194] H. Sun, K. Almdal et T. L. Andresen, « Expanding the dynamic measurement range for polymeric nanoparticle pH sensors », *Chemical Communications*, vol. 47, p. 5268–5270, 2011.

[195] D. T. McQuade, A. E. Pullen et T. M. Swager, « Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors », *Chemical Reviews*, vol. 100, p. 2537–2574, 2000.

[196] F. Jakle, « Advances in the Synthesis of Organoborane Polymers for Optical, Electronic, and Sensory Applications », *Chemical Reviews*, vol. 110, p. 3985–4022, 2010.

[197] Y. Jung, R. J. Hickey et S.-J. Park, « Encapsulating Light-Emitting Polymers in Block Copolymer Micelles », *Langmuir*, vol. 26, p. 7540–7543, 2010.

[198] Y. Jin, F. Ye, M. Zeigler, C. Wu et D. T. Chiu, « Near-Infrared Fluorescent Dye-Doped Semiconducting Polymer Dots », *ACS Nano*, vol. 5, p. 1468–1475, 2011.

[199] K.-Y. Pu et B. Liu, « Fluorescent Conjugated Polyelectrolytes for Bioimaging », *Advanced Functional Materials*, vol. 21, p. 3408–3423, 2011.

[200] M. C. Baier, J. Huber et S. Mecking, « Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles by Polymerization in Miniemulsion », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, p. 14267–14273, 2009.

[201] C. Wu, S. J. Hansen, Q. Hou, J. Yu, M. Zeigler, Y. Jin, D. R. Burnham, J. D. McNeill, J. M. Olson et D. T. Chiu, « Design of Highly Emissive Polymer Dot Bioconjugates for In Vivo Tumor Targeting », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, p. 3430–3434, 2011.

[202] L. Plapied, N. Duhem, A. des Rieux et V. Préat, « Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery », *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 16, p. 228–237, 2011.

[203] A. P. R. Johnston, G. K. Such, S. L. Ng et F. Caruso, « Challenges facing colloidal delivery systems : From synthesis to the clinic », *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 16, p. 171–181, 2011.

[204] M. Szwarc, « "Living" Polymers », *Nature*, vol. 178, p. 1168–1169, 1956.

[205] D. Greszta, D. Mardare et K. Matyjaszewski, « "Living" radical polymerization. 1. Possibilities and limitations », *Macromolecules*, vol. 27, p. 638–644, 1994.

[206] T. Otsu et M. Yoshida, « Efficient synthesis of two or multi component block copolymers through living radical polymerization with polymeric photoiniferters », *Polymer Bulletin*, vol. 7, p. 197–203, 1982.

[207] K. Matyjaszewski et K. Davis, *Statistical, Gradient, Block, and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations*, vol. 159. Springer Berlin / Heidelberg, 2002.

[208] C. J. Hawker, A. W. Bosman et E. Harth, « New Polymer Synthesis by Nitroxide Mediated Living Radical Polymerizations », *Chemical Reviews*, vol. 101, p. 3661–3688, 2001.

[209] K. Matyjaszewski et J. Xia, « Atom Transfer Radical Polymerization », *Chemical Reviews*, vol. 101, p. 2921–2990, 2001.

[210] W. A. Braunecker et K. Matyjaszewski, « Controlled/living radical polymerization : Features, developments, and perspectives », *Progress in Polymer Science*, vol. 32, p. 93–146, 2007.

[211] K. Matyjaszewski, « Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) : Current Status and Future Perspectives », *Macromolecules*, 2012.

[212] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo et S. H. Thang, « Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer : The RAFT Process », *Macromolecules*, vol. 31, p. 5559–5562, 1998.

[213] U. Mansfeld, C. Pietsch, R. Hoogenboom, C. R. Becer et U. S. Schubert, « Clickable initiators, monomers and polymers in controlled radical polymerizations - a prospective combination in polymer science », *Polymer Chemistry*, vol. 1, p. 1560–1598, 2010.

[214] S. Perrier et P. Takolpuckdee, « Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/Xanthates (MADIX) polymerization », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 43, p. 5347–5393, 2005.

[215] Y. K. Chong, T. P. T. Le, G. Moad, E. Rizzardo et S. H. Thang, « A More Versatile Route to Block Copolymers and Other Polymers of Complex Architecture by Living Radical Polymerization : The RAFT Process », *Macromolecules*, vol. 32, p. 2071–2074, 1999.

[216] C. Barner-Kowollik, M. Buback, B. Charleux, M. L. Coote, M. Drache, T. Fukuda, A. Goto, B. Klumperman, A. B. Lowe, J. B. McLeary, G. Moad, M. J. Monteiro, R. D. Sanderson, M. P. Tonge et P. Vana, « Mechanism and kinetics of dithiobenzoate-mediated RAFT polymerization. I. The current situation », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 44, p. 5809–5831, 2006.

[217] D. J. Keddie, G. Moad, E. Rizzardo et S. H. Thang, « RAFT Agent Design and Synthesis », *Macromolecules*, 2012.

[218] A. Favier et M.-T. Charreyre, « Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 27, p. 653–692, 2006.

[219] S. Boissé, *Synthèse de copolymères à blocs amphiphiles par voie RAFT en émulsion aqueuse et assemblage simultané* . Thèse doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2010.

[220] J. Chiefari, R. T. A. Mayadunne, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, A. Postma et S. H. Thang, « Thiocarbonylthio Compounds (SC(Z)S-R) in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Effect of the Activating Group Z », *Macromolecules*, vol. 36, p. 2273–2283, 2003.

[221] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, J. Krstina, G. Moad, A. Postma et S. H. Thang, « Living Polymers by the Use of Trithiocarbonates as Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Agents : ABA Triblock Copolymers by Radical Polymerization in Two Steps », *Macromolecules*, vol. 33, p. 243–245, 2000.

[222] Y. K. Chong, J. Krstina, T. P. T. Le, G. Moad, A. Postma, E. Rizzardo et S. H. Thang, « Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S-R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R) », *Macromolecules*, vol. 36, p. 2256–2272, 2003.

[223] E. Rizzardo, J. Chiefari, B. Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad et S. H. Thang, « Tailored polymers by free radical processes », *Macromolecular Symposia*, vol. 143, p. 291–307, 1999.

[224] A. Gregory et M. H. Stenzel, « Complex polymer architectures via RAFT polymerization : From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks », *Progress in Polymer Science*, vol. 37, p. 38–105, 2012.

[225] F. Stoffelbach, L. Tibiletti, J. Rieger et B. Charleux, « Surfactant-Free, Controlled/Living Radical Emulsion Polymerization in Batch Conditions Using a Low Molar Mass, Surface-Active Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer (RAFT) Agent », *Macromolecules*, vol. 41, p. 7850–7856, 2008.

[226] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, Y. K. Chong, G. Moad et S. H. Thang, « Living Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization) Using Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents », *Macromolecules*, vol. 32, p. 6977–6980, 1999.

[227] A. Nagai, K. Kokado, J. Miyake et Y. Chujo, « Highly Luminescent Nanoparticles : Self-Assembly of Well-Defined Block Copolymers by $\pi - \pi$ Stacked BODIPY Dyes as Only a Driving Force », *Macromolecules*, vol. 42, p. 5446–5452, 2009.

[228] B. Li, D. Majonis, P. Liu et M. A. Winnik, « Synthesis and characterization of a naphthalimide-dye end-labeled copolymer by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization », *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 89, p. 317–325, 2011.

[229] C. Li, Y. Zhang, J. Hu, J. Cheng et S. Liu, « Reversible Three-State Switching of Multicolor Fluorescence Emission by Multiple Stimuli Modulated FRET Processes within Thermoresponsive Polymeric Micelles », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, p. 5120–5124, 2010.

[230] G. Sun, N. S. Lee, W. L. Neumann, J. N. Freskos, J. J. Shieh, R. B. Dorshow et K. L. Wooley, « A fundamental investigation of cross-linking efficiencies within discrete nanostructures, using the cross-linker as a reporting molecule », *Soft Matter*, vol. 5, p. 3422–3429, 2009.

