



Etude des interactions de surface et biocompatibilisation de nanocristaux fluorescents

Fabien Knittel

► To cite this version:

Fabien Knittel. Etude des interactions de surface et biocompatibilisation de nanocristaux fluorescents. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. <NNT : 2013PA112220>. <tel-01074022>

HAL Id: tel-01074022

<https://theses.hal.science/tel-01074022v1>

Submitted on 12 Oct 2014

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Chimie ED 470

Laboratoire de Marquage au Tritium

DISCIPLINE : CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 11/10/2013

par

Fabien KNITTEL

Etude des interactions de surface et biocompatibilisation de nanocristaux fluorescents

Directeur de thèse :

Eric DORIS

Chercheur (CEA Saclay)

Composition du jury :

Rapporteurs :

Thierry GACON

Professeur (Ecole polytechnique)

Alain WAGNER

Directeur de recherche (Université de Strasbourg)

Examineurs :

David BONNAFFE

Professeur (Université Paris-Sud)

Benoît DUBERTRET

Directeur de recherche (ESPCI)

Edmond GRAVEL

Chercheur (CEA Saclay)

***à Delphine,
ma femme, mon cœur, mon âme sœur.***

Dans un premier temps je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, le Pr. David Bonnaffé (président du Jury), le Pr. Thierry Gacoin et le Dr. Alain Wagner (rapporteurs) ainsi que le Dr. Benoît Dubertret (examineur et collaborateur), pour avoir accepté de juger mes travaux.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Eric Doris, pour m'avoir encadré durant ce travail de thèse ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée durant ces trois années. Je le remercie également pour ses nombreux conseils et pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Ces trois années dans son laboratoire auront été extrêmement enrichissantes d'un point de vue scientifique. Pour finir je souhaite le remercier pour sa disponibilité, pour sa lecture assidue de mon manuscrit de thèse ainsi que pour ses corrections.

D'autre part je souhaiterais remercier le Dr. Edmond Gravel qui m'a encadré au quotidien durant ces trois années. Je le remercie tout d'abord pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir et pour ses conseils avisés. Je le remercie également pour toutes les autres discussions très enrichissantes et parfois même hilarantes que nous avons pu avoir. Je le remercie pour son aide lors de mon installation au laboratoire ainsi que pour sa disponibilité tout au long de ma thèse et notamment durant la relecture de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier le Dr. Bernard Rousseau pour m'avoir accueilli au SCBM et pour sa gentillesse au quotidien ainsi que pour ses nombreux conseils sur le marquage isotopique au tritium. Concernant le marquage isotopique je tiens également à remercier Florence Pillon qui m'a appris les subtilités du marquage isotopique et qui a été d'une aide précieuse pour la synthèse et la purification de l'acide oléique marqué.

Je souhaite également remercier nos collaborateurs de l'ESPCI, le Dr. Benoît Dubertret et le Dr. Thomas Pons pour leur contribution à ce projet. Ils ont été d'une aide précieuse et m'ont permis de découvrir le monde des Quantum dots. Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Thomas Pons pour sa gentillesse et sa disponibilité durant tout ce travail de thèse. Je lui suis reconnaissant de m'avoir transmis son savoir sur les Quantum dots et de m'avoir initié à de nouvelles techniques notamment de purification par ultracentrifugation.

Je voudrais également remercier l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé au Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay pour leur contribution à ce projet et notamment à la partie sur les études in vivo. Je les remercie pour leur travail sur les injections in vivo chez la souris de nos divers échantillons ainsi que pour le suivi par imagerie du proche infra-rouge.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du SCBM pour leur contribution au bon fonctionnement du service. Je tiens à remercier la secrétaire du service Chantal Faux pour la qualité de son travail et sa disponibilité. Je tiens également à remercier chaleureusement Sébastien Garcia-Argote qui fait un travail remarquable au laboratoire comme technicien et qui fût d'une aide précieuse durant ces trois années. Pour finir, je remercie le service d'analyse et en particulier Céline Puente et David Buisson pour leur aide et les nombreuses analyses réalisées durant ce travail de thèse.

D'autre part je tiens à remercier l'ensemble des doctorants et post-doctorants du service avec qui j'ai passé de bons moments durant ces trois années. Je souhaiterais remercier tout particulièrement Naoko pour les discussions et les fous rires que nous avons pu avoir. Je remercie également Emmanuelle pour m'avoir fait découvrir de nouveaux styles musicaux (notamment les Doors), Simon et Grégory pour leur humour décalé, Céline pour sa joie de vivre, Léa, Pierre, Karen, Hajer, Valérie, Hélène, Sandrine, Nicolas, Guillaume, Clarisse, ainsi que tous les autres. Concernant Julien, qui a effectué sa thèse en même temps que moi, je souhaiterais le remercier pour les discussions que nous avons pu avoir ainsi

que pour le soutien mutuel que nous avons pu nous apporter durant ces trois années. Je le remercie également (ou pas) de m'avoir fait découvrir l'intégrale de Mylène Farmer.

Je voudrais également remercier mes parents pour le soutien qu'ils ont pu m'apporter tout au long de mes études. Je leur suis très reconnaissant et n'aurait pas pu en arriver là sans leur aide.

Pour finir je voudrais remercier Delphine qui a accepté d'être ma femme et qui me soutient au quotidien. Je la remercie de m'avoir supporté, dans tous les sens du terme, durant ces trois années et de m'avoir apporté du réconfort, du courage et de la tendresse.

Liste des abréviations.....	13
Introduction générale.....	15
I. Introduction sur les Quantum dots.	
1 Description d'un quantum dot.	21
1.1 Qu'est-ce qu'un quantum dot ?	21
1.2 Pourquoi un quantum dot fluoresce-t-il ?	22
1.2.1 Principe d'un semi-conducteur.....	23
1.2.2 Définition d'un exciton et du confinement quantique.	23
1.2.3 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence typiques des QD.	25
2 Voies de synthèse des QD.....	26
2.1 Voies de synthèse des QD de type cœur sans coque.	26
2.1.1 L'injection à chaud.	27
2.1.2 Synthèse par chauffage progressif et sans injection de précurseurs.	27
2.2 Voies de synthèse des QD de type cœur-coque.....	28
2.2.1 Pourquoi une coque ?	28
2.2.2 Synthèse de la coque.	30
3 Chimie de surface des quantum dots.	31
3.1 Pourquoi modifier les ligands de surface ?.....	31
3.2 Les échanges de ligands.	32
3.3 La formation d'une micelle.	34
4 Application des quantum dots en imagerie.....	34
4.1 Ciblage Actif	34
4.1.1 Méthodes de greffage de substrats sur une nanoparticule.	35
4.1.2 Imagerie par ciblage utilisant un anticorps.....	36
4.1.3 Imagerie par ciblage utilisant un peptide.....	36
4.1.4 Imagerie par ciblage utilisant une petite molécule.	37
4.2 Ciblage passif	37
5 Conclusion.....	38

II. Étude de l'échange de ligands.

1	Introduction.....	41
1.1	Pourquoi étudier les échanges de ligands ?	41
1.2	État de l'art.	41
1.2.1	Outils de mesures disponibles	42
1.2.2	Le système cœur-ligand : un équilibre complexe.	44
2	Présentation de la méthode mise en œuvre.	48
2.1	Principe général.....	48
2.2	Choix des QD.....	49
2.3	Choix du ligand.	50
2.4	Choix du tritium comme marqueur radioactif.	50
3	Mise au point du protocole.	51
3.1	Préparation et caractérisation de l'acide oléique marqué.	51
3.1.1	Synthèse de l'acide oléique marqué au tritium.....	51
3.1.2	Analyse et stockage de l'acide oléique tritié.	52
3.1.3	Dilution isotopique.	54
3.1.4	Technique de mesure du tritium : le comptage par scintillation liquide.....	54
3.2	Préparation des nanocristaux de CdSe	55
3.2.1	Synthèse des nanocristaux de CdSe.....	55
3.2.2	Caractérisation des nanocristaux de CdSe.....	55
3.2.3	Détermination de la concentration en QD.	59
3.3	Principe du protocole expérimental d'échange de ligands.	60
3.4	Description de la mise au point de certaines étapes du protocole	62
3.4.1	Mise au point de la mesure du tritium (étape 6).	62
3.4.2	Mise au point des paramètres de l'échange de ligands (étape 3).....	64
4	Résultats	67
4.1	Nombre de ligands par QD.....	67
4.2	Nombre de ligands par QD déterminé par dialyse	69

4.2.1	Pourquoi une dialyse ?.....	69
4.2.2	Le principe de la dialyse.....	69
4.2.3	Résultats obtenus.....	69
4.3	Influence des ligands non-liés sur le nombre de ligands liés aux QD.....	70
4.4	Forces relatives des ligands.....	71
4.5	Influence du solvant utilisé pour la purification.....	72
5	Conclusion et perspectives.....	75

III. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés polymérisables.

1	Introduction.....	79
1.1	Pourquoi utiliser un ligand polymérisable ?.....	79
1.2	État de l'art.....	81
1.2.1	Classement des polymères utilisés pour encapsuler les QD.....	81
1.2.2	Stratégies précédemment développées au laboratoire.....	84
1.2.3	Les polydiacétyléniques (PDA), polymères de choix ?.....	85
2	Stratégies mises en œuvre.....	90
2.1	Les stratégies de polymérisation envisagées.....	90
2.2	Les stratégies retenues.....	91
2.2.1	Séquences de polymérisation et structures des ligands retenus.....	91
2.2.2	Stratégies de synthèse des ligands.....	92
3	Formation et caractérisation des nano-objets.....	93
3.1	Préparation des ligands.....	93
3.1.1	Synthèse du ligand L-1	93
3.1.2	Synthèse des ligands L-2 à L-3	93
3.2	Polymérisation du motif diacétylénique en présence du QD.....	94
3.2.1	Polymérisation en milieu organique.....	94
3.2.2	Polymérisation en milieu aqueux.....	96
3.3	Caractérisations des micelles formées.....	98

4	Études de stabilité de QD@Poly en solution	100
4.1	Introduction.	100
4.2	Protocole de mesure.	100
4.2.1	Utilisation d'un amphiphile de référence.	100
4.2.2	Méthode de mesure.....	101
4.3	Résultats.	102
4.3.1	Stabilité vis-à-vis du pH.	102
4.3.2	Stabilité vis-à-vis de la salinité.	103
4.3.3	Stabilité en présence de ligands compétiteurs.	104
4.3.4	Stabilité en milieu oxydant.	105
4.3.5	Stabilité en milieu de culture	106
4.4	Conclusion.....	106
5	Étude de QD@Poly <i>in vivo</i>	107
5.1	Introduction	107
5.2	Préparation des QD émettant dans le proche infra-rouge.....	107
5.3	Résultats	108
5.4	Conclusion et perspectives	109

IV. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés perfluorés.

1	Introduction.....	113
1.1	Brève histoire des composés fluorés.	113
1.1.1	Les débuts au 19 ^e siècle.....	113
1.1.2	L'essor durant la seconde guerre mondiale.	114
1.1.3	Les applications civiles après la guerre.	115
1.1.4	Un nouvel outil de synthèse dans les années 90.....	115
1.1.5	Les applications médicales des 20 ^e et 21 ^e siècles.....	117
1.2	Pourquoi utiliser des amphiphiles perfluorés pour encapsuler des QD ?	118
1.2.1	Interaction spécifique entre chaînes perfluorées.	118

1.2.2	Possibilité d'élaborer une sonde bimodale.	119
1.3	État de l'art.	120
1.3.1	Propriétés des amphiphiles perfluorés.	120
1.3.2	Les applications des micelles d'amphiphiles perfluorés.	121
1.3.3	L'encapsulation de nanoparticules avec des molécules perfluorées.	124
2	Stratégie mise en œuvre.	126
2.1	Stratégie d'encapsulation des QD.	126
2.2	Stratégie de synthèse des ligands.	127
3	Préparation et caractérisation des nano-objets.	129
3.1	Préparation des ligands.	129
3.1.1	Synthèse du ligand L-5.	129
3.1.2	Synthèse des amphiphiles L-6 à L-8.	129
3.2	Caractérisation des micelles formées.	131
3.2.1	Formation des micelles perfluorées.	131
3.2.2	Encapsulation des QD.	132
4	Études de stabilité des QD formés.	134
4.1	Introduction.	134
4.2	Protocole de mesure.	134
4.2.1	Méthode de mesure.	135
4.3	Résultats.	136
4.3.1	Stabilité vis-à-vis du pH.	136
4.3.2	Stabilité vis-à-vis de la salinité.	140
4.3.3	Stabilité en présence de ligands compétiteurs.	141
4.3.4	Stabilité en milieu oxydant.	142
4.4	Conclusion.	143
5	Étude de QD@L-6 <i>in vivo</i>	144
5.1	Préparation des QD émettant dans le proche infra-rouge.	144
5.2	Résultats.	144

5.3 Conclusion.....	145
Conclusion générale.....	147
Partie expérimentale.....	151
Annexe1.....	201
Annexe 2.....	213
Références bibliographiques.....	221

Liste des Abréviations

ACN	acétonitrile
ATP	adénosine triphosphate
Bq	Bécquerel
Ci	Curie
CMC	concentration micellaire critique
CPP	critical packing parameter ou coefficient d'empilement critique
DCM	dichlorométhane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMF	diméthylformamide
DOSY/NOESY	Diffusion Ordered Spectroscopy/Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
EDX	Energy Dispersive X-ray spectroscopy
EPR	Enhanced Permeability and Retention
FTIR	Fourier Transform Infrared spectroscopy Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
HDFD	heptadecafluoro-1-décanethiol
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy
IRM	imagerie par résonance magnétique
LED	light-emitting diode
OA	acide oléique
OA*	acide oléique marqué
Oam	oléylamine
ODam	octadécylamine
PBS	phosphate buffered saline soit tampon phosphate salin
PDA	polydiacétylénique
PEG	polyéthylène glycol
PFC	perfluorocarbure
PL	photoluminescence
PM	poids moléculaire
PTFE	polytétrafluoroéthylène
RDG	tripeptide avec comme séquence primaire : arginine-glycine-acide aspartique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SA	acide stéarique
SAXS	Small-angle X-ray scattering soit diffraction des rayons-X aux petits angles
SDS	dodécylsulfate de sodium
SF	surfactant perfluoré
SH	surfactant hydrogéné
SVF	Fetal Bovine Serum soit sérum fœtal de veau
TBP	tributylphosphine
TEM	Transmission electron microscopy, Microscopie électronique en transmission
TFE	trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane

TOP	trioctylphosphine
TOPO	oxyde de trioctylphosphine
UV-vis	Ultraviolet-visible
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

Introduction générale

Introduction générale.

Les nanotechnologies ont connu un essor fulgurant durant la dernière décennie. L'étude des objets de taille nanométrique (10^{-9} m) n'a cessé de se développer au point que la notion de nanoparticule est présente dans quasiment tous les domaines de la chimie. Cet engouement est probablement dû aux propriétés physico-chimiques exceptionnelles de certains de ces nano-objets qui ont ouvert la voie à des champs d'applications allant de l'ordinateur quantique à l'imagerie médicale en passant par l'énergie photovoltaïque. Nous allons nous intéresser à une famille de nanoparticules appelées « quantum dots » (QD) dont la fluorescence peut être modulée, en jouant sur leur structure et leur taille, sur une large gamme spectrale, allant de l'ultra-violet (UV) à l'infra-rouge (IR). Ces nanoparticules sont composées d'un cœur métallique semi-conducteur et sont le siège d'un phénomène physique, que nous expliciterons plus tard, qui est à l'origine de leurs propriétés de fluorescence et également de leur nom. De par leur mode de synthèse, ces nanocristaux sont recouverts d'une couche de ligands organiques, qui sont généralement hydrophobes. Lorsque les QD sont utilisés à des fins biologiques, une modification de cette couche externe de ligands est nécessaire afin de rendre la particule soluble en milieu aqueux. Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à deux aspects distincts ayant tous deux comme point de départ la nature de la couche de ligands autour du cœur de semi-conducteur.

Dans un premier temps nous avons cherché à mieux comprendre les interactions entre les molécules organiques et la surface métallique du quantum dot afin de mieux appréhender l'échange de ligands qui est une étape clé dans la modification de la couche de surface de ces particules. Pour cela nous avons utilisé un savoir-faire propre au laboratoire qu'est le marquage isotopique au tritium (^3H). L'utilisation de la radioactivité permet de mesurer des quantités infimes de ligands à la surface de la particule et donc d'étudier avec précision le phénomène d'échange ainsi que l'impact des étapes de purifications des QD.

Dans un second temps, nous avons développé de nouvelles couches organiques autour du cœur métallique afin d'augmenter la stabilité colloïdale des particules. L'idée étant d'avoir un assemblage stable autour du cœur qui confère à l'ensemble une résistance aux variations de pH, de salinité et de potentiel redox de l'environnement, et qui permet de limiter les phénomènes d'agrégation des QD en milieu biologique. Deux voies distinctes pour modifier les ligands de surface ont été étudiées. L'une utilise des ligands possédant un groupement photopolymérisable capable de lier plusieurs ligands entre eux afin d'augmenter le nombre des interactions et de stabiliser l'ensemble. L'autre voie est basée sur les interactions entre chaînes perfluorées ayant à la fois un caractère hydro- et lipophile. Dans chacun des cas nous avons étudié la stabilité des particules formées par suivi des paramètres de fluorescence et d'absorbance UV-visible dans divers environnements et testé les nanocristaux encapsulés *in vivo*.