[231] G. Sun, M. Y. Berezin, J. Fan, H. Lee, J. Ma, K. Zhang, K. L. Wooley et S. Achilefu, « Bright fluorescent nanoparticles for developing potential optical imaging contrast agents », *Nanoscale*, vol. 2, p. 548–558, 2010.

[232] G. Sun, H. Cui, L. Y. Lin, N. S. Lee, C. Yang, W. L. Neumann, J. N. Freskos, J. J. Shieh, R. B. Dorshow et K. L. Wooley, « Multicompartment Polymer Nanostructures with Ratiometric Dual-Emission pH-Sensitivity », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, p. 8534–8543, 2011.

[233] N. S. Lee, G. Sun, L. Y. Lin, W. L. Neumann, J. N. Freskos, A. Karwa, J. J. Shieh, R. B. Dorshow et K. L. Wooley, « Tunable dual-emitting shell-crosslinked nano-objects as single-component ratiometric pH-sensing materials », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, p. 14193–14202, 2011.

[234] K. Zhang, H. F. Fang, Z. H. Wang, J. S. A. Taylor et K. L. Wooley, « Cationic shell-crosslinked knedel-like nanoparticles for highly efficient gene and oligonucleotide transfection of mammalian cells », *Biomaterials*, vol. 30, p. 968–977, 2009.

[235] K. Zhang, H. Fang, Z. Wang, Z. Li, J.-S. A. Taylor et K. L. Wooley, « Structure-activity relationships of cationic shell-crosslinked knedel-like nanoparticles : Shell composition and transfection efficiency/cytotoxicity », *Biomaterials*, vol. 31, p. 1805–1813, 2010.

[236] J.-C. Daniel et C. Pichot, *Les latex synthétiques - Elaboration, propriétés, appications*. Tec et Doc / Lavoisier, 2006.

[237] A. M. (éditeur) Van Herk, *Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation*. 2005.

[238] F. Tronc, M. Li, J. Lu, M. A. Winnik, B. L. Kaul et J.-C. Graciet, « Fluorescent polymer particles by emulsion and miniemulsion polymerization », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 41, p. 766–778, 2003.

[239] Y. T. Choi, M. S. El-Aasser, E. D. Sudol et J. W. Vanderhoff, « Polymerization of styrene miniemulsions », *Journal of Polymer Science : Polymer Chemistry Edition*, vol. 23, p. 2973–2987, 1985.

[240] K. Landfester, « Polyreactions in Miniemulsions », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 22, p. 896 – 936, 2001.

[241] F. J. Schork, Y. Luo, W. Smulders, J. P. Russum, A. Butté et K. Fontenot, *Miniemulsion Polymerization*. Springer Berlin / Heidelberg, 2005.

[242] J. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek et R. F. T. Stepto, « Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007) », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 79, p. 1801–1829, 2007.

[243] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks et M. Antonietti, « Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions », *Macromolecules*, vol. 32, p. 5222–5228, 1999.

[244] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks et M. Antonietti, « Miniemulsion polymerization with cationic and nonionic surfactants : A very efficient use of surfactants for heterophase polymerization », *Macromolecules*, vol. 32, p. 2679–2683, 1999.

[245] C. S. Chern et T. J. Chen, « Effect of Ostwald ripening on styrene miniemulsion stabilized by reactive cosurfactants », *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 138, p. 65–74, 1998.

[246] A. H. Demond et A. S. Lindner, « Estimation of interfacial-tension between organic liquids and water », *Environmental Science and Technology*, vol. 27, p. 2318–2331, 1993.

[247] J. L. Reimers, A. H. P. Skelland et F. J. Schork, « Monomer droplet stability in emulsion-polymerized latexes », *Polymer Reaction Engineering*, vol. 3, p. 235–260, 1995.

[248] J. Reimers et F. J. Schork, « Robust nucleation in polymer-stabilized miniemulsion polymerization », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 59, p. 1833–1841, 1996.

[249] P. J. Blythe, B. R. Morrison, K. A. Mathauer, E. D. Sudol et M. S. El-Aasser, « Polymerization of miniemulsions containing predissolved polystyrene and using hexadecane as costabilizer », *Langmuir*, vol. 16, p. 898–904, 2000.

[250] C. M. Miller, E. D. Sudol, C. A. Silebi et M. S. El-Aasser, « Polymerization of Miniemulsions Prepared from Polystyrene in Styrene Solutions. 1. Benchmarks and Limits », *Macromolecules*, vol. 28, p. 2754–2764, 1995.

[251] J. A. Alduncin, J. Forcada et J. M. Asua, « Miniemulsion Polymerization Using Oil-Soluble Initiators », *Macromolecules*, vol. 27, p. 2256–2261, 1994.

[252] A. Musyanovych, R. Rossmanith, C. Tontsch et K. Landfester, « Effect of hydrophilic comonomer and surfactant type on the colloidal stability and size distribution of carboxyl- and amino-functionalized polystyrene particles prepared by miniemulsion polymerization », *Langmuir*, vol. 23, p. 5367–5376, 2007.

[253] G. R. Bardajee, C. Vancaeyzeele, J. C. Haley, A. Y. Li et M. A. Winnik, « Synthesis, characterization, and energy transfer studies of dye-labeled poly(butyl methacrylate) latex particles prepared by miniemulsion polymerization », *Polymer*, vol. 48, p. 5839–5849, 2007.

[254] R. Sauer, A. Turshatov, S. Baluschev et K. Landfester, « One-Pot Production of Fluorescent Surface-Labeled Polymeric Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization with Bodipy Surfmers », *Macromolecules*, vol. 45, p. 3787–3796, 2012.

[255] M. Han, E. Lee et E. Kim, « Preparation and optical properties of polystyrene nanocapsules containing photochromophores », *Optical Materials*, vol. 21, p. 579–583, 2002.

[256] J. Chen, F. Zeng, S. Wu, J. Su et Z. Tong, « Photoreversible Fluorescent Modulation of Nanoparticles via One-Step Miniemulsion Polymerization », *Small*, vol. 5, p. 970–978, 2009.

[257] J. Chen, P. Zhang, G. Fang, C. Weng, J. Hu, P. Yi, X. Yu et X. Li, « One-pot synthesis of amphiphilic reversible photoswitchable fluorescent nanoparticles and their fluorescence modulation properties », *Polymer Chemistry*, vol. 3, p. 685–693, 2012.

[258] J. B. McLeary et B. Klumperman, « RAFT mediated polymerisation in heterogeneous media », *Soft Matter*, vol. 2, p. 45–53, 2006.

[259] B. Zetterlund, Y. Kagawa et M. Okubo, « Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems », *Chem. Rev.*, vol. 108, p. 3747–3794, 2008.

[260] H. J. Lee, J. M. Lee, S. E. Shim, B. H. Lee et S. Choe, « Synthesis of carboxylic acid functionalized nanoparticles by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) miniemulsion polymerization of styrene », *Polymer*, vol. 46, p. 3661–3668, 2005.

[261] S. W. Prescott, M. J. Ballard, E. Rizzardo et R. G. Gilbert, « RAFT in Emulsion Polymerization : What Makes it Different ? », *Australian Journal of Chemistry*, vol. 55, p. 415–424, 2002.

[262] Y. W. Luo, J. Tsavalas et F. J. Schork, « Theoretical aspects of particle swelling in living free radical miniemulsion polymerization », *Macromolecules*, vol. 34, p. 5501–5507, 2001.

[263] M. P. Tonge, J. B. McLeary, J. J. Vosloo et R. D. Sanderson, « RAFT polymerisation in water-borne organic dispersions », *Macromolecular Symposia*, vol. 193, p. 289–304, 2003.

[264] J. Loiseau, N. Doerr, J. M. Suau, J. B. Egraz, M. F. Llauro et C. Ladaviere, « Synthesis and characterization of poly(acrylic acid) produced by RAFT polymerization. Application as a very efficient dispersant of $CaCO_3$, kaolin, and TiO_2 », *Macromolecules*, vol. 36, p. 3066–3077, 2003.