I. Introduction sur les Quantum dots.

I. Introduction sur les Quantum dots.

1 Description d'un quantum dot.

1.1 Qu'est-ce qu'un quantum dot ?

Les points quantiques ou quantum dots (QD) en anglais sont des nanoparticules généralement fluorescentes composées de semi-conducteurs inorganiques. Ils furent découverts dans les années 80 par Alexei Ekimov,¹ et la première synthèse colloïdale organométallique fut publiée par l'équipe de Bawendi² au MIT en 1993. Les propriétés optiques hors du commun des quantum dots sont à l'origine de leur développement fulgurant durant les vingt dernières années. De nombreux types de quantum dots ont vu le jour et ont trouvé des applications dans divers domaines comme les LED,³ l'énergie photovoltaïque^{4,5} ou en tant que marqueur de fluorescence en biologie.⁶

La composition des quantum dots est variable mais ils sont le plus souvent constitués d'un métal de transition (Cd, Zn,...) associé à un chalcogène (S, Se,...) formant une structure cristalline comme le montre l'image de microscopie électronique en transmission de la Figure 1. Les QD de première génération sont formés d'un cristal de CdX avec X = S, Se ou Te.²

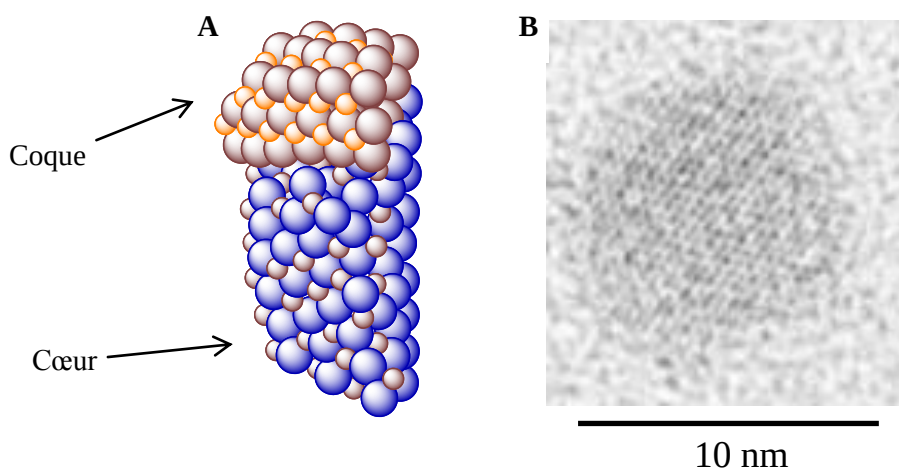


Figure 1 . A. Surface d'un nanocristal cœur-coque. B. Cristal de CdSe observé au microscope électronique (Bawendi *et al.* 1993)

¹Ekimov, A. I.; Onushchenko, A. A. *JETP Lett.* **1981**, 34, 345.

²Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8706.

³Wood, V.; Bulovic, V. *Nano Rev.* **2010**, 1, 5202.

⁴Lohse, S. E.; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 15607.

⁵Kamat, P. V. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1906.

⁶Rosenthal, S. J.; Chang, J. C.; Kovtun, O.; McBride, J. R.; Tomlinson, I. D. *Chem. Biol.* **2011**, 18, 10.

Dans le cas du cristal de CdSe, qui a été étudié durant ce travail de thèse, il existe deux structures cristallines stables à température ambiante : la forme Wurtzite et la forme Zinc Blende⁷ (Figure 2). Ces structures correspondent à la forme hexagonale compacte (Wurtzite) et cubique à faces centrées (Zinc Blende). Dans les deux structures, chaque atome d'une espèce est coordonné de manière tétraédrique aux atomes de l'autre espèce. La différence entre les deux formes réside dans l'empilement des plans cristallins qui est du type ABABAB... pour la forme Wurtzite et ABCABC... pour la forme Zinc Blende. Cependant, malgré des similarités structurales et une très faible différence d'énergie interne entre les deux structures, leurs propriétés spectroscopiques sont très différentes.⁸ De nombreuses voies de synthèses ont été développées pour contrôler la forme et la structure cristalline des nanoparticules de CdSe.⁹

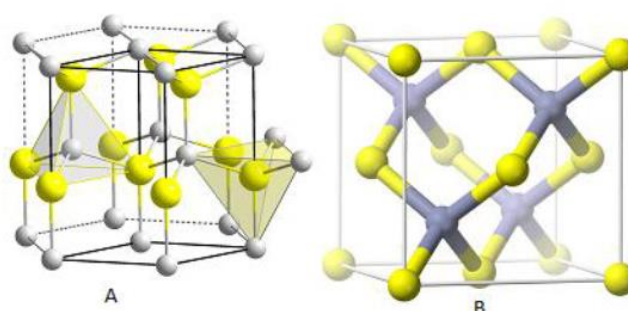


Figure 2. A) Structure hexagonale compacte (Wurtzite) et B) Structure cubique à faces centrées (Zinc Blende).⁷

En parallèle aux cristaux de CdSe, de nouvelles générations de QD ont été mises au point afin d'augmenter le rendement quantique de fluorescence et de protéger le cristal de semi-conducteur. Ceci s'est concrétisé par le développement de quantum dots dits « cœur-coques » où le cœur de CdSe a été recouvert d'une coque en ZnS¹⁰ comme le montre la Figure 1A. L'une des dernières générations de quantum dots se compose d'un cœur entouré non pas d'une mais de plusieurs couches. Dans cette thèse nous utiliserons notamment des QD de type CdSe/CdS/ZnS. Dans ce cas, la couche intermédiaire de CdS permet de diminuer les tensions de maille comme nous le verrons par la suite.

1.2 Pourquoi un quantum dot fluoresce-t-il ?

Le nom « quantum dot » provient du phénomène quantique qui est à l'origine de la propriété de fluorescence. Pour expliquer ce phénomène il nous faut tout d'abord comprendre ce qu'est un semi-conducteur et définir l'exciton ainsi que le confinement quantique.

⁷Manuscrit de Thèse de Joshua James Angell, *California Polytechnic State University San Luis Obispo*, 2011.

⁸Li, S.; Yang, G. *W.J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 15054.

⁹Liu, L.; Zhuang, Z.; Xie, T.; Wang, Y.-G.; Li, J.; Peng, Q.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16423.

¹⁰Daboussi, B. O. et al. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.

1.2.1 Principe d'un semi-conducteur.

Dans un matériau « classique » de taille macroscopique, les électrons peuvent se répartir dans un continuum de niveaux d'énergies délimités dans une zone appelée *bande*. On observe ainsi une bande de valence qui regroupe les électrons participants à la cohésion locale (inter atome) du matériau. Ces électrons ne participent pas aux phénomènes de conduction électrique du matériau. La seconde bande, la bande de conduction, est vide mais peut accueillir des électrons excités provenant de la bande de valence. Pour aller de la bande de valence vers la bande de conduction, les électrons doivent disposer de suffisamment d'énergie pour passer la bande interdite (ou gap), située entre les deux premières. Les électrons promus dans la bande de conduction sont délocalisés et participent aux phénomènes de conduction électrique dans le matériau. Le gap entre les bandes de valence et de conduction est caractérisé par une valeur d'énergie E_g nécessaire pour promouvoir un électron. Dans le cas des métaux, les bandes de valence et de conduction se recouvrent, ce qui permet la délocalisation des électrons à tout moment et confère le caractère conducteur au matériau métallique. Dans le cas d'un semi-conducteur ou d'un isolant la valeur du gap E_g n'est pas nulle comme le montre la Figure 3. Elle sera très élevée pour les isolants ne permettant quasiment pas aux électrons de passer dans la bande de conduction alors que dans le cas des semi-conducteurs la valeur de E_g permet aux électrons qui ont été excités par un photon ou de l'énergie thermique de passer dans la bande de conduction.

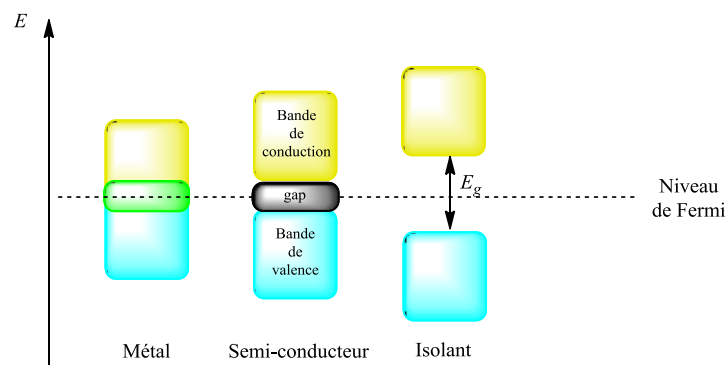


Figure 3. Représentation des bandes de valence et de conduction dans différents types de matériaux.

1.2.2 Définition d'un exciton et du confinement quantique.

Lorsqu'un photon d'énergie $E \geq E_g$ est absorbé par un semi-conducteur, un électron va passer de la bande de valence à la bande de conduction, laissant derrière lui un « trou » de charge positive dans la bande de valence. La fluorescence va provenir de la recombinaison radiative de cette paire électron-trou ou exciton. L'électron ainsi que le trou peuvent se déplacer dans le matériau, cependant l'attraction coulombienne va les maintenir proche l'un de l'autre et l'électron va se mettre à orbiter autour du trou comme dans le modèle de Bohr pour l'atome. Le rayon de cette orbite dépend du

matériau semi-conducteur. Dans le cas du semi-conducteur CdSe, le rayon de Bohr de l'exciton est d'environ 56 Å. Or, si la particule synthétisée possède un rayon inférieur au rayon de Bohr de l'exciton, il va se produire un phénomène de confinement quantique. Celui-ci entraîne le passage d'un continuum d'énergie à des niveaux d'énergies discrétisés. À cause de cette structure électronique discrète, le nanocristal est considéré comme un quasi-atome. Plus le rayon du nanocristal sera faible et plus l'effet de confinement sera important, augmentant la différence d'énergie entre les niveaux électroniques (Figure 4).

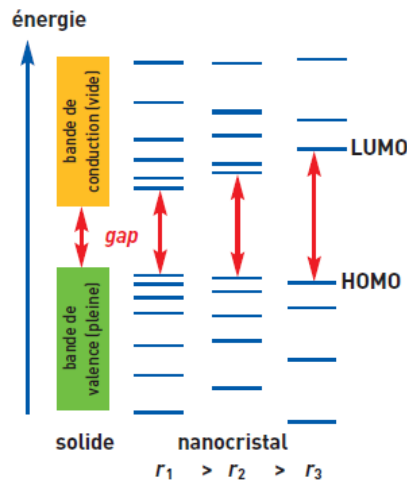


Figure 4. Effet du confinement quantique sur les niveaux d'énergie électronique (clefs CEA-N°52-été 2005).

L'énergie de gap ou E_g dans le nanocristal est en fait composée d'un terme représentant l'énergie de gap E_g^{solide} du matériau massif et de deux autres termes qui correspondent au confinement quantique et aux forces coulombiennes entre l'électron et le trou.¹¹ Le terme de confinement quantique évoluant en $1/r^2$ et celui des forces coulombiennes en $1/r$, il est facile de constater que plus le rayon du nanocristal diminue, plus l'énergie de gap E_g augmente. Ce phénomène permet d'expliquer pourquoi des quantum dots issus d'un même semi-conducteur mais de tailles différentes ne vont pas absorber ni émettre à la même longueur d'onde. Par exemple les QD de CdSe vont pouvoir émettre dans le bleu pour les plus petits et dans le rouge pour les plus grands. D'autre part le gap E_g d'un nanocristal dépend également de la composition chimique du semi-conducteur avec le terme E_g^{solide} . Dans le cas du séléniure de zinc ZnSe, $E_g^{solide} = 2,8$ eV à 300 K alors que pour le séléniure de cadmium CdSe la valeur est de 1,7 eV à 300 K.

En résumé, en jouant sur la nature chimique du semi-conducteur et sur la taille des nanocristaux il est possible de modifier leurs propriétés de fluorescence (Figure 5).

¹¹Clefs CEA-N°52- été 2005.

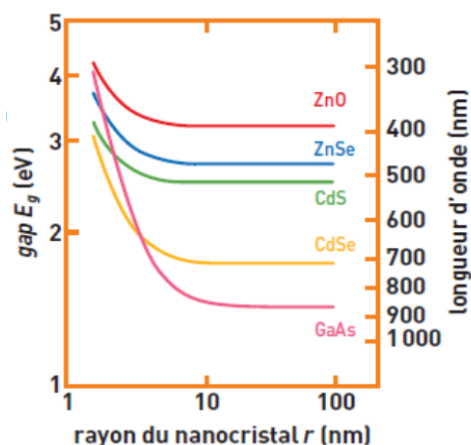


Figure 5. Émission de fluorescence et gap de divers nanocristaux en fonction de leur rayon (clefs CEA – N°52 – été 2005).

1.2.3 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence typiques des QD.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des QD présentent des caractéristiques singulières¹² (Figure 6). Tout d'abord, leur spectre d'absorption est très large avec une section efficace élevée dans le bleu et l'ultra-violet. Cette propriété permet d'exciter différentes tailles de QD avec une unique longueur d'onde. D'autre part, le spectre d'absorption présente un maximum local (à droite du spectre) qui est directement liée à la taille du cristal et qui permet une caractérisation rapide des QD sur la simple base de leur spectre d'absorption. Quant au spectre d'émission de fluorescence, il se présente sous la forme d'une bande d'émission symétrique, relativement fine en comparaison aux fluorophores organiques (environ 30 nm à mi-hauteur) et dont la position dépend du diamètre de la nanoparticule. Un autre avantage des QD, par rapport aux fluorophores organiques, est leur résistance au photoblanchiment, permettant des applications nécessitant un temps d'acquisition long ou le suivi d'une particule unique.¹³

¹²Smith, A. M.; Duan, H. W.; Mohs, A. M.; Nie, S. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, 1226.

¹³Dahan, M.; Levi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A. *Science* **2003**, 302, 442.

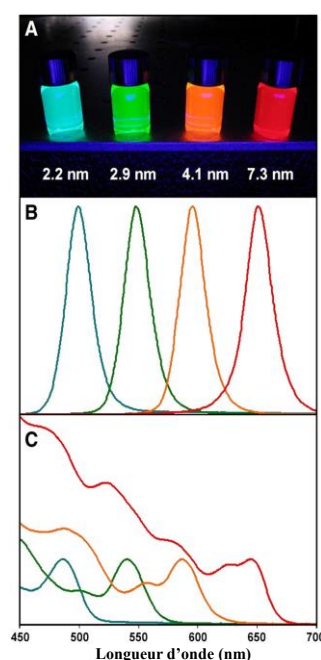


Figure 6. Nanocristaux de CdSe de différentes tailles (A) avec spectres d'émission de fluorescence (B) et d'absorbance (C) associés.¹²

2 Voies de synthèse des QD.

2.1 Voies de synthèse des QD de type cœur sans coque.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, il est très important de pouvoir contrôler la taille et la composition des nanocristaux synthétisés car ce sont ces paramètres qui vont définir les propriétés optiques du cristal. C'est pourquoi un effort de recherche a été mis en œuvre, depuis la première synthèse colloïdale organométallique de Bawendi *et al.*², pour améliorer le contrôle de ces divers paramètres lors de la synthèse. Actuellement, il y existe trois grandes voies de synthèse de nanocristaux de semi-conducteur par voie chimique:¹⁴ l'injection à chaud (hot injection),^{2,15} la méthode par chauffage progressif (heating-up method)^{16,17} et la méthode par réduction.^{16,18,19}

¹⁴Hughes, B. K.; Luther, J. M.; Beard, M. C. *ACS Nano***2012**, 6, 4573.

¹⁵Yin, Y. ; Alivastos, P. *Nature***2005**, 437, 664.

¹⁶Kwon, S. G.; Hyeon, T. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1696.

¹⁷Joo, J.; Na, H. B.; Yu, T.; Yu, J. H.; Kim, Y. W.; Wu, F.; Zhang, J. Z.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.***2003**, 125, 11100.

¹⁸Krylova, G.; Giovanetti, L. J.; Requejo, F. G.; Dimitrijevic, N. M.; Prakashenka, A.; Shevchenko, E. V. *J. Am. Chem. Soc.***2012**, 134, 4384.

¹⁹Ruddy, D. A.; Johnson, J. C.; Smith, E. R.; Neale, N. R. *ACS Nano***2010**, 4, 7459.

2.1.1 [L'injection à chaud.](#)

Bawendi *et al.*² furent parmi les premiers à décrire l'injection à chaud, cette technique repose sur deux étapes clés : la nucléation et la croissance des cristaux. Cette méthode consiste à mélanger des précurseurs de cadmium et de sélénium à température ambiante puis à les injecter dans une solution d'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) à chaud (environ 300°C). Cela a pour effet de produire une multitude de centres de nucléation de manière homogène. La diminution de la quantité de réactifs et la chute brutale de température du milieu (jusqu'à 180°C) empêchent toute nouvelle nucléation. Un re-chauffage graduel jusqu'à 230–260°C permet ensuite la croissance des cristaux autour des germes formés lors de l'injection. Cette croissance est due au phénomène de maturation d'Ostwald (ou *Ostwald ripening*) qui repose sur l'instabilité des petites particules en suspension (due à une énergie de surface élevée) ce qui favorise la formation de particules plus grandes ayant une énergie de surface plus faible et une solubilité apparente plus élevée. Des prélèvements à différents instants de la réaction permettent ensuite d'isoler des nanocristaux allant de 15 à 115 Å de diamètre dont la surface est stabilisée par des molécules lipophiles de type trioctylphosphine et oxyde de trioctylphosphine. Le contrôle de la taille des particules dans cette méthode repose sur la cinétique de croissance des cristaux. Dans la publication de 1993, l'équipe de Bawendi a obtenu un lot de nanoparticules de CdSe relativement homogènes avec une répartition de taille ayant un coefficient de variation d'environ 10%. Depuis, des progrès ont été réalisés permettant d'obtenir des particules de CdSe avec un coefficient de variation inférieur à 5%.²⁰

Cependant l'injection à chaud présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, les précurseurs hautement réactifs ne sont pas disponibles pour tous les éléments pouvant potentiellement composer le nanocristal, ensuite le travail à haute température présente des risques de sécurité et, pour finir, il est extrêmement compliqué d'appliquer cette stratégie à grande échelle, notamment pour des raisons d'homogénéité de température dans le réacteur. C'est pourquoi d'autres voies de synthèse ont ensuite été mises au point. Nous ne détaillerons que celle mise au point par Cao *et al.*²¹ car elle a servi de base pour la synthèse des QD utilisés dans notre étude sur les interactions de surface.

2.1.2 [Synthèse par chauffage progressif et sans injection de précurseurs.](#)

Plusieurs groupes ont tenté de synthétiser des nanocristaux de semi-conducteur par une voie n'impliquant pas d'injection de précurseurs.^{22,23} Cependant les propriétés optiques de ces nanocristaux

²⁰Donegá, C. d. M.; Liljeroth, P.; Vanmaekelbergh, D. *Small***2005**, *1*, 1152.

²¹Yang, Y. A.; Wu, H.; Williams, K. R.; Cao, Y. C. *Angew.Chem. Int. Ed.***2005**, *44*, 6712.

²²Cumberland, S. L.; Hanif, K. M.; Javier, A.; Khitrov, G. A.; Strouse, G. F.; Woessner, S. M.; Yun, C. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1576.

étaient moins bonnes que celles de leurs homologues préparés par injection à chaud.²¹ C'est l'équipe de Cao qui finalement a publié en 2005 une méthode de synthèse²¹ permettant d'obtenir des cristaux de CdSe avec de bonnes propriétés optiques et une distribution homogène en taille. Le principe de cette méthode repose sur des précurseurs de cadmium et de sélénium stables à température ambiante mais qui, au-delà d'une certaine température, deviennent réactifs et amorcent les phénomènes de nucléation et de croissance. Le précurseur de cadmium est du myristate de cadmium qui se décompose à partir de 226 °C tandis que pour le sélénium il utilise de la poudre de sélénium dont le point de fusion est de 221 °C. De plus, le sélénium est insoluble dans l'octadécène (ODE) qui est le solvant de la réaction mais devient légèrement soluble à partir de 190 °C. Ainsi le sélénium et le cadmium ne réagissent pas ensemble avant 200 °C. Typiquement, le milieu est porté jusqu'à 240 °C à une vitesse de 25 K.min⁻¹ et ce n'est qu'à partir de 210 °C que la nucléation débute avec apparition des premiers cristaux qui entrent ensuite en croissance. Le nombre de particules atteint rapidement un maximum pour finir par décroître durant le processus de croissance, diminuant la polydispersité des particules au cours de la synthèse. Ainsi après 2 h de réaction, 72 % des germes initialement formés ont disparu.²¹ Pour finir lorsque les particules ont atteint une taille d'environ 3 nm, de l'acide oléique est ajouté afin de stabiliser la croissance des cristaux. Cette technique nous servira plus tard, notamment parce qu'elle permet d'avoir un nanocristal de CdSe uniquement recouvert d'acide oléique à l'issue de la synthèse.

2.2 Voies de synthèse des QD de type cœur-coque.

2.2.1 Pourquoi une coque ?

Le fait que les quantum dots n'ont que quelques nanomètres de diamètre implique que leur rapport surface/volume est très grand. Cela signifie également qu'une proportion importante des atomes qui le constituent est localisée à sa surface. Cette concentration surfacique joue un rôle majeur sur les propriétés optiques et structurales de l'objet. Les défauts de surface vont être à l'origine de voies de recombinaison non-radiative de l'exciton et donc altérer le phénomène de fluorescence.²⁴ Les ligands de surface présents sur les quantum dots vont permettre une certaine passivation de la surface mais ne suffisent pas à protéger le cristal de son environnement. C'est pourquoi une passivation plus efficace faisant appel à une couche inorganique appelée coque a été développée. Cette coque va augmenter le rendement de fluorescence du cristal et augmenter la stabilité vis-à-vis des attaques environnementales et de la photo-oxydation.²⁵

²³Pradhan, N.; Efrima, S.J. *Am. Chem. Soc.***2003**, 125, 2050.

²⁴Reiss, P.; Protière, M.; Li, L. *Small***2009**, 5, 154.

²⁵Grabolle, M.; Ziegler, J.; Merkulov, A.; Nann, T.; Reschgenger, U. *Ann. N. Y. Acad. Sci.***2008**, 1130, 235.

Il existe plusieurs modèles de cœur-coque en fonction du rapport entre le gap du semi-conducteur du cœur et celui de la coque. Trois grands types de nanoparticules cœur-coque ont ainsi été développés²⁴ (Figure 7). Dans le cas du type I, le gap (entre les bandes de valence et de conduction) de la coque est plus grand que celui du cœur. Cela aura pour conséquence de confiner l'exciton dans le cœur. Dans le modèle de type II, une extrémité de la bande de valence ou de conduction de la coque se retrouve dans la bande interdite ou gap du cœur. Cette superposition va engendrer une séparation spatiale de l'électron et du trou et aura pour conséquence un décalage vers le rouge de l'émission de la particule permettant d'atteindre des longueurs d'ondes d'émission qui seraient inatteignables avec le même matériau en temps normal. Le dernier modèle, appelé type I inversé (reverse type I) possède une coque ayant un gap plus petit que celui du cœur, ainsi suivant l'épaisseur de la coque l'électron et le trou sont partiellement ou totalement localisés dans la coque. En jouant sur l'épaisseur de la coque, il est possible de contrôler le décalage vers le rouge de la longueur d'onde d'émission.⁷

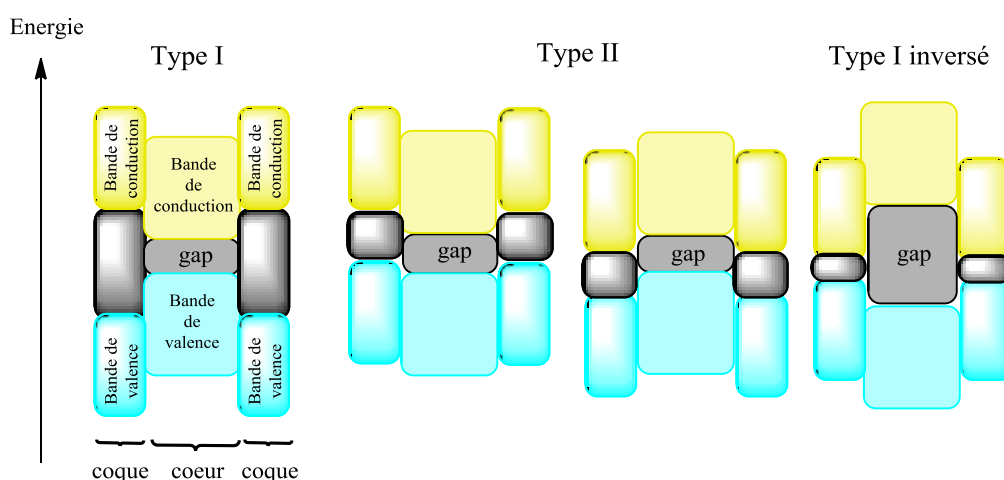


Figure 7. Divers types de structures cœur-coque en fonction des positions des gaps des cœurs et des coques.

Le modèle de QD cœur-coque le plus commun est celui de type I qui est aussi l'un des tout premiers systèmes cœur-coque décrit avec CdSe/ZnS.²⁶ D'autres systèmes ont ensuite été développés notamment CdSe/CdS qui a permis d'obtenir des nanocristaux dont l'émission de fluorescence n'est pas soumise au clignotement ou blinking²⁷ qui est un phénomène parasite qui empêche les QD d'émettre en continu. Cela a été rendu possible notamment parce que les paramètres de maille, c'est-à-dire les caractéristiques du réseau cristallin, entre CdSe et CdS ne diffèrent que de 4 %, rendant ainsi possible la formation d'une coque plus épaisse alors qu'entre CdSe et ZnS la différence entre les

²⁶Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi M. G. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 9463.

²⁷Mahler, B.; Spinicelli, P.; Buil, S.; Quelin, X.; Hermier, J.-P.; Dubertret, B. *Nature Mater.* **2008**, 7, 659.

paramètres de maille est de 12 %^{7,26} ce qui limite l'épaisseur de la coque à 2-3 couches atomiques au-delà desquelles le rendement de fluorescence chute.

En résumé, le développement de divers types de coque a permis d'obtenir des particules plus robustes, ayant de nouvelles propriétés physiques et avec de meilleurs rendements quantiques de fluorescence.²⁸

2.2.2 [Synthèse de la coque.](#)

Les voies de synthèse des systèmes cœur-coque décrites dans la littérature sont très souvent scindées en deux étapes²⁹ : *i*-formation du cœur et *ii*-croissance de la coque. Dans un premier temps, le cœur est formé puis purifié par précipitation avant d'être resuspendu dans un solvant, permettant la synthèse de la coque dans un second temps. De plus, l'injection des précurseurs de la coque se fait de manière lente et contrôlée afin d'avoir une croissance isotrope homogène sur le cœur tout en évitant une nucléation des matériaux de la coque. Pour éviter au maximum ce dernier phénomène, la température de travail pour la croissance de la coque doit être inférieure à la température de nucléation des matériaux qui la constitue.²⁹

Il y a, entre autres, deux approches différentes qui permettent la synthèse de nanocristaux cœur-coque : un protocole d'addition goutte à goutte des précurseurs de la coque et le protocole SILAR³⁰ (Successive Ion Layer Adsorption and Reaction).

2.2.2.1 [Protocole avec croissance goutte à goutte.](#)

Dans le cas des cœurs de CdSe, la manière la plus simple de réaliser la coque est d'injecter très lentement une solution contenant les précurseurs de la coque. Après optimisation des paramètres de température et de vitesse d'injection, il est possible d'éviter la nucléation des éléments constitutifs de la coque et d'avoir uniquement une croissance autour du cœur de CdSe. Cette méthode est facile à mettre en œuvre. Cependant elle présente un inconvénient majeur, elle ne permet pas, dans la plupart des cas, de conserver la monodispersité de l'échantillon initial des cristaux de cœur.²⁹

2.2.2.2 [Protocole de croissance SILAR.](#)

²⁸Chaudhuri, R. G.; Paria, S. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2373.

²⁹Manuscrit de thèse de Benoit Mahler, *Université Pierre et Marie Curie*, **2009**.

³⁰Li, J. J.; Wang, Y. A.; Guo, W. Z.; Keay, J. C.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12567.

Afin d'avoir une croissance homogène de la coque et ainsi conserver la monodispersité de l'échantillon de départ, le protocole SILAR permet une construction de la coque par monocouches atomiques successives.³⁰ L'injection de précurseurs ne se fait pas de manière continue comme précédemment mais par injections successives des précurseurs de cations puis d'anions pour réaliser une monocouche. Après avoir laissé au système le temps de réagir, l'opération est répétée autant de fois que nécessaire suivant la taille de la coque désirée. Pour que ce procédé fonctionne, il est nécessaire de calculer la quantité exacte de précurseur nécessaire pour réaliser une monocouche sur l'ensemble des cœurs présent dans le mélange. Ceci est possible après détermination de la concentration et de la taille des cœurs dans l'échantillon grâce à une mesure d'absorbance. Cette technique a d'abord été mise au point pour la synthèse de CdSe/CdS puis a été développée pour des systèmes plus complexes comme CdSe/CdS/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS.³¹ Le procédé SILAR permet la formation de cristaux cœur-coque monodisperses, avec de bons rendements quantiques de fluorescence et une bonne résistance à l'échange de ligands.

3 Chimie de surface des quantum dots.

3.1 Pourquoi modifier les ligands de surface ?

La nature des ligands qui recouvrent le quantum dot à la fin de la synthèse est variable. Elle dépend du protocole utilisé pour la synthèse et du type de particules formées (cœur ou cœur-coque). Cependant il y a quelques ligands typiques que l'on retrouve dans la majorité des cas. Il s'agit de la trioctylphosphine (TOP), de l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO), d'amines à longue chaîne alcane³² et de l'acide oléique (OA). Ces divers ligands permettent de solubiliser les particules dans de nombreux solvants organiques peu polaires tels que le chloroforme ou l'hexane. Lorsque l'on veut solubiliser les quantum dots dans l'eau ou dans des milieux biologiques, il est important de modifier cette couche organique. Deux grandes voies sont utilisées : soit un échange de ligands afin de remplacer les ligands natifs par des ligands hydrophiles³³, soit une encapsulation dans une micelle de composés amphiphiles.^{34,35} La Figure 8 résume ces deux voies.

³¹Xie, R. G.; Kolb, U.; Li, J. X.; Basche, T.; Mews, A.; *J. Am. Chem. Soc.***2005**, 127, 7480.

³²Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3870.

³³Gravel, E.; Tanguy, C.; Cassette, E.; Pons, T.; Knittel, F.; Bernards, N.; Garofalakis, A.; Ducongé, F.; Dubertret, B.; Doris, E. *Chem. Sci.***2013**, 4, 411.

³⁴Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science***2002**, 298, 1759.

³⁵Carion, O.; Mahler, B.; Pons, T.; Dubertret, B. *Nature Protocols***2007**, 2, 2383.

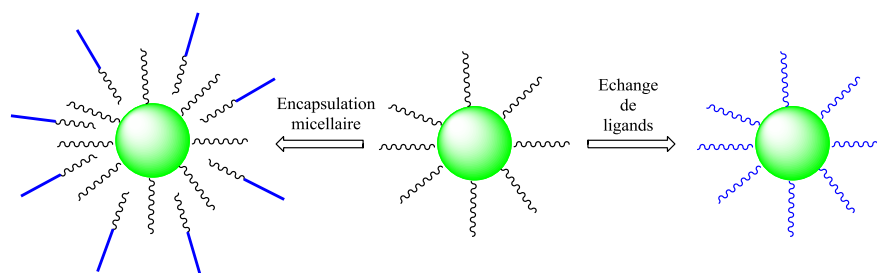


Figure 8. Deux voies possibles de modification des ligands de surface des quantum dots.

3.2 Les échanges de ligands.

Une des techniques pour rendre les quantum dots solubles en milieu aqueux consiste à réaliser un échange des ligands hydrophobes natifs par des ligands hydrophiles. Cette procédure peut se faire notamment par transfert de phase : une suspension organique de nanocristaux est mise en présence d'une phase aqueuse contenant un excès des futurs ligands ayant une forte affinité pour la surface des QD. Après vive agitation, les nanoparticules passent de la phase organique à la phase aqueuse. Dans certains cas, notamment lorsque l'on utilise des composés de type polyéthylène glycol, le nouveau ligand est à la fois soluble dans le solvant organique et l'eau. On procède alors à un échange de ligands dans le solvant organique, suivi d'une purification, en général par précipitation, afin de séparer les QD de l'excès de ligands non liés. Le culot de nanoparticules est finalement resuspendu dans l'eau.³³

Le choix de la fonction qui servira de point d'ancrage est très important car elle aura une influence sur le rendement quantique de fluorescence du QD ainsi que sur la stabilité colloïdale de la particule.³⁶ La Figure 9 résume le principe de la stratégie d'échange de ligands.

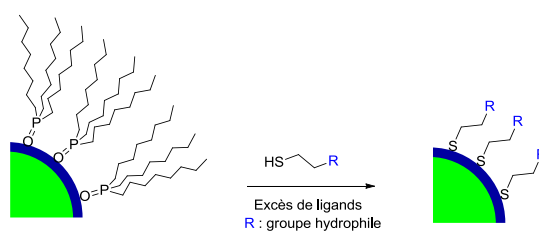
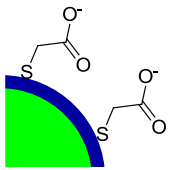
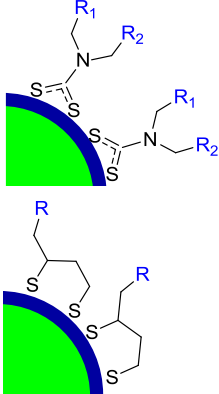
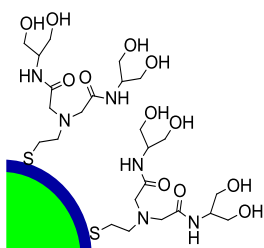
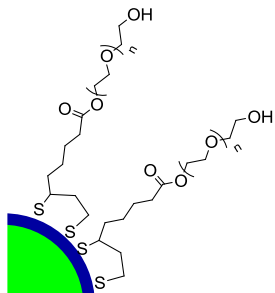
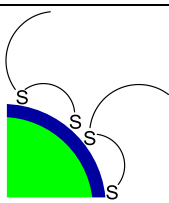
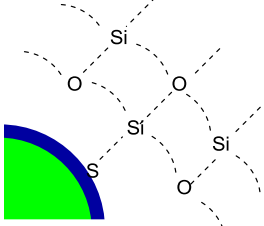


Figure 9. Schéma de principe de la stratégie d'échange de ligands.

Cette stratégie se décline en plusieurs variantes en fonction du groupement utilisé pour fixer le ligand à la surface du QD et du groupement R qui confère la solubilité en milieu aqueux. Le Tableau 1 résume différentes stratégies couramment employées, avec leurs avantages et inconvénients.

³⁶Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera_Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. *Small***2011**, 7, 3113.

Tableau 1. Résumé des stratégies d'échange de ligands.³⁶

Stratégies	Ligands de surface	Avantages	Inconvénients
Mono-thiol terminé avec un acide carboxylique		- Simple - Peu coûteux - Ligands commerciaux	- Instabilité colloïdale - Diminution de PL* - Limité aux milieux neutres et basiques - Liaisons non-spécifiques**
Ligands bidentates (DHLA, dithiocarbamates, et c.)		- Stabilité colloïdale - Très peu de désorption de ligands	- Diminution de PL*
Dendrons 1 ^{ère} , 2 ^e , 3 ^e générations terminés SH, NH ₂ , COOH		- Stabilité colloïdale - Très peu de désorption de ligands - Bonne PL*	- Synthèse complexe
Dérivés PEG		- Stabilité accrue (pH, milieu salin) - Bonne biocompatibilité - Très peu de liaisons non-spécifiques	- Diminution de PL* - Synthèse complexe
Peptides Partie hydrophobe avec cystéine et une partie hydrophile		- Solubilisation et fonctionnalisation en 1 étape - Plusieurs points d'ancrage - Stabilité colloïdale	- Diminution de PL* - Synthèse peptidique complexe
Encapsulation Coque en silice		- Stabilité colloïdale - Meilleure PL*	- Croissance d'une couche fine et homogène complexe

* PL : photoluminescence

3.3 La formation d'une micelle.

L'autre technique consiste à utiliser des amphiphiles qui pourront, par interaction de leurs chaînes hydrophobes avec les ligands primaires et expression de leurs parties hydrophiles vers le milieu extérieur, former une micelle autour du QD conférant l'hydro-solubilité à l'ensemble. Cette technique d'encapsulation a notamment été utilisée par Benoit Dubertret *et al.*³⁴ pour réaliser un suivi du développement embryonnaire chez *Xenopus*. Leur étude a été l'une des premières à montrer que les QD encapsulés dans une micelle pouvaient être utilisés *in vivo*. L'utilisation de phospholipides modifiés sur lesquels ont été greffés des polyéthylène glycols leur a permis d'obtenir des particules stables qui n'ont pas affecté le développement embryonnaire. L'avantage de la technique d'encapsulation réside dans le fait qu'il n'y a pas besoin d'échanger les ligands natifs présents sur la particule, sachant qu'en général un échange de ligand provoque une diminution du rendement quantique de fluorescence. D'autre part il est possible d'avoir une fonction réactive à l'extrémité hydrophile de l'amphiphile qui permettra de greffer une molécule d'intérêt pour le ciblage biologique.

4 Application des quantum dots en imagerie.

Les propriétés optiques exceptionnelles des QD en ont fait des candidats de choix pour réaliser de l'imagerie en milieu biologique. Cette utilisation nécessite le plus souvent d'adresser des QD vers une cible afin d'atteindre de manière spécifique la zone à observer. Il existe deux grands types de ciblage que l'on nomme *ciblage actif* et *ciblage passif*. Dans le cas du ciblage actif, ce sont les interactions entre un ligand et son récepteur, un anticorps et son antigène ou entre deux peptides qui sont mises à profit, alors que dans le cas du ciblage passif (qui n'est utilisable que pour cibler des tissus inflammatoires) seule la taille de la nanoparticule va jouer un rôle dans la bio-distribution.