[265] C. J. Ferguson, R. J. Hughes, D. Nguyen, B. T. T. Pham, R. G. Gilbert, A. K. Serelis, C. H. Such et B. S. Hawkett, « Ab Initio Emulsion Polymerization by RAFT-Controlled Self-Assembly », *Macromolecules*, vol. 38, p. 2191–2204, 2005.

[266] G. S. A. Butté et M. Morbidelli, « Miniemulsion Living Free Radical Polymerization by RAFT », *Macromolecules*, vol. 34, p. 5885–5896, 2001.

[267] A. D. Peklak et A. Butté, « Kinetic model of reversible addition fragmentation chain transfer polymerization of styrene in seeded emulsion », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 44, p. 6114–6135, 2006.

[268] J. J. Vosloo, D. D. Wet-Roos, M. P. Tonge et R. D. Sanderson, « Controlled Free Radical Polymerization in Water-Borne Dispersion Using Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer », *Macromolecules*, vol. 35, p. 4894–4902, 2002.

[269] M. Lansalot, T. P. Davis et J. P. A. Heuts, « RAFT miniemulsion polymerization : Influence of the structure of the RAFT agent », *Macromolecules*, vol. 35, p. 7582–7591, 2002.

[270] A. M. dos Santos, T. L. Bris, C. Graillat, F. D'Agosto et M. Lansalot, « Use of a Poly(ethylene oxide) MacroRAFT Agent as Both a Stabilizer and a Control Agent in Styrene Polymerization in Aqueous Dispersed System », *Macromolecules*, vol. 42, p. 946–956, 2009.

[271] T. Boursier, I. Chaduc, J. Rieger, F. D'Agosto, M. Lansalot et B. Charleux, « Controlled radical polymerization of styrene in miniemulsion mediated by PEO-based trithiocarbonate macromolecular RAFT agents », *Polymer Chemistry*, vol. 2, p. 355–362, 2011.

[272] J. Rieger, F. Stoffelbach, C. Bui, D. Alaimo, C. Jerome et B. Charleux, « Amphiphilic Poly(ethylene oxide) Macromolecular RAFT Agent as a Stabilizer and Control Agent in ab Initio Batch Emulsion Polymerization », *Macromolecules*, vol. 41, p. 4065 4068, 2008.

[273] B. T. T. Pham, D. Nguyen, C. J. Ferguson, B. S. Hawkett, A. K. Serelis et C. H. Such, « Miniemulsion Polymerization Stabilized by Amphipathic Macro RAFT Agents », *Macromolecules*, vol. 36, p. 8907–8909, 2003.

[274] D. E. Ganeva, E. Sprong, H. de Bruyn, G. G. Warr, C. H. Such et B. S. Hawkett, « Particle Formation in ab Initio RAFT Mediated Emulsion Polymerization Systems », *Macromolecules*, vol. 40, p. 6181–6189, 2007.

[275] B. T. T. Pham, H. Zondanos, C. H. Such, G. G. Warr et B. S. Hawkett, « Miniemulsion Polymerization with Arrested Ostwald Ripening Stabilized by Amphiphilic RAFT Copolymers », *Macromolecules*, vol. 43, p. 7950–7957, 2010.

[276] Y. Luo, X. Wang, B.-G. Li et S. Zhu, « Toward Well-Controlled ab Initio RAFT Emulsion Polymerization of Styrene Mediated by 2-(((Dodecylsulfanyl)carbonothioyl)sulfanyl)propanoic Acid », *Macromolecules*, vol. 44, p. 221–229, 2011.

[277] F. Lu, Y. Luo et B. Li, « A Facile Route to Synthesize Highly Uniform Nanocapsules : Use of Amphiphilic Poly(acrylic acid)-b-polystyrene RAFT Agents to Interfacially Confine Miniemulsion Polymerization », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 28, p. 868–874, 2007.

[278] T. Ohara, T. Sato, N. Shimizu, G. Prescher, H. Schwind, O. Weiberg, K. Marten et H. Greim, *Acrylic Acid and Derivatives*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

[279] A. S. Michaels et O. Morelos, « Polyelectrolyte Adsorption by Kaolinite », *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 47, p. 1801–1809, 1955.

[280] C. Burguière, S. Pascual, C. Bui, J.-P. Vairon, B. Charleux, K. A. Davis, K. Matyjaszewski et I. Bétremieux, « Block Copolymers of Poly(styrene) and Poly(acrylic acid) of Various Molar Masses, Topologies, and Compositions Prepared via Controlled/Living Radical Polymerization. Application as Stabilizers in Emulsion Polymerization », *Macromolecules*, vol. 34, p. 4439–4450, 2001.

[281] J. Ji, L. Jia, L. Yan et P. R. Bangal, « Efficient Synthesis of Poly(acrylic acid) in Aqueous Solution via a RAFT Process », *Journal of Macromolecular Science, Part A*, vol. 47, p. 445–451, 2010.

[282] J. Rieger, G. Osterwinter, C. Bui, F. Stoffelbach et B. Charleux, « Surfactant-Free Controlled/Living Radical Emulsion (Co)polymerization of n-Butyl Acrylate and Methyl Methacrylate via RAFT Using Amphiphilic Poly(ethylene oxide)-Based Trithiocarbonate Chain Transfer Agents », 2009.

[283] I. Chaduc, M. Lansalot, F. D'Agosto et B. Charleux, « RAFT Polymerization of Methacrylic Acid in Water », *Macromolecules*, vol. 45, p. 1241–1247, 2012.

[284] A. M. Mathur, B. Drescher, A. B. Scranton et J. Klier, « Polymeric emulsifiers based on reversible formation of hydrophobic units », *Nature*, vol. 392, p. 367–370, 1998.

[285] S. Boissé, J. Rieger, K. Belal, A. Di-Cicco, P. Beaunier, M.-H. Li et B. Charleux, « Amphiphilic block copolymer nano-fibers via RAFT-mediated polymerization in aqueous dispersed system », *Chemical Communications*, vol. 46, p. 1950–1952, 2010.

[286] X. Zhang, S. Boissé, W. Zhang, P. Beaunier, F. D'Agosto, J. Rieger et B. Charleux, « Well-Defined Amphiphilic Block Copolymers and Nano-objects Formed in Situ via RAFT-Mediated Aqueous Emulsion Polymerization », *Macromolecules*, vol. 44, p. 4149–4158, 2011.

[287] X. Guo et M. Ballauff, « Spatial Dimensions of Colloidal Polyelectrolyte Brushes As Determined by Dynamic Light Scattering », *Langmuir*, vol. 16, p. 8719–8726, 2000.

[288] S. Boisse, J. Rieger, G. Pembouong, P. Beaunier et B. Charleux

[289] C. Grazon, J. Rieger, R. Méallet-Renault, G. Clavier et B. Charleux, « One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 32, p. 699–705, 2011.

[290] M. Álvarez, A. Costela, I. García-Moreno, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. L. Arbeloa, J. B. Prieto et I. L. Arbeloa, « Photophysical and laser emission studies of 8-polyphenylene-substituted BODIPY dyes in liquid solution and in solid polymeric matrices », *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 7, p. 802–813, 2008.

[291] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov et B. Valeur, « Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential) », *Chemical Physics*, vol. 315, p. 171–182, 2005.

[292] M. N. Berberan-Santos et B. Valeur, « Luminescence Decays with Underlying Distributions of Rate Constants : General Properties and analysis with mathematical functions », *Journal of Luminescence*, vol. 126, p. 263–272, 2007.

[293] R. Kohlrausch, « Theorie des elektrischen Rückstandes in der Leidner Flasche », *Annalen der Physik und Chemie (Poggendorff)*, vol. 91, p. 179–213, 1854.