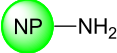
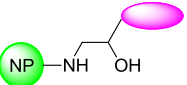
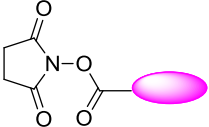
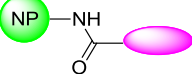
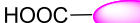
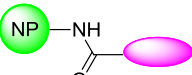
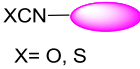
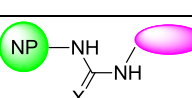
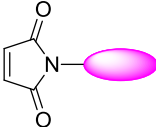
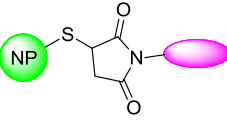
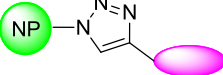
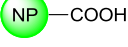
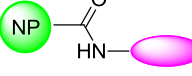
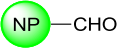
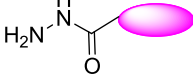
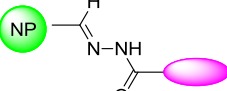
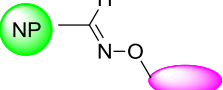
4.1 Ciblage Actif

De nombreuses études ont été menées afin de pouvoir fonctionnaliser les ligands de surface des QD avec l'intention d'y greffer des substrats ayant un intérêt biologique. Trois types principaux de substrats sont utilisés : les anticorps, les peptides et les petites molécules.

4.1.1 Méthodes de greffage de substrats sur une nanoparticule.

Il existe plusieurs voies de couplage d'entités biologiquement actives avec la surface de QD, notamment par formation d'un lien peptidique³⁷ entre un acide à la surface du QD et une amine (extrémité *N*-terminale) d'un peptide par exemple. On peut également utiliser les réactions click : thiol-ène ou azoture-alcyne ou l'interaction entre la biotine et la streptavidine³⁸. Le Tableau 2 résume les techniques de conjugaison les plus utilisées.³⁹

Tableau 2. Résumé des méthodes de couplage d'un substrat sur une nanoparticule.³⁹

Ligand	Substrat	Ligand couplé au substrat	Réaction
			Ouverture d'époxide
			Formation d'un amide
			Formation d'une liaison peptidique
			Réaction d'une amine sur des isocyanates
			Addition conjuguée thiol-maléimide
			Chimie « click »
			Formation d'une liaison peptidique
			Formation d'hydrazone
			Formation d'oxime

³⁷Gussin, H. A.; Tomlinson, I. D.; Littell, D. M.; Warnement, M. R.; Qian, H.; Rosenthal, S. J.; Pepperberg, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15701.

³⁸Bakalova, R.; Zhelev, Z.; Ohba, H.; Baba, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9328.

³⁹Erathodiyil, N.; Ying, J. Y.; *Acc. Chem. Res.* **2011**, 10, 925.

4.1.2 Imagerie par ciblage utilisant un anticorps.

De nombreuses applications ont déjà été mises en œuvre utilisant des anticorps. Ils ont notamment été utilisés pour cibler *in vivo* un antigène présent à la surface de cellules tumorales chez la souris⁴⁰ ou encore pour visualiser des cellules issues de cancers du sein *in vitro*⁴¹ et *in vivo*⁴² en utilisant des QD couplés à des anti-Her2 (Figure 10). Il existe même aujourd'hui des complexes QD-anticorps commerciaux. Il y a tout de même des inconvénients avec cette approche. Tout d'abord, il faut disposer d'un anticorps sélectif et ayant une forte affinité pour la cible. D'autre part, le couplage à un anticorps augmente fortement le rayon hydrodynamique de la particule ce qui peut avoir des effets sur la clairance de cette dernière.

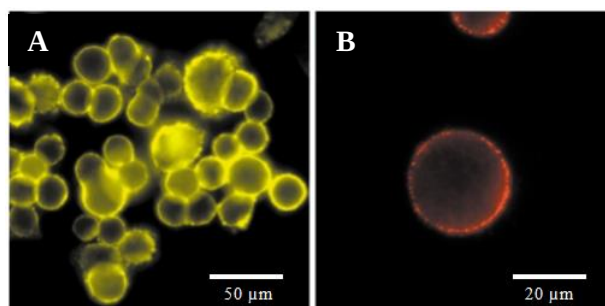


Figure 10. Image de cellules cancéreuses incubées avec de l'Herceptine (anticorps anti-Her2), une IgG biotinylée et des QD 560-streptavidine(A) ou des QD 608-streptavidine(B).⁴¹

4.1.3 Imagerie par ciblage utilisant un peptide.

Des quantum dots fonctionnalisés avec des peptides ont été utilisés pour cibler des protéines cellulaires comme des récepteurs couplés à la protéine G⁴³ ou des canaux ioniques.⁴⁴ Toujours en utilisant des peptides, l'équipe de Smith⁴⁵ a réussi à cibler *in vivo* des cellules tumorales chez la souris (Figure 11) en couplant des QD émettant dans le proche infra-rouge (NIR) avec un motif RGD. L'utilisation de peptides présente de nombreux avantages par rapport aux anticorps, comme notamment une voie d'accès plus simple et plus rapide.

⁴⁰Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. Biotech.***2004**, 22, 969.

⁴¹Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M.P. *Nat. Biotech.***2002**, 21, 41.

⁴²Tada, H.; Higuchi, H.; Wanatabe, T. M.; Ohuchi, N. *Cancer Res.***2007**, 67, 1138.

⁴³Tomlinson, I. D.; Mason, J. N.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Methods Mol. Biol.***2005**, 303, 51.

⁴⁴Orndorff, R. L.; Rosenthal, S. J. *Nano Lett.***2009**, 9, 2589.

⁴⁵Smith, B. R.; Cheng, Z.; De, A.; Koh, A. L.; Sinclair, R.; Gambhir, S.S. *Nano Lett.***2008**, 8,2599.

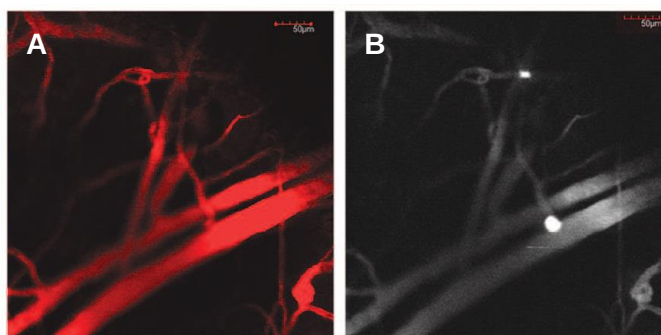


Figure 11. Image de la vascularisation d'une tumeur à l'aide d'Angiosense (A). Image des QD NIR avec une caméra proche infra-rouge (B).⁴⁵

4.1.4 Imagerie par ciblage utilisant une petite molécule.

Des petites molécules, ayant une affinité pour une protéine donnée, peuvent également être greffées à la surface des QD. Il est alors possible de suivre les déplacements de la protéine sur des temps beaucoup plus longs qu'avec des fluorophores organiques classiques. Parmi les exemples de la littérature, nous pouvons citer les travaux de Tomlinson qui a greffé un inhibiteur du transport de la dopamine⁴⁶ ainsi qu'un inhibiteur du transport de la sérotonine.⁴⁷ L'inconvénient majeur de cette méthode est la chimie parfois complexe nécessaire pour greffer les substrats d'intérêt.

4.2 Ciblage passif

L'effet EPR (de l'anglais *Enhanced Permeability and Retention*), est observé au niveau des tissus inflammatoires et en particulier dans les tumeurs solides. La croissance très rapide et anarchique des cellules cancéreuses nécessite un apport massif de nutriment et d'oxygène, cela passe par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en périphérie et à l'intérieur de la masse tumorale. Cependant, cette croissance rapide des vaisseaux dans un environnement inflammatoire entraîne des défauts au niveau de la membrane endothéliale permettant le passage des nanoobjets qui, au fil du temps, vont s'accumuler dans la tumeur.⁴⁸ Par ailleurs, le système lymphatique est très peu développé, voire inexistant, au niveau des tumeurs ce qui limite l'élimination par drainage des particules accumulées (Figure 12). Une étude a notamment été réalisée par Gao *et al.*⁴⁹ et a mis en évidence qu'il était

⁴⁶Tomlinson, I. D.; Mason, J. N.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4664.

⁴⁷Tomlinson, I. D.; Warner, M. R.; Mason, J. N.; Vergne, M. J.; Hercules, D. M.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5656.

⁴⁸Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. nanotechnol.* **2007**, 2, 751.

⁴⁹Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. biotechnol.* **2004**, 22, 969.

possible de cibler des tumeurs chez la souris avec des QD de manière passive (effet EPR) et active. Les auteurs ont toutefois montré que le ciblage passif était beaucoup plus lent et moins efficace que le ciblage actif.

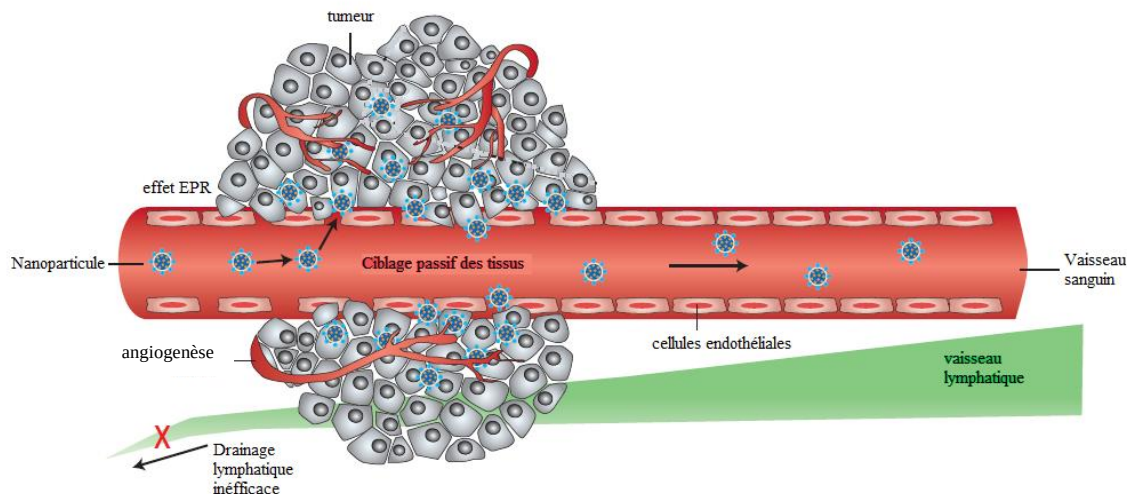


Figure 12. Principe de l'effet EPR.⁴⁰

5 Conclusion.

Les quantum dots présentent un large champ d'applications en biologie que ce soit comme sondes fluorescentes ou outils d'imagerie. Dans cette thèse nous allons nous intéresser à la stabilité colloïdale des QD en milieu aqueux, car malgré les avancées dans la synthèse du cœur inorganique, avec notamment l'avènement de QD émettant dans le proche infra-rouge, un des éléments limitants de leur utilisation *in vivo* reste l'instabilité de la couche de ligands de surface. C'est pourquoi notre travail va porter sur la compréhension des interactions entre ligands organiques et surface des nanoparticules, puis sur la conception et la synthèse de ligands polymérisables et perfluorés pour l'élaboration de particules colloïdales stables.

II. Étude de l'échange de ligands.

II. Étude de l'échange de ligands.

1 Introduction.

1.1 Pourquoi étudier les échanges de ligands ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre qui précède, un quantum dot est constitué d'un cœur inorganique semi-conducteur dont la surface est stabilisée par une couche organique de ligands. Les propriétés optiques de ces nano-objets sont influencées par la couche de ligands organiques. Le cœur va être à l'origine de la formation de l'exciton dont la recombinaison engendrera de la fluorescence. Or, les ligands de surface vont pouvoir influencer l'exciton en modifiant l'énergie de confinement ou alors modifier le ratio entre les processus de recombinaison radiatifs (fluorescence) et non radiatifs. Cela implique que, selon la nature de la fonction chimique, le rendement quantique de fluorescence peut varier. L'effet des ligands est d'autant plus important que la taille du cœur diminue (le rapport surface/volume augmente).⁵⁰

D'autre part la couche organique des quantum dots joue un rôle essentiel pour la solubilisation et la stabilité colloïdale de ces derniers. Or, comme nous l'avons vu précédemment, les ligands organiques présents à l'issue de la synthèse sont dans la plupart des cas hydrophobes, ce qui empêche toute application directe en biologie. Il est donc nécessaire de modifier la couche de surface des QD afin de les rendre solubles en milieu aqueux. L'une des façons de procéder est de remplacer ces ligands par des ligands hydrophiles. Il est alors essentiel de maîtriser le phénomène d'échange de ligands.

Comprendre les interactions de surface et les modes d'échange des ligands permettrait de mieux contrôler les pertes de rendement quantique de fluorescence et surtout de mettre au point un protocole d'échange pour lequel la quantité minimale de ligands en excès ainsi que le temps d'échange seraient optimisés.

1.2 État de l'art.

Au vu des éléments décrits dans le paragraphe qui précède, les chercheurs se sont très vite aperçus qu'il fallait pouvoir analyser à la fois le cœur inorganique et la couche organique des QD. La dualité organique-inorganique inhérente à ces objets complique leur analyse qui doit se dérouler en

deux temps. Les diverses études menées sur la couche organique de ligands à la surface des quantum dots peuvent être classées selon trois grands objectifs, par ordre croissant de difficulté⁵⁰ :

- i- identification des ligands présents à la surface du QD
- ii- quantification du nombre de ligands à la surface du QD
- iii- identification de la géométrie et de la structure intermoléculaire de la couche de ligands

1.2.1 Outils de mesures disponibles

Lorsque l'on veut mener de telles études, il est important de pouvoir disposer d'un signal quantifiable et qui soit propre au ligand étudié. De plus, il est indispensable de pouvoir faire la différence entre le signal des ligands liés à la surface de la particule et celui des ligands libres en solution. Lorsque la technique ne permet pas de distinguer les deux types de signaux, il faut éliminer les ligands libres présents dans le mélange⁵⁰ et ne conserver que le complexe QD-ligand.

De nombreuses méthodes ont été mises au point afin de caractériser la couche de surface des QD avec des techniques d'analyse allant de la spectroscopie infrarouge à la thermogravimétrie⁵¹ en passant par la RMN,^{52,53,54} l'XPS (X-ray photoelectron spectroscopy),^{55,56} ou l'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy).⁵⁷ Chacune de ces techniques présente des avantages mais aussi des inconvénients pour l'étude des quantum dots. Il est souvent nécessaire de coupler plusieurs méthodes analytiques pour obtenir les informations nécessaires à la caractérisation qualitative et quantitative des ligands de surface. Ces données sont essentielles si l'on souhaite étudier l'échange de ligands.

Dans la plupart des travaux sur la couche organique des QD, deux techniques d'analyse au moins sont associées. L'une va permettre de caractériser et quantifier le cœur inorganique (TEM, PL, absorbance UV-vis,...) et l'autre donner des informations sur les ligands organiques (RMN, XPS, FTIR,...). Ces diverses méthodes d'analyses sont souvent complémentaires et ont permis de collecter de nombreuses informations sur l'interaction ligand-surface dans les QD.

⁵⁰ Morris-Cohen, A. J.; Malicki, M.; Peterson, M. D.; Slavin, J. W. J.; Weiss, E. A. *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1155.

⁵¹ Kuno, M.; Lee, J. K.; Dabbousi, B. O.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Chem. Phys.* **1997**, 106, 9869.

⁵² Gomes, R.; Hassinen, A.; Szczygiel, A.; Zhao, Q.; Vantomme, A.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 145.

⁵³ Kopping, J. T.; Patten, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5689.

⁵⁴ Hens, Z.; Moreels, I.; Martins, J. C. *ChemPhysChem* **2005**, 6, 2578.

⁵⁵ Katari, J. E. B.; Colvin, V. L.; Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 4109.

⁵⁶ Sharma, H.; Sharma, S. N.; Singh, S.; Kishore, R.; Singh, G.; Shivaprasad, S. M. *Applied Surface Science* **2007**, 253, 5325.

⁵⁶ Morris-Cohen, A. J.; Donakowski, M. D.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 897.

⁵⁷ Morris-Cohen, A. J.; Frederick, M. T.; Lilly, G. D.; McArthur, E. A.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 1078.

Le Tableau 3 résume les techniques les plus utilisées⁵⁰ ainsi que leurs points forts et leurs faiblesses.

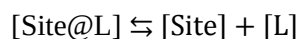
Tableau 3. Résumé des diverses techniques d'analyses appliquées aux QD.

Technique d'analyse	Différenciation ligands liés et non-liés	Eléments mesurés	Avantages	Inconvénients
Infrarouge (FTIR)	Difficile	Vibrations des liaisons chimiques	- rapide - informations sur l'interaction ligand-surface	- pas quantitatif - souvent système figé (type film mince)
Photoluminescence (PL)	Non	Variation de PL des QD en fonction de l'environnement	- Etude de l'influence des ligands de surface sur la PL du QD	- PL du QD extrêmement sensible à l'environnement (température, solvant)
Thermogravimétrie	Difficile	Perte de masse	- permet de déterminer les énergies de liaison entre les ligands et la surface	- connaissance détaillée des ligands présents - détruit l'échantillon
ICP-AES	Non	Spectre d'émission atomique	- Mesure simultanément les différents atomes - Adapté au cœur inorganique (mesure quantitative des divers éléments)	- Non adapté aux éléments composants les ligands (O, N, ...) - détruit l'échantillon
XPS	Oui	Energie de liaison entre les atomes	- détermine le ratio entre un élément spécifique du cœur et du ligand de surface → ratio ligand/QD - permet une étude de l'état d'oxydation des éléments du cœur	- Semi-quantitatif - dépôt d'une solution colloïdale sur un support → perturbe l'équilibre ligand-QD - Dépend de la géométrie des particules - Nécessite l'utilisation de calculs de probabilité - détruit l'échantillon
RMN ¹ H	Oui	Relaxation du spin du noyau	- signal unique par ligand - non-destructif - permet de distinguer les ligands liés des non-liés - RMN 2D permet l'étude de la géométrie des ligands de surface	Nécessite des concentrations élevées de complexe ligand-QD
RMN ³¹ P	Oui			Uniquement les ligands contenant du ³¹ P
RMN 2D (DOSY/NOESY)	Oui			Nécessite des concentrations élevées de complexe ligand-QD

1.2.2 Le système cœur-ligand : un équilibre complexe.

Au fil des informations collectées sur la couche organique enveloppant le cœur semi-conducteur, une compréhension plus précise des interactions ligands-surface s'est dessinée. Dans un premier temps, il a été montré que selon le protocole utilisé pour la synthèse des QD, il était possible de contrôler la chimie de surface du cœur inorganique. Par exemple, dans le cas des QD de type CdSe, l'équipe de Mulvaney⁵⁸ a effectué la synthèse de particules qui avaient une surface riche soit en cadmium soit en sélénium. Les auteurs ont ensuite démontré que les effets des divers ligands de surface sur la photoluminescence du QD n'étaient pas les mêmes suivant l'enrichissement en cadmium ou en sélénium. Ceci marque le premier point important : si l'on veut étudier les phénomènes d'interactions il faut connaître la nature chimique de la surface inorganique. De plus, suivant les ligands de surface, le QD va être plus ou moins soumis au photo-blanchiment et avoir une PL plus ou moins stable dans le temps.⁵⁸

Un second point important est la nature plus ou moins figée du système QD@ligand. Pour la majorité des ligands (oxyde de trioctylphosphine (TOPO),⁵⁹ amine,⁶⁰...), l'ensemble cœur inorganique-couche organique se comporte comme un système dynamique en équilibre⁶¹ :



Où [Site@L] est la concentration des sites liés (site de surface-ligand)

[Site] est la concentration des sites libres (site de surface non-lié)

[L] est la concentration des ligands libres en solution

L'acide oléique, en revanche, permet l'obtention d'un système plus stable⁶² où l'équilibre est fortement déplacé vers la forme [Site@L].