[294] M. Berberan-Santos, E. N. Bodunov et B. Valeur, « History of the Kohlrausch (stretched exponential) function : Pioneering work in luminescence », *Annalen der Physik*, vol. 17, p. 460–461, 2008.

[295] A. L. Wong, J. M. Harris et D. B. Marshall, « Measurements of energy dispersion at liquid solid interfaces - fluorescence quenching of pyrene bound to fumed silica », *Canadian Journal of Physics*, vol. 68, p. 1027–1034, 1990.

[296] . Pekcan, « Fluorescence lifetime distributions : Applications to high and low viscosity media in polymer blend-like particles », *European Polymer Journal*, vol. 32, p. 117–124, 1996.

[297] J. Lee, J. Lee, M. Lee, K. J. B. Lee et D. S. Ko, « Scanning confocal fluorescence microscopy of single DNA-EtBr complexes dispersed in polymer », *Chemical Physics Letters*, vol. 394, p. 49–53, 2004.

[298] R. Metivier, I. Leray, J.-P. Lefevre, M. Roy-Auberger, N. Zanier-Szydlowski et B. Valeur, « Characterization of alumina surfaces by fluorescence spectroscopy Part 2. Photophysics of a bound pyrene derivative as a probe of the spatial distribution of reactive hydroxyl groups », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 5, p. 758–766, 2003.

[299] N. Felorzabihi, P. Froimowicz, J. C. Haley, G. R. Bardajee, B. Li, E. Bovero, F. C. J. M. van Veggel et M. A. Winnik, « Determination of the Förster Distance in Polymer Films by Fluorescence Decay for Donor Dyes with a Nonexponential Decay Profile », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, p. 2262–2272, 2009.

[300] K. Nakashima, J. Duhamel et M. A. Winnik, « Photophysical processes on a latex surface : electronic energy transfer from rhodamine dyes to malachite green », *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, p. 10702–10707, 1993.

[301] B. Valeur, *Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications, Part 3*, chap. Fluorescent Probes for Evaluation of Local Physical and Structural Parameters. John Wiley & Sons, 1993.

[302] J. Brandrup, E. H. Immergut, E. A. Grulke, A. Abe et D. R. Bloch, *Polymer Handbook*. John Wiley et Sons, Inc : New-York, 1999.

[303] J. V. S. Fernando, A. N. de Castro Carlos, H. D. John, K. D. Natassa, J. A. Marc et N. Akira, « Standard Reference Data for the Viscosity of Toluene », *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 35, p. 1–8, 2006.

[304] J. ichi Horinaka, M. Maruta, S. Ito et M. Yamamoto, « Local Motion of Oligo- and Polystyrene Chain End Studied by the Fluorescence Depolarization Method », *Macromolecules*, vol. 32, p. 1134–1139, 1999.

[305] C. Friedrich, F. Lauprêtre, C. Noël et L. Monnerie, « Polystyrene dynamics in dilute solution : a further investigation by electron spin resonance. Comparison with other techniques », *Macromolecules*, vol. 14, p. 1119–1125, 1981.

[306] D. Zhang, Y. Wen, Y. Xiao, G. Yu, Y. Liu et X. Qian, « Bulky 4-tritylphenylethynyl substituted boradiazaindacene : pure red emission, relatively large Stokes shift and inhibition of self-quenching », *Chemical Communications*, p. 4777–4779, 2008.

[307] H. Lu, Q. Wang, L. Gai, Z. Li, Y. Deng, X. Xiao, G. Lai et Z. Shen, « Tuning the Solid-State Luminescence of BODIPY Derivatives with Bulky Arylsilyl Groups : Synthesis and Spectroscopic Properties », *Chemistry - A European Journal*, 10.1002/chem.201200169.

[308] Y. Kubota, J. Uehara, K. Funabiki, M. Ebihara et M. Matsui, « Strategy for the increasing the solid-state fluorescence intensity of pyrromethene-BF_2 complexes », *Tetrahedron Letters*, vol. 51, p. 6195–6198, 2010.

[309] R. Ziessel, G. Ulrich et A. Harriman, « The chemistry of Bodipy : A new El Dorado for fluorescence tools », *New Journal of Chemistry*, vol. 31, p. 496–501, 2007.

[310] T. Ozdemir, S. Atilgan, I. Kutuk, L. T. Yildirim, A. Tulek, M. Bayindir et E. U. Akkaya, « Solid-State Emissive BODIPY Dyes with Bulky Substituents As Spacers », *Organic Letters*, vol. 11, p. 2105–2107, 2009.

[311] A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergström et L. B.-A. Johansson, « 3,5-Diaryl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes : Synthesis, Spectroscopic, Electrochemical, and Structural Properties », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 64, p. 7813–7819, 1999.

[312] A. B. Zaitsev, R. Méallet-Renault, E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, S. Badré, C. Dumas, A. M. Vasil'tsov, N. V. Zorina et R. B. Pansu, « Synthesis of 2-mesityl-3-methylpyrrole via the Trofimov reaction for a new BODIPY with hindered internal rotation », *Tetrahedron*, vol. 61, p. 2683–2688, 2005.

[313] S. Badré, V. Monnier, R. Méallet-Renault, C. Dumas-Verdes, E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, G. Laurent, G. Levi, A. Ibanez, B. A. Trofimov et R. B. Pansu, « Fluorescence of molecular micro- and nanocrystals prepared with Bodipy derivatives », *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, vol. 183, p. 238–246, 2006.

[314] T. T. Vu, S. Badré, C. Dumas-Verdes, J.-J. Vachon, C. Julien, P. Audebert, E. Y. Senotrusova, E. Y. Schmidt, B. A. Trofimov, R. B. Pansu, G. Clavier et R. Méallet-Renault, « New Hindered BODIPY Derivatives : Solution and Amorphous State Fluorescence Properties », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, p. 11844–11855, 2009.

[315] E. Y. Schmidt, B. A. Trofimov, A. I. Mikhaleva, N. V. Zorina, N. I. Protzuk, K. B. Petrushenko, I. A. Ushakov, M. Y. Dvorko, R. Méallet-Renault, G. Clavier, T.-T. Vu, H. T. T. Tran et R. Pansu, « Synthesis and Optical Properties of 2-(Benzo[b]thiophene-3-yl)pyrroles and a New BODIPY Fluorophore (BODIPY : 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) », *Chemistry - A European Journal*, vol. 15, p. 5823–5830, 2009.

[316] R. Meallet-Renault, G. Clavier, C. Dumas-Verdes, S. Badre, E. Shmidt, A. Mikhaleva, C. Larpent, R. Pansu, P. Audebert et B. Trofimov, « Novel BODIPY preparations from sterically hindered pyrroles. Synthesis and photophysical behavior in solution, polystyrene nanoparticles, and solid phase », *Russian Journal of General Chemistry*, vol. 78, p. 2247–2256, 2008.

[317] J. Bigot, M. Bria, S. T. Caldwell, F. Cazaux, A. Cooper, B. Charleux, G. Cooke, B. Fitzpatrick, D. Fournier, J. Lyskawa, M. Nutley, F. Stoffelbach et P. Woisel, « LCST : a powerful tool to control complexation between a dialkoxynaphthalene-functionalised poly(N-isopropylacrylamide) and CBPQT4+ in water », *Chemical Communications*, 2009.

[318] J. Zhu, D. Zhou, X. Zhu et G. Chen, « Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of glycidyl methacrylate with 2-cyanoprop-2-yl 1-dithionaphthalate as a chain-transfer agent », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 42, p. 2558–2565, 2004.

[319] J. Murtagh, D. O. Frimannsson et D. F. O'Shea, « Azide Conjugatable and pH Responsive Near-Infrared Fluorescent Imaging Probes », *Organic Letters*, vol. 11, p. 5386–5389, 2009.

[320] M. D. B. Desai, B. S. R. Reddy, R. Arshady et M. H. George, « Copolymerization of 2-carboxyphenyl acrylate with styrene and N-vinyl-2-pyrrolidone : Reactivity ratios, molecular weights and 13C NMR spectra », *Polymer*, vol. 27, p. 96–100, 1986.

[321] G. Roncucci, D. Dei, F. Giuntini, G. Chiti, D. Nistri, L. Fantetti, V. Paschetta et A. Cocchi, « Meso-substitued porphyrins », *WO/2004/035590*, 2004.

[322] F. R. Mayo et F. M. Lewis, « Copolymerization. I. A Basis for Comparing the Behavior of Monomers in Copolymerization; The Copolymerization of Styrene and Methyl Methacrylate », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 66, p. 1594–1601, 1944.

[323] M. Fineman et S. D. Ross, « Linear method for determining monomer reactivity ratios in copolymerization », *Journal of Polymer Science*, vol. 5, p. 259–262, 1950.

[324] T. Kelen et F. Tüdös, « Analysis of the Linear Methods for Determining Copolymerization Reactivity Ratios. I. A New Improved Linear Graphic Method », *Journal of Macromolecular Science : Part A - Chemistry*, vol. 9, p. 1–27, 1975.

[325] S. P. Rao, S. Ponratnam, S. L. Kapur et P. K. Iyer, « Kelen-tüdös method applied to the analysis of high-conversion copolymerization data », *Journal of Polymer Science : Polymer Letters Edition*, vol. 14, p. 513–516, 1976.

[326] V. Jaacks, « A novel method of determination of reactivity ratios in binary and ternary copolymerizations », *Die Makromolekulare Chemie*, vol. 161, p. 161–172, 1972.

[327] X. Wang, Y. Luo, B. Li et S. Zhu, « Ab Initio Batch Emulsion RAFT Polymerization of Styrene Mediated by Poly(acrylic acid-b-styrene) Trithiocarbonate », *Macromolecules*, vol. 42, p. 6414 – 6421, 2009.

[328] B. Lessard et M. Maric, « Nitroxide-Mediated Synthesis of Poly(poly(ethylene glycol) acrylate) (PPEGA) Comb-Like Homopolymers and Block Copolymers », *Macromolecules*, vol. 41, p. 7870–7880, 2008.

[329] M. Mertoglu, A. Laschewsky, K. Skrabania et C. Wieland, « New Water Soluble Agents for Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization and Their Application in Aqueous Solutions », *Macromolecules*, vol. 38, p. 3601–3614, 2005.

[330] I. Chaduc, W. J. Zhang, J. Rieger, M. Lansalot, F. D'Agosto et B. Charleux, « Amphiphilic Block Copolymers from a Direct and One-pot RAFT Synthesis in Water », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 32, p. 1270–1276, 2011.

[331] W. Zhang, F. D'Agosto, O. Boyron, J. Rieger et B. Charleux, « One-Pot Synthesis of Poly(methacrylic acid-co-poly(ethylene oxide) methyl ether methacrylate)-b-polystyrene Amphiphilic Block Copolymers and Their Self-Assemblies in Water via RAFT-Mediated Radical Emulsion Polymerization. A Kinetic Study », *Macromolecules*, vol. 44, p. 7584–7593, 2011.

[332] W. Zhang, F. D'Agosto, O. Boyron, J. Rieger et B. Charleux, « Toward a Better Understanding of the Parameters that Lead to the Formation of Nonspherical Polystyrene Particles via RAFT-Mediated One-Pot Aqueous Emulsion Polymerization », *Macromolecules*, vol. 45, p. 4075–4084, 2012.

[333] E. Khousakoun, J.-F. Gohy et R. Jérôme, « Self-association of double-hydrophilic copolymers of acrylic acid and poly(ethylene oxide) macromonomer », *Polymer*, vol. 45, p. 8303–8310, 2004.

[334] S. G. Yang, X. F. Yu, L. Wang, Y. F. Tu, J. X. Zheng, J. T. Xu, R. M. V. Horn et S. Z. D. Cheng, « Hydrogen-Bonding-Driven Complexation of Polystyrene-block-poly(ethylene oxide) Micelles with Poly(acrylic acid) », *Macromolecules*, vol. 43, p. 3018–3026, 2010.

[335] S. E. Dunn, A. Brindley, S. S. Davis, M. C. Davies et L. Illum, « Polystyrene-Poly (Ethylene Glycol) (PS-PEG2000) Particles as Model Systems for Site Specific Drug Delivery. 2. The Effect of PEG Surface Density on the *in Vitro* Cell Interaction and *in Vivo* Biodistribution », *Pharmaceutical Research*, vol. 11, p. 1016–1022, 1994.

[336] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk et R. H. Müller, « "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG) : influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption », *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 18, p. 301–313, 2000.

[337] W. Qin, T. Rohand, W. Dehaen, J. N. Clifford, K. Driesen, D. Beljonne, B. V. Averbeke, M. V. der Auweraer et N. Boens, « Boron Dipyrromethene Analogs with Phenyl, Styryl, and Ethynylphenyl Substituents : Synthesis, Photophysics, Electrochemistry, and Quantum-Chemical Calculations », *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 111, p. 8588–8597, 2007.

[338] G. Vives, C. Giansante, R. Bofinger, G. Raffy, A. D. Guerzo, B. Kauffmann, P. Batat, G. Jonusauskas et N. D. McClenaghan, « Facile functionalization of a fully fluorescent perfluorophenyl BODIPY : photostable thiol and amine conjugates », *Chemical Communications*, vol. 47, p. 10425–10427, 2011.

[339] B. P. Wittmershaus, J. J. Skibicki, J. B. McLafferty, Y.-Z. Zhang et S. Swan, « Spectral Properties of Single BODIPY Dyes in Polystyrene Microspheres and in Solutions », *Journal of Fluorescence*, vol. 11, p. 119–128, 2001.

[340] J. V. Staros, R. W. Wright et D. M. Swingle, « Enhancement by *N*-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions », *Analytical Biochemistry*, vol. 156, p. 220–222, 1986.

[341] D. Sehgal et I. K. Vijay, « A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation », *Analytical Biochemistry*, vol. 218, p. 87–91, 1994.

[342] H. Huang, T. Kowalewski, E. E. Remsen, R. Gertzmann et K. L. Wooley, « Hydrogel-Coated Glassy Nanospheres : A Novel Method for the Synthesis of Shell Cross-Linked Knedels », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 119, p. 11653–11659, 1997.

[343] P. Akkahat, W. Mekboonsonglarp, S. Kiatkamjornwong et V. P. Hoven, « Surface-Grafted Poly(acrylic acid) Brushes as a Precursor Layer for Biosensing Applications : Effect of Graft Density and Swellability on the Detection Efficiency », *Langmuir*, vol. 28, p. 5302–5311, 2012.

[344] F. A. Tobiesen et S. Michielsen, « Method for grafting poly(acrylic acid) onto nylon 6,6 using amine end groups on nylon surface », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 40, p. 719–728, 2002.

[345] E. Kaiser, Colescot.Rl, Bossinge.Cd et P. I. Cook, « Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides », *Analytical Biochemistry*, vol. 34, p. 595–598, 1970.

[346] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press/Taylor and Francis, 2008.

[347] B. S. Rao, J. B. Puschett, B. M. Karandikar et K. Matyjaszewski, « Synthesis of functional bromothymol blue dyes for surface attachment to optical fibers », *Dyes and Pigments*, vol. 16, p. 27–34, 1991.

[348] J. B. Puschett, B. S. Rao, B. M. Karandikar et K. Matyjaszewski, « Indicator characteristics of bromothymol blue derivatives », *Talanta*, vol. 38, p. 335–338, 1991.

[349] M. K. Singh, H. Pal, A. C. Bhasikuttan et A. V. Sapre, « Dual Solvatochromism of Neutral Red », *Photochemistry and Photobiology*, vol. 68, p. 32–38, 1998.

[350] M. K. Singh, H. Pal et A. V. Sapre, « Studies on the Radiolytically Produced Transients of Neutral Red : Triplet and Reduced Radicals », *Photochemistry and Photobiology*, vol. 71, p. 44–52, 2000.