Dans la majorité des cas, la liaison ligand-cœur est réversible ce qui implique que des échanges de ligands sont effectivement possibles en jouant sur les affinités et les concentrations de chaque type de ligands. Il est donc possible de déplacer l'équilibre adsorption/désorption dans la configuration souhaitée :

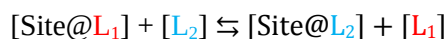
⁵⁸Jasieniak, J.; Mulvaney, P. *J. Am. Chem. Soc.***2007**, 129, 2841.

⁵⁹Moreels, I.; Martins, J. C.; Hens, Z. *ChemPhysChem***2006**, 7, 1028.

⁶⁰Fritzing, B.; Moreels, I.; Lommens, P.; Koole, R.; Hens, Z.; Martins, J. C. *J. Am. Chem. Soc.***2009**, 131, 3024.

⁶¹Morris-Cohen, A. J.; Vasilenko, V.; Amin, V. A.; Reuter, M. G.; Weiss, E. A. *ACS Nano***2012**, 6, 557.

⁶²Fritzing, B.; Capek, R. K.; Lambert, K.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.***2010**, 132, 10195.



Où $[\text{Site@L}_n]$ (avec $n = 1$ ou 2) est la concentration des sites liés (site de surface-ligand)

$[\text{L}_n]$ (avec $n = 1$ ou 2) est la concentration des ligands libres en solution

Toutefois, il faut veiller à ne pas utiliser un excès de ligand trop important car cela pourrait conduire à une dégradation du cœur inorganique. Il a été décrit que pour un nombre de ligands de type acide carboxylique équivalent à plus de 10 000 fois le nombre de sites libres, des atomes de cadmium pouvaient être arrachés et se retrouver en solution sous forme de complexe Cd^{2+} .⁵⁸

Un troisième point important est la compréhension du mécanisme d'échange à la surface du QD. Il y a, dans la littérature, deux grandes études complémentaires sur le sujet. L'une présente le mécanisme d'un double échange de ligands sur un QD de type CdSe-oléate afin de passiver la surface de la nanoparticule, l'autre étudie le mécanisme d'échange entre de l'acide oléique en solution et des oléates complexés à la surface des particules de CdSe.

Dans le premier cas, l'équipe de Kim⁶³ a combiné les techniques d'XPS et de spectrométrie de masse afin d'étudier l'effet d'un premier échange avec de la propylamine (PA) sur un QD de type CdSe recouvert d'oléate puis l'effet d'un second échange avec de la tributylphosphine (TBP). Les auteurs ont montré que la propylamine pouvait arracher les atomes de cadmium de surface peu liés en formant un complexe de type $\text{Cd}[\text{oléate}]_2[\text{PA}]_2$ (Figure 13, voie A) et que la propylamine permettait de stabiliser les orbitales vacantes des atomes de cadmium résiduels. De manière complémentaire, la tributylphosphine (TBP) pouvait arracher les atomes de sélénium de surface peu liés et stabiliser les orbitales vacantes des atomes de sélénium résiduels (Figure 13, voie B). De plus le complexe tributylphosphine-sélénium est à son tour capable de stabiliser des atomes de cadmium. Le mécanisme est résumé dans la Figure 13.⁶³

⁶³Kim, W.; Lim, S. J.; Jung, S.; Shin, S. K. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 1539.

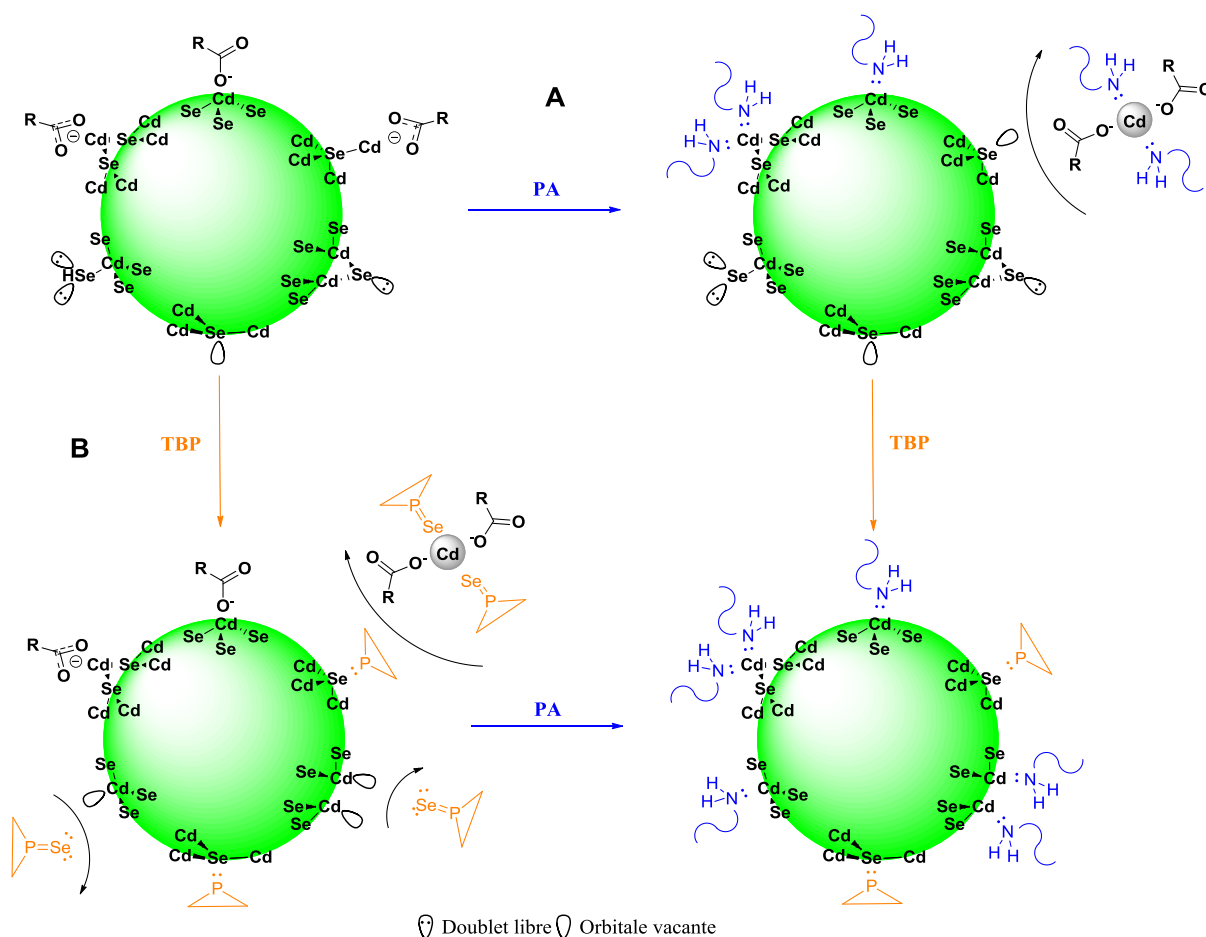
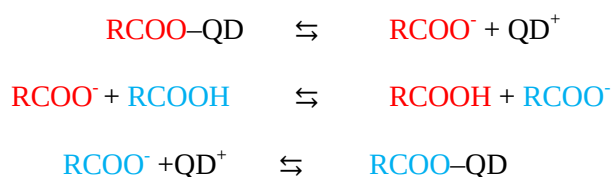


Figure 13. Mécanisme de passivation de la surface d'un nanocristal de CdSe.⁶³

Cette méthode de passivation de la surface permet d'obtenir des particules avec de meilleurs rendements quantiques de fluorescence par rapport aux particules recouvertes d'oléate. En effet, ce dernier ne stabilise pas l'orbitale vacante du sélénium de surface et interagit fortement avec l'orbitale du cadmium de surface. Or, nous avons vu qu'en modifiant la chimie de surface des QD on pouvait fortement influencer l'exciton à l'origine de la photoluminescence.

L'autre étude est celle de Hens *et al.*⁶⁰ qui concerne l'échange des oléates de surface par de l'acide oléique. Les auteurs ont réalisé une étude RMN 1D et 2D afin de comprendre le phénomène de déplacement d'un groupement carboxylate présent à la surface d'une nanoparticule de CdSe par de l'acide oléique. Ce travail a mis en évidence que le mécanisme de permutation de ligands passait par un échange de proton entre les espèces entrantes et sortantes dont on peut écrire le mécanisme de la manière suivante :



Ainsi l'entité en interaction avec la surface de la particule est un oléate et non pas un acide oléique. De plus, d'après la même étude, le rapport entre le nombre de ligands et le cadmium en excès, c'est-à-dire le cadmium en surface, serait de 2 pour 1 afin de respecter l'équilibre de charge entre Cd^{2+} et la charge négative de l'oléate. Il convient cependant de garder à l'esprit que ce ratio dépend de certains paramètres propres aux QD étudiés (excès de cations en surface, impuretés adsorbées, etc.).^{64,65}

Un dernier point important est l'impact des méthodes de purification des QD sur les ligands présents en surface. Comme nous l'avons vu précédemment, il est parfois nécessaire d'isoler dans un premier temps le complexe QD@ligands et de s'affranchir des ligands en excès. Or, dans la grande majorité des cas, cela s'effectue par précipitation et centrifugation des nanoparticules. L'utilisation d'éthanol ou de méthanol permet de faire précipiter le complexe QD@ligands tout en maintenant en solution les ligands en excès. Or, de récentes études^{66,67} ont montré que ces méthodes de purification pouvaient modifier la chimie de surface des QD. Weiss et ses collaborateurs⁶⁶ furent les premiers à étudier en détail les effets des précipitations au méthanol sur des QD de type CdSe synthétisés à partir d'oxyde de trioctylphosphine (TOPO). Leur étude a été réalisée sur deux types de ligands, les ligands de type X chargés négativement (oléate, phosphonate, ...) et les ligands de type L neutres et possédant un doublet non-liant capable de former une liaison dative avec les éléments de surface du cœur (trioctylphosphine (TOP), hexadecylamine,...). Cette distinction est importante car d'après leur étude les ligands de type L peuvent être déplacés en quasi-totalité de la surface du cœur après 2 à 3 précipitations successives au méthanol alors que les ligands de type X sont plus résistants aux lavages successifs. L'équilibre de ces ligands de type X serait donc fortement déplacé vers l'état lié à la surface. Malgré la faible interaction des ligands de type L avec la surface du cristal, ils jouent un rôle extrêmement important dans la stabilité colloïdale des QD ainsi que dans le maintien de la photoluminescence.

Cette étude a été complétée très récemment⁶⁷ en utilisant une méthode RMN qui a permis de mettre en évidence que dans certaines conditions même les ligands de type X pouvaient être déplacés par du méthanol. L'étude a été menée sur des QD de type CdSe et PbSe recouvertes de ligands oléates (type X). Par ajout de méthanol il a été observé que le l'alcool pouvait déplacer l'oléate de surface *via* un mécanisme d'échange de protons. En comparant les effets de différents alcools, les auteurs ont pu établir une hiérarchie vis-à-vis de leur capacité à déplacer l'oléate de surface : $\text{MeOH} > \text{EtOH} > i\text{PrOH}$. Cette capacité a été corrélée au caractère plus ou moins acide de l'alcool considéré. Des tests conduits avec l'acétonitrile n'ont conduit à aucun déplacement d'oléate.

⁶⁴Webber, H. D.; Brutchey, R. L. *J. Am. Chem. Soc.***2012**, 134, 1085.

⁶⁵Malicki, M.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *Chem. Commun.***2013**, 49, 4400.

⁶⁶Morris-Cohen, A. J.; Donakowski, M. D.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. C***2010**, 114, 897.

⁶⁷Hassinen, A.; Moreels, I.; De Nolf, K.; Smet, P. F.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.***2012**, 134, 20705.

La photoluminescence des QD était également fortement dégradée par les précipitations au méthanol alors qu'elle restait stable avec l'acétonitrile. Cette étude a mis en évidence que même des ligands de type X qui étaient supposés être ancrés de manière forte à la surface du QD pouvait être déplacés par un lavage excessif au méthanol.

Au vu des différents travaux de la littérature, il est important de noter que, quelle que soit l'étude menée sur l'interaction entre les ligands et la surface de la nanoparticule, le point essentiel est la détermination de la densité des ligands à la surface du QD. Nous avons donc voulu mettre au point une nouvelle technique basée sur la sensibilité de la détection radioactive afin de pouvoir caractériser la densité de ligands de surface de manière précise.

2 Présentation de la méthode mise en œuvre.

2.1 Principe général.

Dans cette partie, nous avons voulu combiner le savoir-faire de deux équipes de recherche : l'équipe de Benoit Dubertret au Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI) qui possède une expertise en synthèse et développement de quantum dots et notre service qui est spécialisé dans le marquage radioactif de composés organiques. Le principe sous-jacent à notre étude est d'utiliser la sensibilité de la détection radioactive afin de mesurer des quantités infimes de ligands radiomarqués à la surface de la nanoparticule. Nous espérons ainsi pouvoir quantifier de manière absolue le nombre de ligands à la surface du quantum dot. Deux possibilités s'offrent à nous, soit la synthèse du QD est réalisée au départ de précurseurs marqués au tritium, soit un échange de ligands est réalisé à l'issue de l'étape de synthèse du QD (Figure 14).

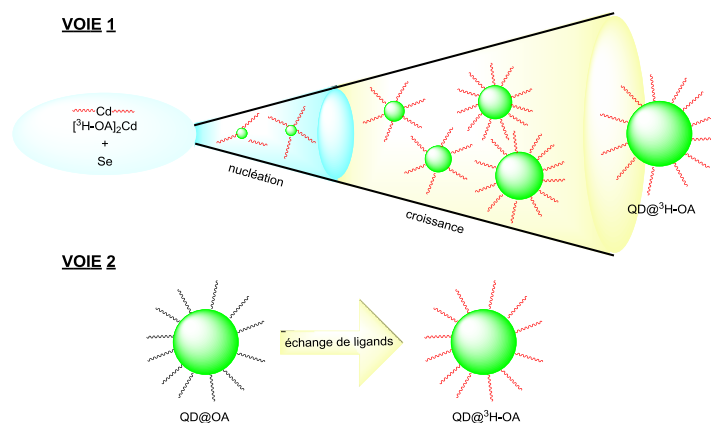


Figure 14. Voies d'accès possibles aux QD marqués ($\text{QD@}^3\text{H-OA}$).

Avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs essais de synthèse de QD de type CdSe au départ d'oléate de cadmium tritié ($[\text{³H-OA}]_2\text{Cd}$) avaient été réalisés (Figure 14, voie 1). Malheureusement, ces essais ont été infructueux car les conditions de synthèse des QD sont difficilement transposables à l'utilisation de la radioactivité. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode d'échange de ligands après la synthèse classique de QD (Figure 14, voie 2). Nous avons mis au point un protocole d'échange de ligands dans lequel de l'acide oléique marqué viendrait substituer de l'acide oléique « froid ». En étudiant les conditions de l'échange, nous souhaitons pouvoir réaliser un échange total et mesurer une valeur absolue du nombre de ligands par particule et ce pour différentes tailles de particules.

2.2 Choix des QD.

Il existe de nombreux types de QD avec des morphologies, des compositions et des structures différentes. Pour notre étude, nous avons choisi de travailler avec des QD de type cœur (sans coque) composés de CdSe. Ce choix a été motivé par diverses raisons. Tout d'abord les QD de type CdSe sont les plus étudiés de tous les nanocristaux de semi-conducteur⁶² et sont donc adaptés pour mener une étude de type « preuve de concept » comme nous l'envisageons. D'autre part, l'accès à ces nano-objets est relativement aisé et de nombreuses voies de synthèse ont été développées pour contrôler leur taille mais aussi leur forme.⁶²

Par ailleurs, pour notre étude, il était important de disposer de nanocristaux de CdSe dont la couche organique était composée exclusivement de ligands oléates. Ainsi nous pouvions comparer l'échange entre deux ligands chimiquement équivalents qui ne diffèrent que par le marquage isotopique du ligand « entrant ». La plupart des synthèses de QD de type CdSe produisent des nanocristaux ayant comme ligands de surface un mélange de plusieurs composés. C'est pourquoi l'équipe de Benoit

Dubertret a dû mettre au point une synthèse légèrement modifiée afin d'obtenir des QD de plusieurs tailles et uniquement recouverts d'acide oléique. Les détails de la synthèse des QD sont donnés en partie expérimentale.

2.3 [Choix du ligand.](#)

Nous avons choisi l'acide oléique comme ligand de référence dans notre étude parce que c'est l'un des composés les plus utilisés pour la formation de QD.^{68,69,70,71} Il présente en effet des propriétés remarquables pour le contrôle de la synthèse des cristaux et permet notamment une régulation de leur vitesse de croissance.⁷² D'autre part l'acide oléique permet l'utilisation de précurseurs sous forme d'oxyde de cadmium (CdO) peu coûteux et stable à l'air.⁷⁰ Ces propriétés si particulières de l'acide oléique en ont fait un pilier dans la synthèse des QD. Il nous paraissait donc évident d'utiliser ce ligand dans notre étude. De plus, l'accès à l'acide oléique radiomarké nous semblait relativement aisé comme nous le verrons plus tard.

2.4 [Choix du tritium comme marqueur radioactif.](#)

L'utilisation de composés radiomarqués a permis de nombreux progrès notamment en biologie avec le développement des premiers immunodosages par Rosalyn Yalow et Solomon Aaron Berson dans les années 50.⁷³ Les composés marqués par un isotope radioactif tel que le tritium peuvent être détectés à très faible concentration. Pour fixer les idées, si l'on remplaçait un atome d'hydrogène par un atome de tritium sur une molécule on pourrait, avec les moyens actuels, détecter quelques femto moles (10^{-15}) de ce composé. C'est cette très grande sensibilité que nous voulions mettre à profit pour notre étude.