[351] D. R. S. Jeykumari et S. S. Narayanan, « Covalent modification of multiwalled carbon nanotubes with neutral red for the fabrication of an amperometric hydrogen peroxide sensor », *Nanotechnology*, vol. 18, p. 125501, 2007.

[352] D. R. S. Jeykumari et S. S. Narayanan, « A novel nanobiocomposite based glucose biosensor using neutral red functionalized carbon nanotubes », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, p. 1404–1411, 2008.

[353] S. Woislawski, « The Spectrophotometric Determination of Ionization Constants of Basic Dyes », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 75, p. 5201–5203, 1953.

[354] L. Yuan, W. Lin et Y. Feng, « A rational approach to tuning the pKa values of rhodamines for living cell fluorescence imaging », *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 9, p. 1723–1726, 2011.

[355] C. Wu, W.-J. Zhang, X. Zeng, L. Mu, S.-F. Xue, Z. Tao et T. Yamato, « New fluorescent sensor for antimony and transition metal cations based on rhodamine amide-arm homotrioxacalix[3]arene », *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, vol. 66, p. 125–131, 2010.

[356] Y. Shiraishi, R. Miyamoto, X. Zhang et T. Hirai, « Rhodamine-Based Fluorescent Thermometer Exhibiting Selective Emission Enhancement at a Specific Temperature Range », *Organic Letters*, vol. 9, p. 3921–3924, 2007.

[357] R. Sjöback, J. Nygren et M. Kubista, « Absorption and fluorescence properties of fluorescein », *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 51, p. L7–L21, 1995.

[358] S. Hornig, C. Biskup, A. Grafe, J. Wotschadlo, T. Liebert, G. J. Mohr et T. Heinze, « Biocompatible fluorescent nanoparticles for pH-sensoring », *Soft Matter*, vol. 4, p. 1169–1172, 2008.

[359] R. V. Benjaminsen, H. Sun, J. R. Henriksen, N. M. Christensen, K. Almdal et T. L. Andresen, « Evaluating Nanoparticle Sensor Design for Intracellular pH Measurements », *ACS Nano*, vol. 5, p. 5864–5873, 2011.

[360] J. Chen, P. Zhang, G. Fang, C. Weng, J. Hu, P. Yi, X. Yu et X. Li, « One-pot synthesis of amphiphilic reversible photoswitchable fluorescent nanoparticles and their fluorescence modulation properties », *Polymer Chemistry*, vol. 3, p. 685–693, 2012.

[361] C. Munkholm, D. R. Parkinson et D. R. Walt, « Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, p. 2608–2612, 1990.

[362] U. Reibetanz, D. Halozan, M. Brumen et E. Donath, « Flow Cytometry of HEK 293T Cells Interacting with Polyelectrolyte Multilayer Capsules Containing Fluorescein-Labeled Poly(acrylic acid) as a pH Sensor », *Biomacromolecules*, vol. 8, p. 1927–1933, 2007.

[363] C. Déjugnat, D. Halozan et G. B. Sukhorukov, « Defined Picogram Dose Inclusion and Release of Macromolecules using Polyelectrolyte Microcapsules », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 26, p. 961–967, 2005.

[364] S. W. Hong et W. H. Jo, « A fluorescence resonance energy transfer probe for sensing pH in aqueous solution », *Polymer*, vol. 49, p. 4180–4187, 2008.

[365] J. Gerlach, B. Pohn, W. Karl, M. Scheideler, M. Uray, H. Bischof, H. Schwab et I. Klimant, « Planar optical sensors : A tool for screening enzyme activity in high density cell arrays », *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 114, p. 984–994, 2006.

[366] G. Delaittre, G. Justribó-Hernández, R. J. M. Nolte et J. J. L. M. Cornelissen, « Amine-Reactive PEGylated Nanoparticles for Potential Bioconjugation », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 32, p. 19–24, 2011.

[367] M. Carvell, I. D. Robb et P. W. Small, « The influence of labelling mechanisms on the fluorescence behaviour of polymers bearing fluorescein labels », *Polymer*, vol. 39, p. 393–398, 1998.

[368] J. R. Griffiths, « Are cancer-cells acidic ? », *British Journal of Cancer*, vol. 64, p. 425–427, 1991.

[369] G. Elia, « Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins », *Proteomics*, vol. 8, p. 4012–4024, 2008.

[370] R. K. Garlick et R. W. Giese, « Avidin Binding of Radiolabled Biotin Derivatives », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, p. 210–215, 1988.

[371] Y. H. Bae, K. Na et E. S. Lee, « Tumor environment-induced ligand-expressing nanocarrier system », *US 2005/0118252 A1*, 2005.

[372] N. Charvet, P. Reiss, A. Roget, A. Dupuis, D. Grunwald, S. Carayon, F. Chandezon et T. Livache, « Biotinylated CdSe/ZnSe nanocrystals for specific fluorescent labeling », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 14, p. 2638–2642, 2004.

[373] Y.-Z. Du et M. Kodaka, « Preparation and characterization of biotinylated and enzyme-immobilized heterobifunctional latex particles as nanobio devices », *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, vol. 43, p. 562–574, 2005.

[374] M. A. Gauthier et H.-A. Klok, « Peptide/protein-polymer conjugates : synthetic strategies and design concepts », *Chemical Communications*, p. 2591–2611, 2008.

[375] M. M. Bradford, « Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding », *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248–254, 1976.

[376] M. Chenal, C. Boursier, Y. Guillaneuf, M. Taverna, P. Couvreur et J. Nicolas, « First peptide/protein PEGylation with functional polymers designed by nitroxide-mediated polymerization », *Polymer Chemistry*, vol. 2, p. 1523–1530, 2011.

[377] F. Lecolley, L. Tao, G. Mantovani, I. Durkin, S. Lautru et D. M. Haddleton, « A new approach to bioconjugates for proteins and peptides ("pegylation") utilising living radical polymerisation », *Chemical Communications*, p. 2026–2027, 2004.

[378] L. Couvreur, B. Charleux, O. Guerret et S. Magnet, « Direct Synthesis of Controlled Poly(styrene-co-acrylic acid)s of Various Compositions by Nitroxide-Mediated Random Copolymerization », *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 204, p. 2055–2063, 2003.

[379] R. R. Birge *Kodak Laser Dyes*, 1987.

[380] D. F. Eaton, « Recommended methods for fluorescence decay analysis », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 8, p. 1631–1648, 1990.

[381] S. D. Poisson, *Recherches sur la probabilité des jugements en matière criminelle et en matière civile*. Bachelier, Paris, 1837.

[382] K. Levenberg, « A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares », *Quarterly of Applied Mathematics*, vol. 2, p. 164–168, 1944.

[383] D. W. Marquardt, « An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters », *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, vol. 11, p. 431–441, 1963.

[384] C. Dumas-Verdes, F. Miomandre, E. Lépicier, O. Galangau, T.-T. Vu, G. Clavier, R. Méallet-Renault et P. Audebert, « BODIPY-Tetrazine Multichromophoric Derivatives », *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 13, p. 2525–2535, 2010.

[385] D. Kikuchi, S. Sakaguchi et Y. Ishii, « An Alternative Method for the Selective Bromination of Alkylbenzenes Using $NaBrO_3$/$NaHSO_3$ Reagent », *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 63, p. 6023–6026, 1998.

[386] S. Wang, X. Li, S. Xun, X. Wan et Z. Y. Wang, « Near-Infrared Electrochromic and Electroluminescent Polymers Containing Pendant Ruthenium Complex Groups », *Macromolecules*, vol. 39, p. 7502–7507, 2006.

[387] J. T. Lai, D. Filla et R. Shea, « Functional Polymers from Novel Carboxyl-Terminated Trithiocarbonates as Highly Efficient RAFT Agents », *Macromolecules*, vol. 35, p. 6754–6756, 2002.