Dans le Service de Chimie Bioorganique et de Marquage où j'ai effectué ma thèse, nous avons la possibilité d'utiliser de nombreux isotopes radioactifs afin de réaliser notre étude. Les plus couramment utilisés dans le service sont le carbone 14 et le tritium. L'utilisation du carbone 14 ne nous semblait pas la plus adaptée car cet isotope du carbone présente une moins bonne sensibilité que

⁶⁸Jasieniak, J.; Bullen, C.; Van Embden, J.; Mulvaney, P. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 20665.

⁶⁹Tao, K.; Zhou, H.; Dou, H.; Xing, B.; Li, W.; Sun, K. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 8762.

⁷⁰Harrell, S. M.; McBride, J. R.; Rosenthal, S. J. *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1199.

⁷¹Hens, Z.; Martins, J. C.; *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1211.

⁷²William, W.; Peng, Yu.; Peng, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2368.

⁷³Immunoassay: a practical guide de Brian Law, Edition Tailor&Francis 1996.

le tritium. En effet, la détection du tritium est possible à des concentrations plus faibles que celles nécessaires à la détection du ^{14}C car la demi-vie (c'est-à-dire le temps nécessaire pour la désintégration de la moitié des atomes radioactifs) est plus courte pour le tritium (12,6 ans) que pour le ^{14}C (5640 ans). Le nombre de désintégrations par seconde (Becquerel, Bq) est donc beaucoup plus important pour le tritium que pour le ^{14}C . De manière concrète, une quantité de radioactivité de 1 Curie (Ci) (37 GBq) correspond à 15 mmol de ^{14}C mais seulement à 0,035 mmol de tritium, soit environ 430 fois moins.

De plus, la synthèse de produits marqués au tritium se faisant le plus souvent au départ de tritium gaz, il nous semblait facile d'accéder à l'acide oléique radiomarké par réduction sélective de l'acide stéarolique.

Ces divers éléments de réflexion, nous ont donc fait opter pour le tritium comme marqueur radioactif.

3 Mise au point du protocole.

3.1 Préparation et caractérisation de l'acide oléique marqué.

3.1.1 Synthèse de l'acide oléique marqué au tritium.

L'acide oléique marqué au tritium (OA*) a été synthétisé au départ de l'acide stéarolique par réduction contrôlée sous atmosphère de tritium en présence de palladium de Lindlar, suivant la réaction ci-dessous (Figure 15). L'utilisation d'une source de palladium empoisonnée permet d'éviter la réduction totale de la triple liaison au profit d'une réduction partielle.

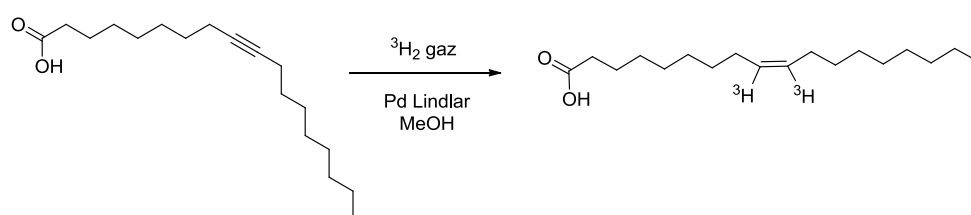


Figure 15. Synthèse de l'acide oléique tritié.

Le tritium gaz est obtenu grâce à un « four à tritium » qui est composé d'un alliage Nickel-Lanthane-Manganèse capable d'adsorber le tritium à température ambiante. L'ensemble du montage utilisé pour les tritiations (réactions de marquage d'un composé avec du tritium) s'appelle « banc de tritiation » (Figure 16). Cet appareil est constitué de deux fours. Un premier four contient du tritium pur. Le second sert à piéger le tritium qui n'a pas été utilisé lors de la réaction chimique et qui est souillé par

des polluants divers (réactifs, solvants) et est dilué isotopiquement (présence d'hydrogène dans le tritium). Ce tritium peut être recyclé pour un usage ultérieur. On réduit ainsi fortement les rejets radioactifs. Des gardes contenant du charbon actif sont placées au-dessus des fours et servent à piéger les molécules organiques afin d'éviter l'empoisonnement de l'alliage. En contrôlant le chauffage des fours, il est possible de désorber une quantité connue de tritium de l'alliage métallique. Un contrôleur de pression permet de suivre la quantité de gaz libéré et de contrôler l'évolution de la réaction. Une fois la réaction terminée, le tritium présent dans le montage est piégé dans le four 2 (Figure 16) par re-adsorption sur l'alliage métallique.

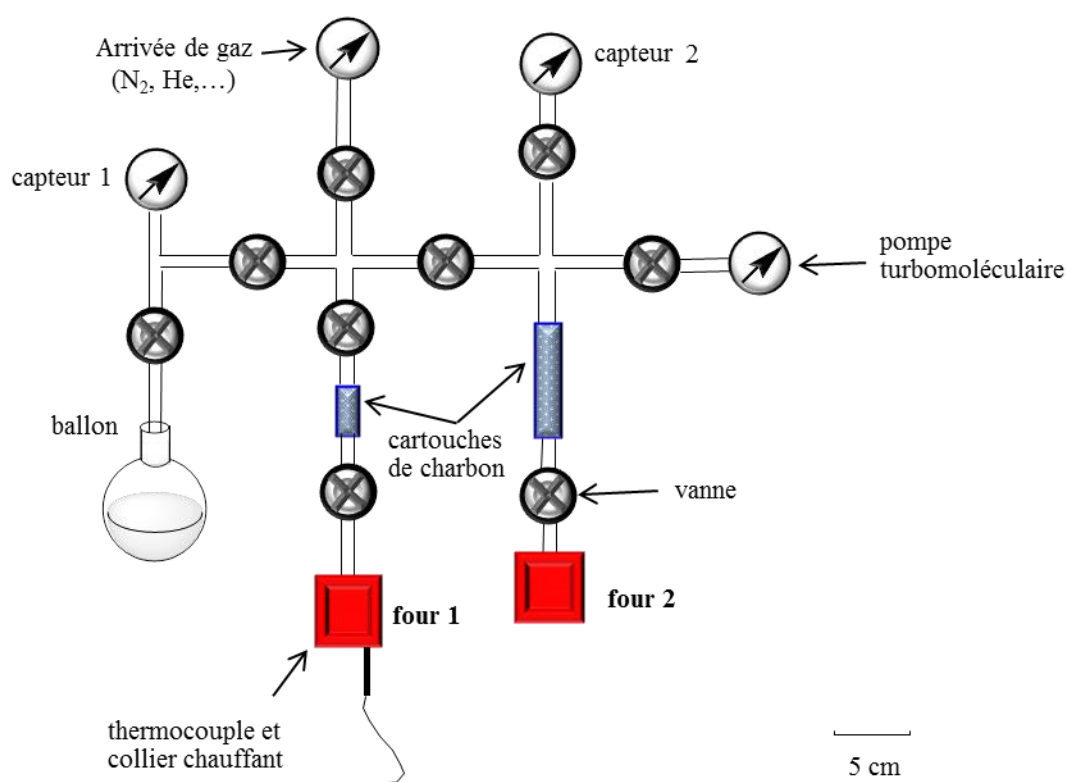


Figure 16. Banc de tritiation du laboratoire.

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est filtré pour enlever le catalyseur puis les solvants sont évaporés en boîte à gants. Cette opération permet également d'éliminer les traces de tritium non-fixé sur la molécule.

3.1.2 Analyse et stockage de l'acide oléique tritié.

L'acide oléique marqué a été purifié par HPLC en phase inverse sur une colonne de type C18. La co-migration avec de l'acide oléique commercial nous a permis de confirmer la nature chimique du composé synthétisé. Pour des molécules marquées au tritium le nombre d'analyses

possibles est restreint. L'analyse par RMN ^1H n'est malheureusement pas possible car il faudrait concentrer énormément le composé et si on considère l'activité spécifique du tritium, cela ferait manipuler des quantités énormes de radioactivité et entraînerait un risque de contaminer le spectromètre. Toutefois, une analyse RMN ^3H est possible, car elle ne nécessite pas de fortes concentrations grâce à la sensibilité du noyau de tritium et au bruit de fond inexistant. Cette analyse ne donne des renseignements que sur la position de marquage et sur les éventuels couplages entre atomes de tritium. Dans notre cas, un singulet élargi à 5,28 ppm correspondant au marquage de la position vinylique a bien été observé. Afin d'avoir une confirmation de la nature du composé et de déterminer l'activité spécifique de ce dernier une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée.

L'activité spécifique d'un composé se calcule à partir du spectre de masse qui nous renseigne sur le nombre d'atomes de tritium incorporés par molécule. Dans le cas de l'acide oléique le poids moléculaire est de 282,26 g/mol soit en analyse ES⁻ un ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ à $m/z = 281$. Or, nous observons 3 pics distincts sur notre spectre de masse : 281, 283, 285. Le pic majoritaire est observé à $m/z = 285$, ce qui correspond à l'acide oléique portant 2 atomes de tritium (ion $[\text{M}-\text{H}+4]^-$). Le pic à $m/z = 283$ correspond, lui, au composé mono-marqué (ion $[\text{M}-\text{H}+2]^-$). Nous avons ainsi, en mesurant l'aire sous chaque pic, pu déterminer l'activité spécifique du composé à l'aide de l'équation :

$$AS_{\text{composé}} (\text{Ci. mmol}^{-1}) = \frac{\sum_{n=0}^N n \times AS_{\text{tritium}} \times Aire_n}{\sum_{n=0}^N Aire_n}$$

Où n est le nombre de tritium présent sur la molécule

AS_{tritium} est l'activité spécifique d'une molécule marquée avec 1 atome de tritium, soit 29 Ci/mmol

$Aire_n$ est l'aire du pic correspondant à la molécule avec n atomes de tritium.

Dans notre cas cette équation peut s'écrire :

$$AS_{\text{acide oléique}} = \frac{0 \times 29 \times 62 + 1 \times 29 \times 350 + 2 \times 29 \times 471}{62 + 350 + 471} = 42,4 \text{ Ci. mmol}^{-1}$$

En d'autres termes, nous avons en moyenne 1,5 atome de tritium par molécule d'acide oléique.

Le fait de connaître l'activité spécifique du composé nous permet de relier une mesure de radioactivité à une quantité d'acide oléique marqué.

Le mode de stockage des composés marqués au tritium est très important car il faut limiter les phénomènes de radiolyse. La désintégration d'un atome de tritium engendre un rayonnement β^- (cf. Annexe 1) qui va produire des espèces actives comme des radicaux libres qui pourront dégrader la solution stock. Afin de minimiser les effets de la radiolyse de l'acide oléique tritié, ce dernier a été conservé à une concentration de 1 mCi.mL⁻¹ à -20 °C dans du toluène.

3.1.3 Dilution isotopique.

Durant les diverses expériences que nous avons menées avec l'acide oléique, nous n'avons jamais utilisé l'acide oléique tritié pur. Nous avons effectué une dilution isotopique, c'est-à-dire mélange de l'acide oléique froid avec de l'acide oléique chaud dans des proportions connues. Ce qui nous donne un acide oléique marqué avec une nouvelle activité spécifique qui s'exprime de la façon suivante :

$$AS = \frac{\text{Activité radioactive}}{\text{Nombre de moles d'acide oléique total (chaud + froid)}} \\ \simeq \frac{\text{Activité radioactive}}{\text{Nombre de moles d'acide oléique froid}}$$

On peut négliger ici la quantité d'acide oléique « chaud » car les dilutions isotopiques réalisées avec de l'acide oléique « froid » sont telles que cette valeur est infime (OA froid/OA chaud ~12 000). Cette dilution est nécessaire pour ne pas manipuler des quantités de radioactivité trop élevées (ce qui serait inutile et dangereux). L'activité spécifique de la solution d'acide oléique utilisée pour nos expériences était en moyenne de $3,6 \text{ Ci.mol}^{-1}$ alors que si nous avions utilisé l'acide oléique marqué pur elle aurait été de $4,2.10^4 \text{ Ci.mol}^{-1}$.

3.1.4 Technique de mesure du tritium : le comptage par scintillation liquide.

L'utilisation de tritium nécessite des techniques de mesure particulières, capables de relier une quantité de radioactivité à une quantité de matière. La méthode de choix dans le cas du tritium est le comptage par scintillation liquide. La compréhension du principe de cette technique est importante afin de mettre au point un protocole adapté pour des échantillons comportant des quantum dots.

Une explication détaillée du comptage par scintillation est donnée en Annexe 1.

En résumé, cette technique permet de convertir un rayonnement β^- en émission lumineuse qui est détectée par une photocathode. Une analyse numérique du signal permet ensuite de remonter à une activité radioactive. Cependant, la technique de comptage par scintillation ne permet pas de récupérer l'échantillon, car ce dernier doit être suspendu dans un liquide scintillant à l'origine de la conversion du signal radioactif en signal lumineux.

3.2 Préparation des nanocristaux de CdSe

3.2.1 Synthèse des nanocristaux de CdSe.

L'équipe de Benoit Dubertret a adapté une synthèse de Cao *et al.* décrite en I. 2.1.2., qui fait appel à des précurseurs de cadmium et de sélénium stables à température ambiante mais qui, une fois chauffés, se décomposent et permettent la nucléation et la croissance des nanocristaux de CdSe. Le protocole détaillé est décrit dans la partie expérimentale.

3.2.2 Caractérisation des nanocristaux de CdSe.

Les divers lots de nanocristaux ont été caractérisés par microscopie électronique en transmission (TEM). Leurs tailles ainsi que leurs formes ont pu être déterminées. Les images TEM représentatives des cristaux étudiés sont présentées en Figure 17.

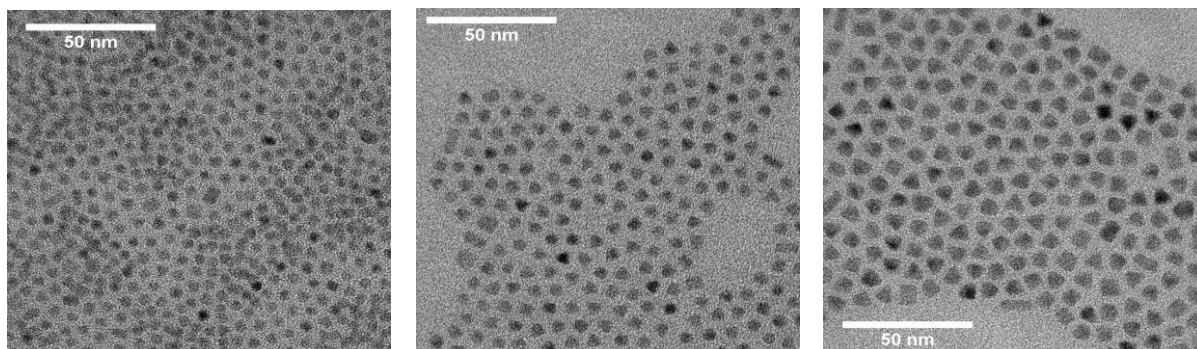


Figure 17. Images TEM de trois lots de QD de CdSe.

Comme on peut le constater sur les images de microscopie ci-dessus, les particules n'ont pas une géométrie sphérique mais plutôt celle d'un tétraèdre. Des images TEM à haute résolution sur des particules de 10 nm ont été réalisées et ont permis de conclure que les tétraèdres n'étaient pas réguliers mais composés de deux faces de type triangle rectangle non-isocèle, d'une face de type triangle rectangle isocèle et d'une face triangle isocèle non-rectangle. Le principe de la découpe ainsi que l'image TEM haute résolution sont donnés en Figure 18.

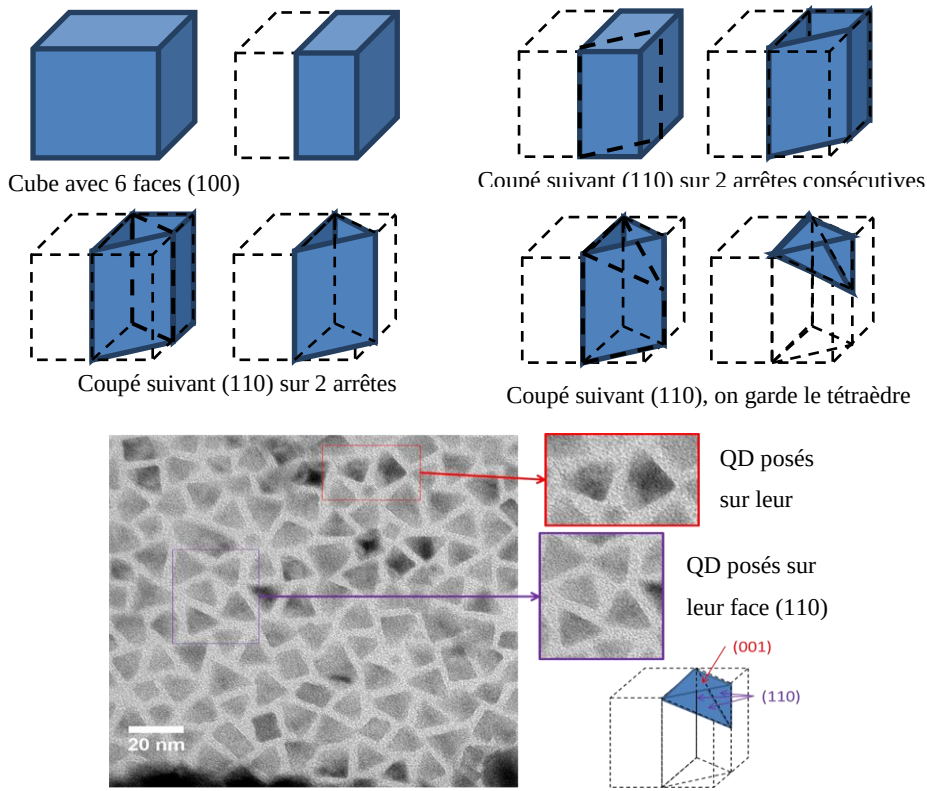


Figure 18. Détermination par imagerie TEM à haute résolution de la forme des QD synthétisés.

En tout, notre étude a porté sur 6 lots de QD de tailles différentes allant de 3,4 nm à 6,9 nm. Ces dimensions ont été mesurées à partir des images TEM des différents lots. Ces dimensions ne sont évidemment pas des diamètres, compte tenu de la forme des nanocristaux, mais représentent la hauteur h de la grande face (110). On suppose en effet que la majorité des QD sont posés sur la grande face (110) de la manière suivante, où « a » est la dimension de l'arête du cube :

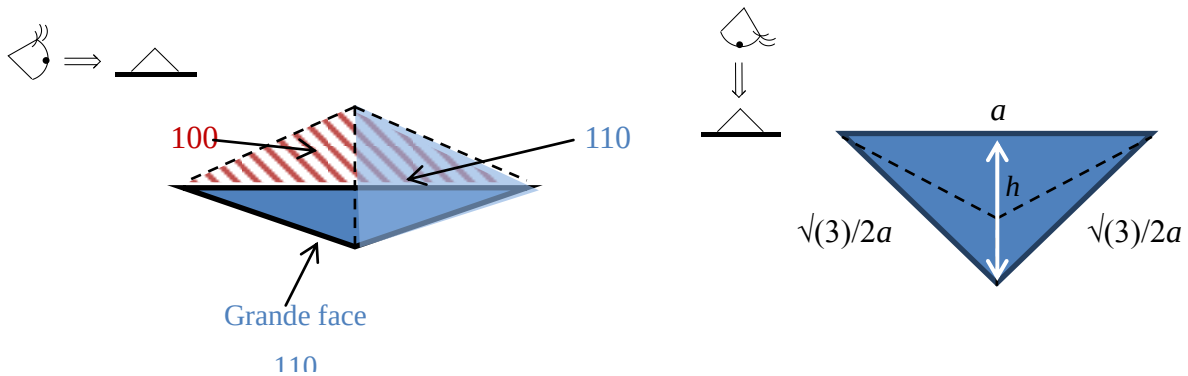


Figure 19. Représentation des nanoparticules de CdSe en fonction du point de vue et représentation de la hauteur mesurée h .

Des moyennes ont été réalisées après de nombreuses mesures pour chaque lot, les données sont résumées dans le Tableau 4, ci-dessous :

Tableau 4. Hauteurs mesurées pour chaque lot de QD

Lot	<i>h</i> (nm)	Écart type (nm)
I^a	3,4	NA
J	4,29	0,62
K	4,64	0,51
L	4,94	0,52
N	5,3	0,53
M	6,91	0,51

^a Le lot I n'a pas pu être mesuré par TEM mais en utilisant l'exciton du spectre UV-visible.

En parallèle de la mesure de taille, une détermination du ratio Cd/Se, c'est-à-dire la quantité de cadmium par cristal en fonction de la quantité de sélénium, a été réalisée à l'aide de mesures d'EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy) et d'XPS (X-Ray photoelectron spectrometry) (Tableau 5). Ces techniques utilisent l'interaction des rayons X avec la matière et le fait que les niveaux d'énergie entre les orbitales électroniques sont discrets et propres à chaque élément. Ainsi, une analyse élémentaire du cœur inorganique est rendue possible.

Dans le cas de l'XPS, il est possible d'avoir un rapport entre l'abondance de divers éléments dans un même échantillon mais il est très difficile d'avoir une mesure quantitative. Cette technique présente par ailleurs des inconvénients lorsque l'on veut analyser des nanoparticules. Il faut, en l'occurrence, tenir compte de la géométrie de la particule. La plupart des études sont menées sur des particules sphériques dont la géométrie isotrope facilite les calculs. Or, dans notre cas, nous avons une géométrie complexe (anisotrope) qui rendait les calculs quasiment impossibles. Toutefois, un ratio a pu être déterminé en utilisant la différence de signal entre un atome de cadmium à la surface du cristal et au cœur de la maille cristalline.(cf. partie expérimentale)

Tableau 5. Valeurs du ratio Cd/Se déterminé par EDX et par XPS pour les différentes tailles de QD.

	h ² (nm ²)	Ratio Cd/Se (EDX)	Ratio Cd/Se (XPS)	écart relatif des ratios (%)
lot I	11,6	1,14	1,09	4,6
lot J	18,4	1,07	1,03	3,9
lot K	21,5	1,09	1,05	3,8
lot L	24,4	1,13	1,07	5,6
lot N	28,1	1,15	1,11	3,6
lot M	47,8	1,11	1,09	1,8

Les mesures par XPS et EDX ont permis de déterminer un ratio Cd/Se moyen de 1,1. Ceci signifie qu'il y a 10 % de cadmium de plus que de sélénium par nanoparticule. Cet excès se retrouve en très grande majorité à la surface de la particule,⁷⁴ le cœur ayant une stœchiométrie de 1 pour 1.

Pour finir, une analyse par DRX (diffractométrie de rayons X) a quant-à-elle permis, par comparaison avec une référence (pics rouge en Figure 20), de déterminer que la structure cristallographique des QD synthétisés était de type Zinc Blende. Un spectre DRX du lot J (4,3 nm) est donné à titre indicatif en Figure 20.

⁷⁴Moreels, I.; Fritzinger, B.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15081.

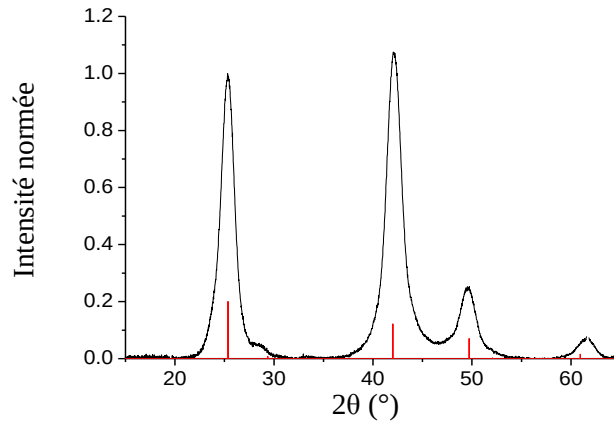


Figure 20. Spectre DRX des QD de CdSe de 4,3 nm (noir), référence pour CdSe zinc blende (ICSD 041528, rouge).

3.2.3 Détermination de la concentration en QD.

La spectroscopie UV-visible permet de déterminer plusieurs éléments. D'une part, la longueur d'onde du premier exciton permet dans certain cas de déterminer le diamètre de la particule lorsqu'elle est quasi-sphérique,⁷⁵ mais les modèles sont souvent développés pour la structure Wurtzite (cf. I. 1.1.) des CdSe or, les QD de notre étude ont une structure zinc blende. D'autre part, il est possible de mesurer la concentration en QD d'une solution à partir de son spectre d'absorbance. Pour ce faire, on utilise la loi de Beer-Lambert qui dit que :

$$\text{Abs}(\lambda) = [\text{QD}] \times \varepsilon(\lambda) \times l$$

Où l est la longueur du trajet optique traversant l'échantillon en cm

$\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$[\text{QD}]$ est la concentration en QD en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$\text{Abs}(\lambda)$ est l'absorbance à la longueur d'onde λ

Bien entendu, il est nécessaire de connaître $\varepsilon(\lambda)$ afin de relier la concentration à l'absorbance. De plus, le coefficient d'extinction molaire va dépendre de la structure cristalline mais aussi de la taille du QD.

⁷⁵ Jasieniak, J.; Smith, L.; van Embden, J.; Mulvaney, P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19468.

L'équipe de Hens⁷⁶ a réalisé une étude sur des QD de type CdSe zinc blende et a déterminé des valeurs de $\varepsilon(\lambda)$ en fonction du volume des nanoparticules de CdSe. Nous avons ainsi pu calculer une valeur de $\varepsilon(\lambda)$ pour nos particules tétraédriques :

$$\varepsilon_{(340 \text{ nm})} = \frac{6 \times 19\,300}{\pi} \times V_{QD}$$

Où V_{QD} est le volume d'une nanoparticule en nm^3

Pour déterminer le volume d'une particule de CdSe nous avons utilisé la formule propre aux tétraèdres irréguliers et nous l'avons adaptée à la hauteur h mesurée (cf. Figure 19) :

$$V_{QD} = \frac{1}{3} \times \text{base} \times \text{hauteur} = \frac{\sqrt{2}}{12} \times h^3$$

La combinaison des deux équations précédentes permet l'expression de $\varepsilon_{(340 \text{ nm})}$ en fonction de la hauteur h mesurée :

$$\varepsilon_{(340 \text{ nm})} = \frac{\sqrt{2} \times 19\,300}{2\pi} \times h^3$$

Grâce à cette relation entre $\varepsilon_{(340 \text{ nm})}$ et la hauteur h de nos QD nous avons pu relier l'absorbance des particules à une concentration. Nous avons mesuré l'absorbance à 340 nm pour tous les échantillons et nous y avons retranché l'absorbance à 700 nm, longueur d'onde à laquelle les QD utilisés n'absorbent pas, afin de mesurer uniquement l'absorbance due aux QD.

Pour chaque échantillon analysé une série de 6 mesures a été réalisée afin de moyenner les spectres obtenus pour avoir une valeur plus précise de la concentration.

3.3 Principe du protocole expérimental d'échange de ligands.

Comme nous l'avons vu précédemment, la synthèse directe avec de l'acide oléique marqué ayant échoué, nous avons procédé à un échange de ligands. L'objectif était d'arriver à un échange total permettant le remplacement de tous les ligands de surface. Après purification de l'excès de ligands tritiés, la concentration en acide oléique lié à la surface pourrait être déterminée grâce au comptage par scintillation, la concentration en QD étant fournie par le spectre UV-visible. Ainsi, nous disposons de tous les éléments pour déterminer une densité de ligands de surface. Le protocole expérimental est schématisé en Figure 21.

⁷⁶Čapek, R. K.; Moreels, I.; Lambert, K.; De Muynck, D.; Zhao, Q.; Van Tomme, A.; Vanhaecke, F.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 6371.

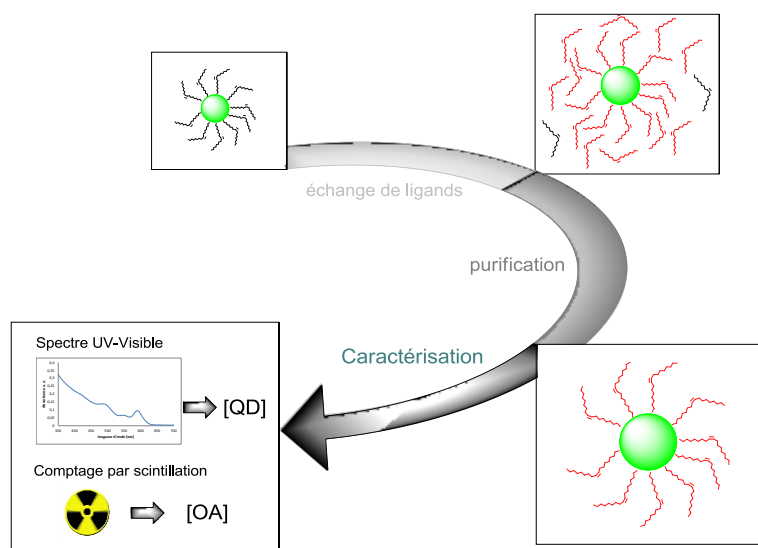


Figure 21. Protocole expérimental pour le comptage des ligands.

Le protocole détaillé est donné en partie expérimentale. Toutefois les étapes clés sont décrites dans le Tableau 6. Chacune de ces étapes a nécessité une mise au point afin d'avoir un protocole reproductible donnant des résultats fiables. Il a fallu, entre autres, s'assurer que l'échange de ligands était complet et que les étapes de purification permettaient bien de séparer les ligands liés au QD des ligands non-liés en solution. Au total, plus de 300 expériences ont permis de mettre au point un protocole robuste, où chaque étape est optimisée.

Tableau 6. Étapes du protocole mis au point pour la détermination du nombre de ligands/QD.

Etape n°	Opération réalisée	But de l'étape	
1	- Prélèvement d'une partie de la solution de QD initiale. - Précipitation dans le méthanol	Enlever les composés non liés aux QD issus de la synthèse.	Préparation des QD et des ligands
2	- Préparation de la solution d'acide oléique marqué - Mesure de la radioactivité	Avoir une solution d'acide oléique marqué dont l'activité spécifique (AS) est connue.	
3	Les QD de l'étape 1 sont mis en présence de la solution d'OA préparée à l'étape 2 (le solvant est le toluène)	Echanger les ligands froids par les ligands marqués au tritium	Echange de Ligands
4	- Précipitation des QD dans du méthanol - Lavage du culot final avec du méthanol	Séparer les ligands liés aux QD (culot) des ligands libres en solution (surnageant)	Purification
5	Ajout d'un volume précis d'hexane au culot	Resuspendre les QD en une solution homogène	
6	Prélèvement d'un faible volume (moins de 2 %) de la solution de QD de l'étape 5 pour un comptage par scintillation liquide	Déterminer la concentration en acide oléique marqué grâce à l'AS déterminée à l'étape 2	Mesures de [QD] et [OA]
7	Le reste de la solution de l'étape 5 est utilisée pour une mesure d'absorbance UV-visible	Déterminer la concentration en QD grâce à la loi de Beer-Lambert	

3.4 Description de la mise au point de certaines étapes du protocole

3.4.1 Mise au point de la mesure du tritium (étape 6).

Le comptage par scintillation liquide, dont le principe est détaillé en Annexe 1, impose un certain nombre de règles quant à son utilisation. Il y a deux points importants :

- (i) L'activité totale de l'échantillon mesurée doit être inférieure à 0,1 μCi .
- (ii) Les effets de « quenching » doivent être pris en compte.

De nombreux essais ont été réalisés afin d'obtenir une radioactivité dans l'échantillon final (étape 5 du Tableau 6) qui soit compatible avec le comptage par scintillation (i), sans que le volume prélevé ne soit trop faible ou qu'il faille faire trop de dilutions. Car dans les deux cas il y aurait des possibilités d'augmenter l'erreur de mesure. Il a donc fallu ajuster la quantité de radioactivité de départ, ce qui implique d'ajuster également la quantité de QD afin d'avoir un excès de ligand entrant par unité de

surface suffisant, comme nous le verrons en 3.4.2. Au final après optimisation, 1 mCi d'acide oléique marqué, a été utilisé pour chaque expérience. Cela permet d'obtenir 3 mL de solution à l'étape 5 du protocole (Tableau 6), ce qui est suffisant pour la mesure d'absorption UV-visible et permet un prélèvement entre 50 et 150 μL pour effectuer une mesure par scintillation liquide. En général, la valeur de radioactivité obtenue à l'étape 6 du protocole après optimisation est de quelques nCi ce qui reste dans la gamme de mesure de l'appareil.

Une fois le point (i) maîtrisé, il a fallu s'assurer que l'échantillon mesuré ne produisait pas d'effet de « quenching » (ii). Ce phénomène se produit lorsque l'échantillon absorbe à la longueur d'onde d'émission des fluorophores composant le liquide scintillant, soit environ 450 nm. Ceci entraînerait une mesure de l'intensité lumineuse inférieure à celle émise par le liquide scintillant, et de ce fait, une sous-évaluation de la radioactivité de l'échantillon. Or, dans notre cas, les QD utilisés (CdSe) absorbent à cette longueur d'onde. Il a donc fallu nous assurer que, dans nos conditions de mesure, la quantité de QD (entre 0,02 et 0,07 nmol) n'influait pas de manière significative le comptage par scintillation. C'est une des raisons pour lesquelles la quantité de solution (50 -150 μL) prélevée est faible. En effet, le risque de quenching augmente avec la quantité d'échantillon repris dans le liquide scintillant utilisé pour la mesure. Toutefois dans un souci de rigueur, nous avons procédé à des mesures de radioactivité de diverses quantités d'acide oléique marqué en présence et en absence de QD. Les résultats sont résumés dans le Tableau 7, ci-dessous.

Tableau 7. Détermination de l'influence des QD sur la mesure de radioactivité par scintillation liquide.

Acide oléique marqué (OA*, mol)	QD (mol)	Ratio QD / OA*	Ecart relatif de la mesure avec et sans QD (%)
6.10^{-14}	$4,4.10^{-11}$	733	1,67
1.10^{-14}	$3,6.10^{-10}$	36 000	6,25
6.10^{-13}	$4,4.10^{-11}$	73	0,5
$1,5.10^{-12}$	$2,2.10^{-9}$	1 467	3,5
6.10^{-12}	$2,2.10^{-9}$	367	3,5

Ces valeurs n'ont pas été choisies au hasard. Dans le protocole optimisé, la quantité moyenne de QD récupérés à la fin de l'étape 5 est de $2,2.10^{-9}$ mol. Or, pour la mesure de scintillation à l'étape 6 on prélève environ 2 % de cette solution, cela signifie que dans l'échantillon introduit dans le liquide scintillant il y a environ $4,4.10^{-11}$ mol de QD. La même démarche a été réalisée avec la quantité d'acide oléique marqué qui est de l'ordre de 5.10^{-12} mol dans la solution finale (étape 5) et de 10^{-13} mol dans l'échantillon utilisé pour la scintillation liquide. Nous avons réalisé une gamme de quantités d'acide oléique marqué allant de 10^{-14} à 6.10^{-12} mol et une quantité de QD allant de 4.10^{-11} à 2.10^{-9} .

On remarque que pour la plupart des expériences, les QD influencent très peu la mesure avec un écart relatif inférieur à 3,5 %. Ce n'est qu'en utilisant des quantités extrêmement faibles d'OA* et un grand excès de QD (36 000 fois plus) qu'on remarque une influence significative de plus de 6 %. Dans nos conditions expérimentales de mesure de radioactivité (étape 6) le ratio QD/OA* est compris entre 80 et 700 environ, pour une quantité de QD aux alentours de $4 \cdot 10^{-11}$ mol et une quantité d'OA* voisine de 10^{-13} mol, ce qui, d'après les résultats du Tableau 7, devrait nous donner une erreur relative de mesure inférieure à 1,7 %. Cette erreur est acceptable pour l'utilisation que nous envisageons.

3.4.2 Mise au point des paramètres de l'échange de ligands (étape 3)

Il y a essentiellement trois grands paramètres qui influencent l'échange de ligands à la surface du nanocristal : (i) l'excès de ligands utilisé pour l'échange ; (ii) le temps d'échange ; et (iii) la température d'échange.

(i) Excès : Une fois le protocole d'échange mis au point en tenant compte des divers points développés aux paragraphes précédents, nous avons cherché à déterminer la quantité d'acide oléique nécessaire pour saturer l'échange.

Rappel : dilution isotopique.

Il est important de rappeler pour la suite, que nous réalisons une dilution isotopique, comme expliqué au paragraphe 3.1.3., ainsi lorsque l'on parle de « quantité d'acide oléique nécessaire pour l'échange » il s'agit bien d'un mélange d'acide oléique froid et marqué formant une solution avec une activité spécifique (Ci/mole) globale donnée.

Nous avons donc utilisé un des lots de QD que nous avons à disposition (lot N, $h = 5,3$ nm) afin de réaliser cette étude de saturation. La quantité de QD de départ (3 nmol pour le lot N) ayant été fixée, selon les contraintes expliquées au paragraphe précédent, nous avons fait varier la quantité de ligands en excès pour réaliser l'échange. Un temps arbitraire d'échange de 15 min au bain à ultrasons a été fixé afin de ne faire varier qu'un seul paramètre à la fois. (Figure 22).