[388] S. H. Thang, Y. K. Chong, R. T. A. Mayadunne, G. Moad et E. Rizzardo, « A novel synthesis of functional dithioesters, dithiocarbamates, xanthates and trithiocarbonates », *Tetrahedron Letters*, vol. 40, p. 2435–2438, 1999.

[389] G. Bouhadir, N. Legrand, B. Quiclet-Sire et S. Z. Zard, « A new practical synthesis of tertiary S-alkyl dithiocarbonates and related derivatives », *Tetrahedron Letters*, vol. 40, p. 277–280, 1999.

[390] X. Xu, A. E. Smith, S. E. Kirkland et C. L. McCormick, « Aqueous RAFT Synthesis of pH-Responsive Triblock Copolymer mPEO-PAPMA-PDPAEMA and Formation of Shell Cross-Linked Micelles », *Macromolecules*, vol. 41, p. 8429–8435, 2008.

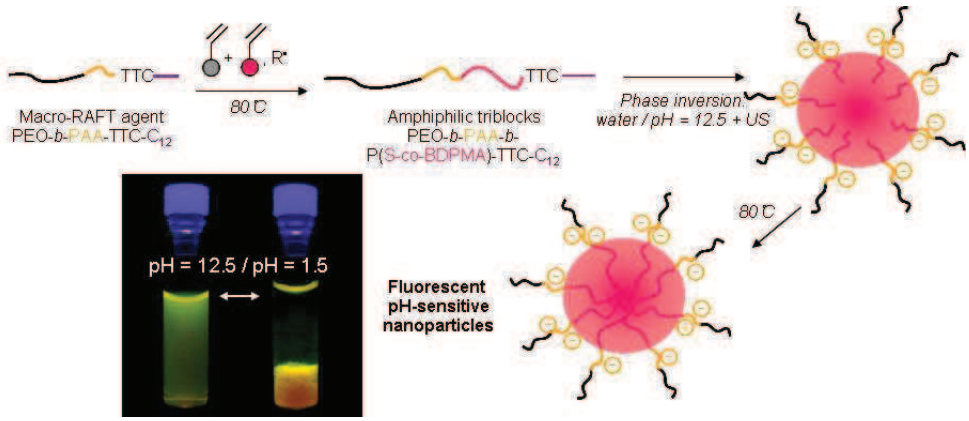
Annexe A : Publications scientifiques

A.1 One-Pot Synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT Miniemulsion Polymerization Using a Phase Inversion Process

Macromolecular Rapid Communications 2011, 32, 699-705

C. Grazon, J. Rieger, R. Méallet-Renault, G. Clavier, B. Charleux

Abstract : Water-soluble and fluorescent core-shell nanoparticles (FNP) are synthesized in a miniemulsion reversible addition-fragmentation transfer (RAFT) polymerization and are shown to respond to pH. The particles are obtained from a hydrophilic PEO-*b*-PAA macromolecular RAFT agent which is block-extended with styrene and fluorescent BODIPY monomer. A miniemulsion is then formed with the residual hydrophobic monomers. After completion of the polymerization, FNP of $\approx$ 60 nm in diameter are obtained. The fluorescence of the BODIPY dye in the particles is found to remain (0.2 quantum yield). The particles can be precipitated in acidic pH and redispersed upon addition of base without loss of their integrity or noticeable rearrangement.

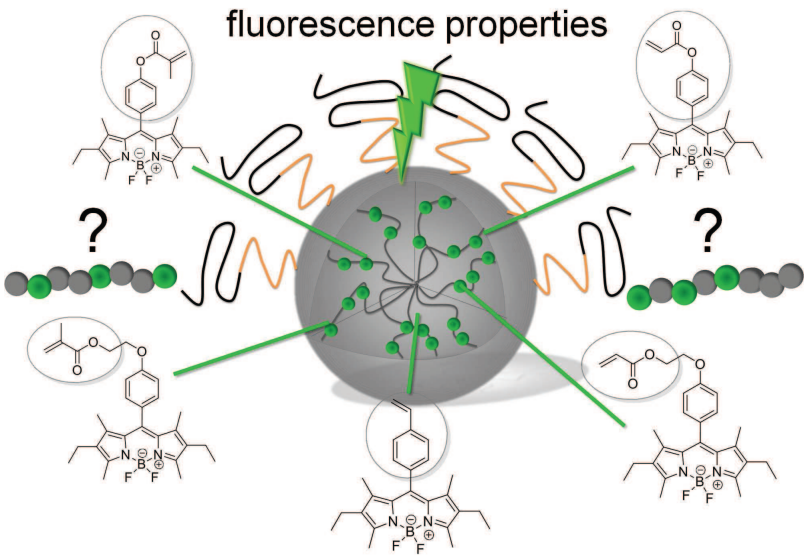


A.2 New fluorescent BODIPY monomers for ultra-bright fluorescent polymeric nanoparticles

Chemistry of Materials, submitted

C. Grazon, J. Rieger, R. Méallet-Renault, B. Charleux, G. Clavier

Abstract : Four novel BODIPY derivatives (π-) functionalized by different polymerizable groups, styrene (S), phenyl acrylate (PhA), ethyl methacrylate (EtMA), ethyl acrylate (EtA) have been synthesized, and their fluorescence properties were studied in solution. All fluorophores were successfully copolymerized at 2.6 mol% with styrene in a controlled way via a formerly established one-pot RAFT miniemulsion polymerization process leading to fluorescent nanoparticles (Grazon *et al.* Macromol. Rapid Commun. 2011, 32, 699-705). The distribution of the fluorescent monomers along the polymer backbone was monitored by kinetic studies of the copolymerization reaction. Fluorescent stationary and time-resolved spectroscopy were then performed on both the monomers and the nanoparticles (NPs) and the observed differences are discussed in view of the distribution of the fluorescent monomers in the polymer chain. With two of the novel fluorescent monomers (πS and πPhA), the brightness of the NPs could be significantly improved by a factor 2 compared to particles comprising the other BODIPY monomers. These particles were 200 to 2000 times brighter than usual quantum dots and 40 to 300 times brighter than most of the fluorescent polymeric nanoparticles reported in the literature.

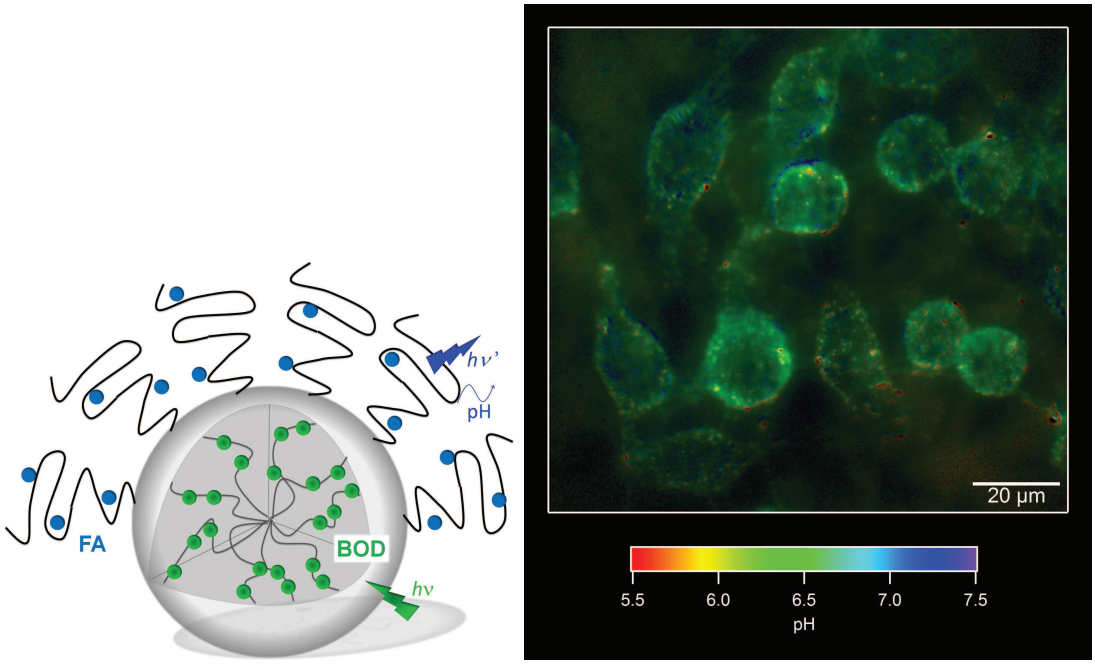


A.3 Biocompatible Ultra-bright Fluorescent Ratiometric pH-Nanosensors

Small, submitted

C. Grazon, J.-F. Audibert, J. Rieger, G. Mbemba, R. Pansu, B. Charleux, R. Méallet-Renault, G. Clavier

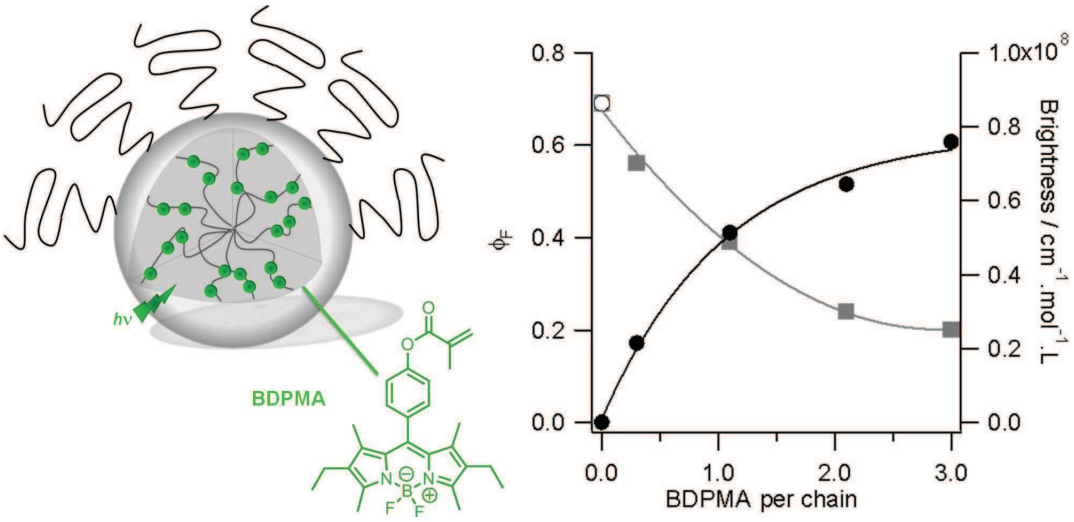
Abstract : A new ratiometric fluorescent pH nanosensor is presented. It is based on ultrabright nanoparticles containing a BODIPY in the core and a grafted-fluorescein dye on the shell. The nanoparticles contain a very large number of both fluorescent moieties. Their spectroscopic characteristics are studied and the pH can be measured between 5.5 and 7.5 very accurately thanks to a large variation of the ratio of the fluorescence intensities of the sensor and the reference dye. These FNP are finally successfully used to image pH in HeLa cells.



A.4 Aggregates of BODIPY monomers in core-shell polymeric micelles

The Journal of Physical Chemistry C, to be submitted

C. Grazon, J. Rieger, B. Charleux, G. Clavier, R. Méallet-Renault



Annexe B : Congrès

B.1 Communications orales

Élaboration et caractérisation de nanoparticules fluorescentes et fonctionnalisables - Polymérisation par voie radicalaire contrôlée en miniémulsion

Journées d'Études des Polymères (JEPO) 2011, Maubeuge, France.

4ème journée POL-IdF, septembre 2011, Thiais, France. *Prix de la meilleure communication orale.*

Journées d'automne 2010 du Groupe Français de Photophysique et de Photochimie (GFP2P), Cachan, France.

B.2 Posters

One-pot synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT miniemulsion Polymerization using a Phase Inversion Process. Synthesis, post-functionnalization and modification of the fluorescent core

Polymer in Dispersed Media, avril 2012, Lyon, France.

One-pot synthesis of Pegylated Fluorescent Nanoparticles by RAFT miniemulsion Polymerization using a Phase Inversion Process

Frontiers in Polymer Science, mai 2011, Lyon, France.

Synthèse "one-pot" de nanoparticules organiques fluorescents auto-stabilisées et biocompatibles : fonctionnalisation en capteurs pour l'imagerie

22ème colloque de l'IFSBM sur les nanotechnologies et leurs applications biomédicales, 2011, IFSBM, Villejuif, France.

Résumé

Les travaux de ce manuscrit présentent la synthèse par une polymérisation RAFT en miniémulsion de nanoparticules fluorescentes (NPFs) polymères à cœur BODIPY copolymérisé au styrène et à couronne hydrophile biocompatible et fonctionnalisable à base de poly(oxyde d'éthylène) et de poly(acide acrylique). Les propriétés de fluorescence de ces NPFs ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps.

L'élaboration de la synthèse de ce type de NPFs, et la mise au point d'un procédé "one-pot" sont présentés dans un premier temps. Ensuite, les propriétés spectroscopiques de ces NPFs sont étudiées, notamment l'influence de la concentration en monomères de BODIPY au cœur des NPFs pouvant mener à la formation d'agrégats peu ou pas fluorescents.

Les propriétés spectroscopiques (longueur d'onde d'émission de fluorescence et rendement quantique) du cœur des NPFs ont été modulées. Cela est rendu possible en réalisant la synthèse de monomères de BODIPY portant des groupements aromatiques encombrés, ou présentant différentes fonctions polymérisables.

La couronne hydrophile des NPFs a également été modifiée afin d'obtenir différentes répartitions des unités acide acrylique et oxyde d'éthylène dans les chaînes de copolymères en surface. Ces nouvelles NPFs sont également synthétisées par un procédé "one-pot".

Enfin, des molécules à fonctions amine (fluorophores, protéines) ont été introduites dans la couronne hydrophile de ces diverses NPFs par une chimie de couplage peptidique sur les fonctions acides carboxyliques. Des nano-senseurs de pH ratiométriques ont ainsi pu être élaborés.

Mots-clés : BODIPY, fonctionnalisation de surface, nanoparticule, pH, poly(acide acrylique) (PAA), poly(éthylène glycol) (PEG), polymérisation en miniémulsion, polymérisation radicalaire contrôlée, poly(oxyde d'éthylène) (PEO), polystyrène (PS), RAFT, senseur, spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps.

Abstract

This PhD work presents the synthesis of fluorescent nanoparticles (FNP) *via* a RAFT miniemulsion polymerisation and the analysis of their fluorescence properties. The core of the FNPs is a copolymer of styrene and a BODIPY monomer, and the shell, which is biocompatible and functionnalisable, is made of poly(ethylene oxyde) and poly(acrylic acid).

First of all, the synthesis' optimisation of those FNPs is presented, and to the development of a one-pot process. Then, the fluorescence properties of those FNPs are studied, especially the impact of the BODIPY monomer concentration on the formation of non or weakly fluorescent aggregates.

In order to change the FNP's spectroscopics properties (fluorescent quantum yield and emission wavelength), novel fluorescent BODIPY monomers have been synthesized. Those monomers presents either some bulky aromatics substituants, either variable polymerisable functions.

The FNPS's hydrophilic shell has also been modified to get different distributions of the acrylic acid and ethylene oxyde units in the polymer chains of the FNPs' surface. Those new FNPs are also synthesized *via* a one-pot process.

At last, molecules bearing an amine function (fluorescent dyes, proteins) have been grafted onto the differents FNPs' shell *via* a peptid coupling reaction on the carboxylic acid functions. As such, some pH ratiometric nano-sensors have been developped.

Keywords : BODIPY, dynamic and static fluorescence spectroscopy, miniemulsion polymerisation, nanoparticle, pH, poly(acrylic acid) (PAA), poly(ethylene glycol) (PEG), poly(ethylene oxyde) (PEO), polystyrene (PS), radical controlled polymerisation, RAFT, sensor, surface modification.