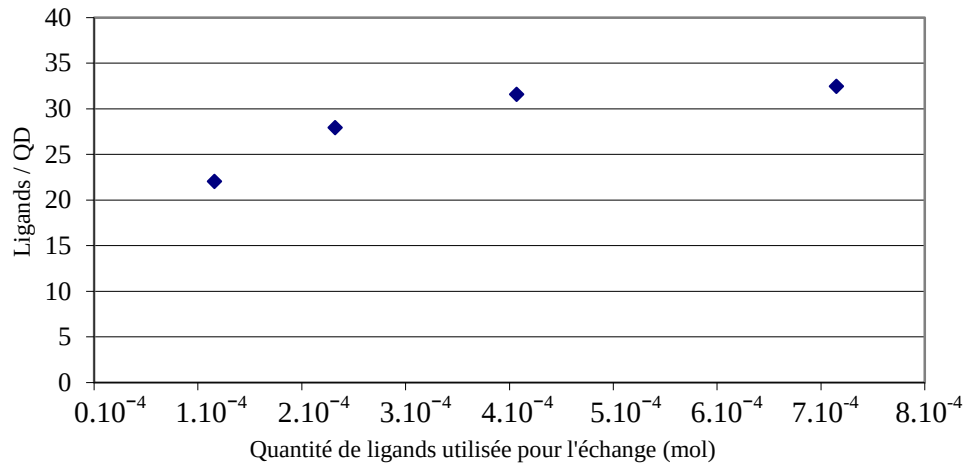


Figure 22. Évolution du nombre de ligands par QD en fonction de la quantité de ligand de départ.

On observe qu'à partir d'une certaine valeur (4.10^{-4} mol), le nombre de ligands par nanoparticule n'évolue plus. Nous avons donc atteint la saturation de l'échange pour le paramètre « quantité de ligands en excès utilisé pour l'échange ». Pour la suite de nos expérimentations, nous avons choisi de nous placer à environ 4.10^{-4} mol d'acide oléique pour réaliser l'échange. Cela représente un excès d'environ 3 500 ligands par unité de surface (nm^2) de la nanoparticule. Nous n'avons pas choisi une valeur au-delà de 4.10^{-4} mol d'OA car des problèmes de viscosité apparaissent à des concentrations trop élevées.

(ii) Temps : Une fois la quantité d'acide oléique fixée, nous avons fait varier le second paramètre, le temps d'échange sur plusieurs lots de nanoparticules de tailles différentes.

Nous avons fait varier le temps de 15 min à plusieurs heures (jusqu'à 28 h pour le lot N ($h = 5,3$ nm)). Il est important de noter que pour 15 min, et uniquement ce temps, nous avons utilisé une agitation dans un bain à ultra-sons mais pas pour les temps plus longs afin d'éviter de dégrader la structure du QD (Figure 23).

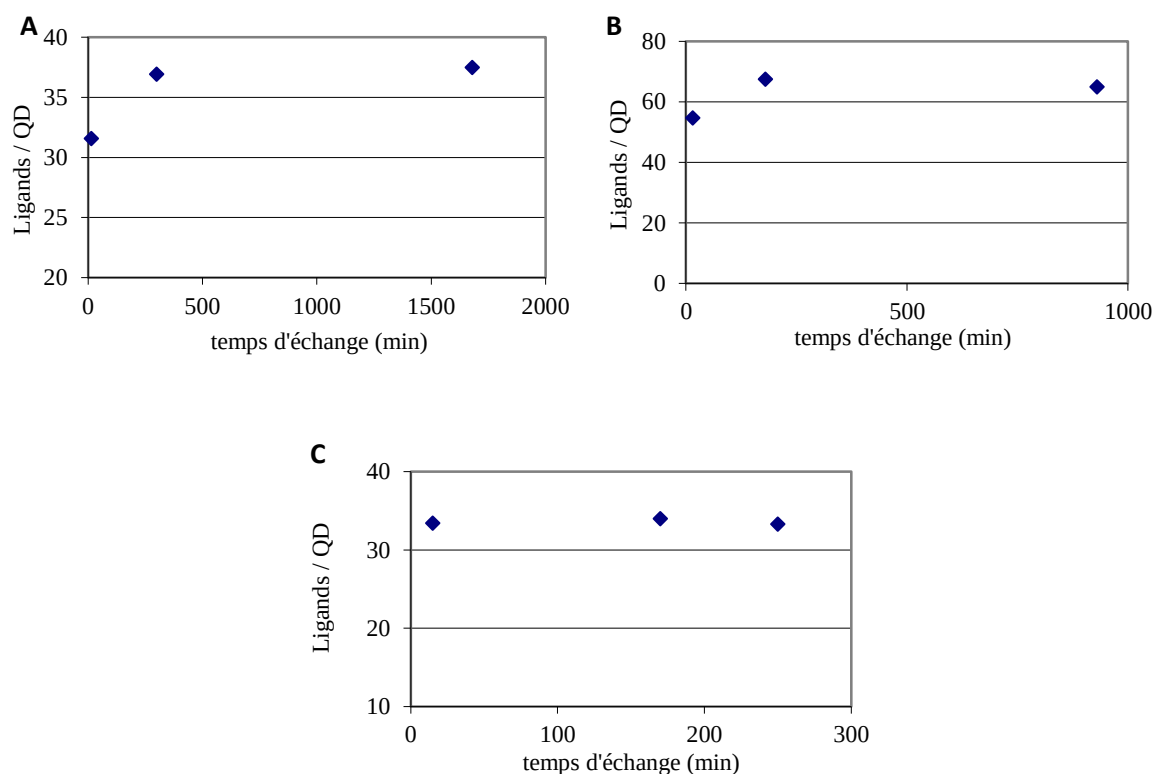


Figure 23. Évolution du nombre de ligands par QD en fonction du temps d'échange pour des QD de (A) 5,3 nm, (B) 6.9 nm, (C) 4,9 nm.

On remarque que pour les tailles supérieures à 5 nm, le temps d'échange nécessaire pour atteindre la saturation est d'environ 4 h, alors que pour les tailles inférieures à 5 nm, 15 min au bain à ultrasons suffisent pour saturer l'échange. Dans l'optique d'un gain de temps, nous avons fait un échange de 15 min pour les tailles de QD inférieures à 5 nm et 4 h uniquement pour les deux tailles supérieures à 5 nm.

(iii) Température : En menant deux expériences d'échange de ligands en parallèle, dans un cas à température ambiante (environ 20 °C) et dans l'autre à 50 °C, nous avons observé qu'en présence d'un excès d'acide et à chaud, les QD de notre étude n'étaient pas stables. Nous avons donc opté pour une procédure à température ambiante.

4 Résultats

Une fois la mise au point du protocole achevée, nous avons pu réaliser une série de mesures sur plusieurs tailles de QD de type CdSe. Nous avons voulu déterminer dans un premier temps la densité de ligands par nanoparticule puis quantifier l'affinité relative pour la surface du QD de diverses fonctions chimiques par rapport à l'acide carboxylique (oléique) de départ.

4.1 Nombre de ligands par QD

Nous avons procédé à une série de mesures sur diverses tailles de nanocristaux allant de 3,4 à 6,9 nm. Pour chaque taille de cristaux, trois mesures ont été réalisées au minimum et une valeur moyenne déterminée (Tableau 8).

Tableau 8. Résultats des mesures de densité de ligand par QD pour des tailles allant de 3,4 à 6,9 nm.

	h^2 (nm ²)	Ligands/QD	Ligands/nm ²	écart type Ligands/QD
lot I	11,6	19,7	0,89	0,8
lot J	18,4	27,1	0,77	0,7
lot K	21,5	33,4	0,81	2,5
lot L	24,4	33,6	0,72	0,3
lot N	28,1	33,9	0,63	0,9
lot M	47,8	66,3	0,73	2,5

Globalement on observe une augmentation du nombre de ligand par QD en fonction de la taille, tandis que le nombre de ligands par unité de surface est relativement constant. Nous avons représenté ces résultats sur un graphique (Figure 24) afin de pouvoir déterminer s'il y a une linéarité dans l'évolution du nombre de ligands/QD en fonction de la taille des objets.

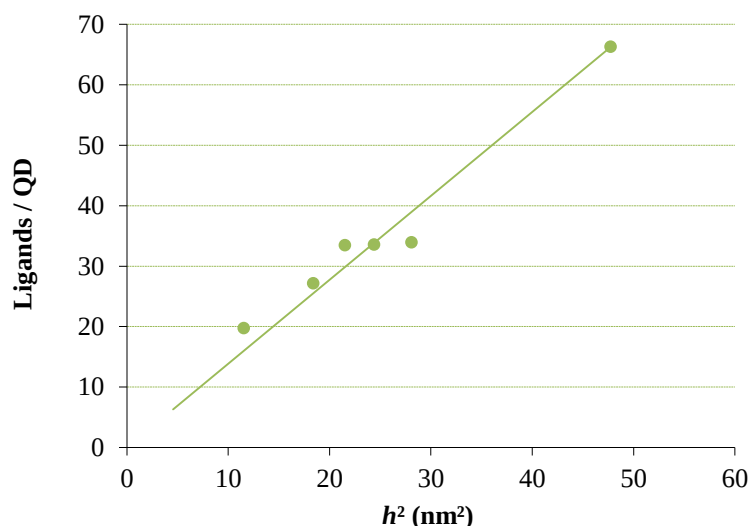


Figure 24. Nombre de ligands par QD en fonction de leur taille.

Il semblerait y avoir une relation linéaire entre l'évolution du nombre de ligands par QD et la taille de la nanoparticule. La linéarité que nous avons obtenue, nous permet d'assumer que la forme des QD est la même quelle que soit leur taille, ce qui n'était pas observable par TEM pour les QD de la plus petite taille (3,4 nm). Cela se traduit par une densité de recouvrement constante avec, en moyenne sur toutes les tailles de QD, une densité de 0,8 OA/nm². Cette valeur est faible comparée à d'autres valeurs de la littérature. Par exemple, l'équipe de Hens⁷⁷ avait trouvé 4,6 OA/nm² et l'équipe de Webber⁷⁸ 2,5 stéarate/nm². Cette différence peut être expliquée par une composition en cadmium et sélénium différente des QD utilisés. En effet, les QD utilisés dans les travaux de Hens, possèdent un ratio Cd/Se de 1,23 ce qui correspond à un excès de 23 % de Cadmium. Or l'excès de cadmium se trouve à la surface de la particule, le cœur de la particule ayant une stœchiométrie 1:1. Dans notre cas, cet excès de cadmium n'est que 10 % en moyenne. La surface de nos particules est donc beaucoup moins riche en cadmium, cela expliquerait en grande partie pourquoi nous trouvons une densité de ligands plus faible. De plus nos particules sont tétraédriques alors que celles utilisées dans l'étude de Hens sont sphériques.

⁷⁷Fritzing, B.; Capek, R. K.; Lambert, K.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10195

⁷⁸Webber, H. D.; Brutchey, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1085

4.2 Nombre de ligands par QD déterminé par dialyse

4.2.1 Pourquoi une dialyse ?

Pour compléter notre étude nous avons voulu nous assurer que les étapes de purification impliquant une précipitation dans du méthanol n'altéraient pas la surface de nos particules. Ces soupçons étant fondés sur des études récentes,^{66,67} publiées au cours de notre travail, concernant l'influence du méthanol sur la chimie de surface des QD de type CdSe et notamment sur la capacité de ce dernier à déplacer des ligands de surface (cf. paragraphe 1.2.2.).

Il nous fallait donc remplacer l'étape 4 du protocole (précipitation au méthanol, cf. Tableau 6) par un autre moyen de purification n'impliquant pas de méthanol. Nous avons opté pour une dialyse et vérifié si le nombre de ligands par QD variait en fonction du protocole de purification utilisé (dialyse vs précipitation)

4.2.2 Le principe de la dialyse

Le principe de la dialyse est d'utiliser la différence de potentiel chimique d'une espèce présente dans deux compartiments séparés par une membrane perméable aux petites molécules. La différence de potentiel chimique étant due à une différence de concentration, les diverses espèces capables de traverser la membrane vont passer d'un compartiment à l'autre de façon à avoir un potentiel chimique, c'est-à-dire dans ce cas une concentration, identique de part et d'autre de la membrane. L'astuce réside dans le fait que les volumes des deux compartiments sont très différents ainsi à concentration égale il y aura plus de matière dans le compartiment avec le plus grand volume. Il est donc possible de séparer les QD entourés de leur couche de ligands (le complexe ne pouvant pas diffuser à travers la membrane) des ligands non-liés.

4.2.3 Résultats obtenus

Nous avons procédé à trois expériences de dialyse sur deux tailles de QD (2 expériences pour le lot N, $h = 5,3$ nm ; 1 expérience pour le lot M, $h = 6,9$ nm) (Figure 25). Dans les deux cas étudiés, nous n'observons pas de différence significative du nombre de ligands/QD lorsque la dialyse est utilisée en lieu et place d'une précipitation au méthanol. En effet, nous observons un nombre de ligands proches pour les tailles 5,3 nm (41 vs 38*) et 6,9 nm (60 vs 66*) pour les deux protocoles utilisés.

*valeurs provenant de la régression linéaire réalisée pour les résultats issus du protocole de précipitation.

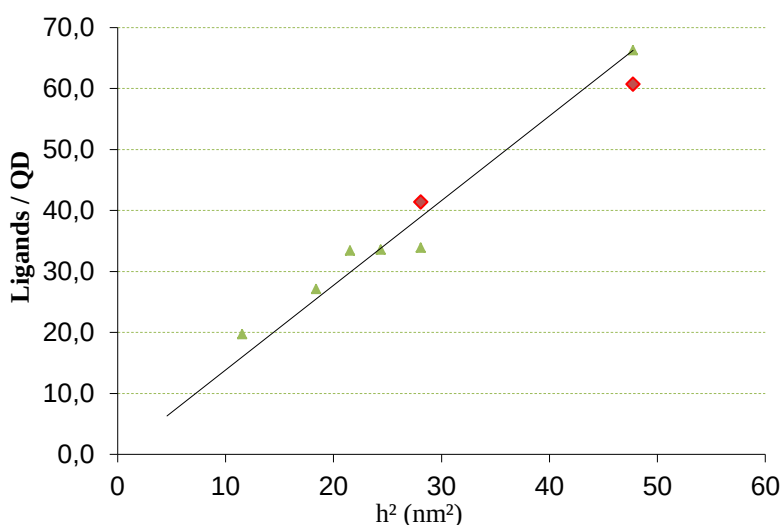


Figure 25. Comparaison des résultats obtenus après deux cycle de précipitation (▲) et après dialyse (◆).

Nous avons donc pu montrer qu'une purification par dialyse donnait des résultats équivalents par rapport à la méthode utilisant deux cycles de précipitation au méthanol, confortant ainsi les résultats obtenus précédemment.

Cependant, lorsque nous avons effectué un essai en procédant à trois précipitations au méthanol, une perte d'environ 52 % du nombre de ligands par nanoparticule a été observée. Ce résultat est confirmé par une étude de Hens,⁶⁷ qui suggère que la précipitation au méthanol décroche les ligands de surface après un certain nombre de cycles (trois en l'occurrence).

4.3 Influence des ligands non-liés sur le nombre de ligands liés aux QD

D'après les travaux de la littérature,⁶⁶ les ligands non-liés jouent un rôle important dans la solubilisation des particules et la densité des ligands de surface. Lorsque cette quantité de ligands non liés devient quasiment nulle (après purification du QD, par ex.), une précipitation supplémentaire au méthanol a des conséquences drastiques sur la densité de ligands à la surface de la particule. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'impact énorme du troisième cycle de précipitation sur la densité de surface des ligands (perte de 52 % du nombre de ligands par nanoparticule).

Une seconde observation vient conforter le rôle des ligands non liés. Nous avons réalisé un double échange de ligands avec de l'acide oléique marqué sur les QD. C'est-à-dire que nous avons procédé à un premier échange de ligands, suivi par deux cycles de précipitations, puis un second échange de ligands, identique au premier, suivi également par deux cycles de précipitations au méthanol. Au final, le nombre de ligands mesuré par QD est le même que lorsque nous procédons à un unique échange.

Nous avons donc bien atteint la saturation de l'échange. Cependant, nous avons réalisé au total 4 cycles de précipitation ce qui aurait dû conduire à une chute drastique du nombre de ligands par QD entre le second et le troisième cycle, ce qui n'a pas été observé. La différence ici est l'ajout de ligands non liés lors du second échange (avant le troisième cycle de précipitation au méthanol). Ces derniers ont probablement un rôle protecteur sur la couche de ligands en interaction avec le QD.

En conclusion, les ligands de type X (*e.g.* acides carboxyliques) ou L (*e.g.* amines) non liés au QD (en solution) jouent un rôle important sur le maintien de la densité de ligand à la surface de la particule lors des cycles de précipitation.

4.4 Forces relatives des ligands

Après nous être intéressés au nombre de ligands oléate par QD, nous avons voulu classer et quantifier la capacité d'autres ligands à venir se fixer à la surface des QD de CdSe à la place de l'acide oléique. Pour cela nous avons dans un premier temps habillé les quantum dots par une couche d'acide oléique marqué puis réalisé un second échange avec un ligand froid dans des conditions non-saturantes de façon à conserver une fraction d'acide oléique à la surface du QD pour réaliser un comptage radioactif. La Figure 26 ci-dessous résume le principe.

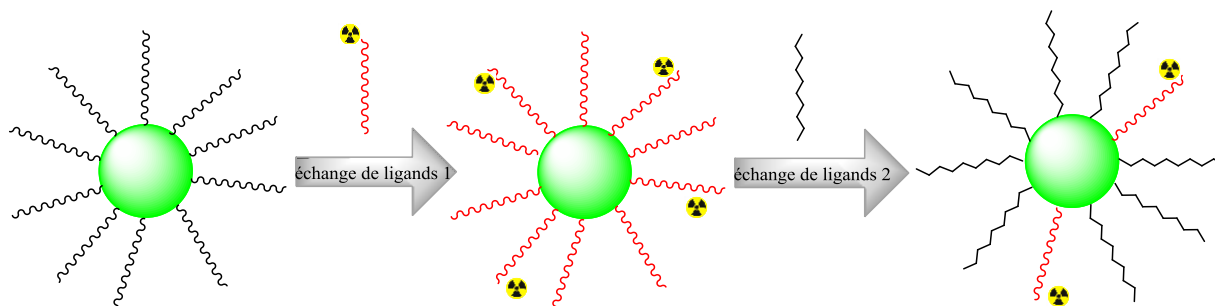


Figure 26. Principe du protocole utilisé pour mesurer la force relative de divers ligands.

À partir d'un même lot de QD recouverts d'acide oléique marqué, nous avons réalisé des expériences en parallèle. La première avec de l'acide oléique non-marqué comme ligand compétiteur (expérience témoin) et les autres avec divers ligands. Dans tous les cas étudiés, la quantité de ligand compétiteur était la même et ne devait permettre qu'un remplacement partiel de l'OA marqué déjà présent. Nous pouvions ainsi comparer l'échange de l'acide oléique par divers types de ligands, parmi les plus utilisés pour la stabilisation des QD, par rapport à l'acide oléique lui-même (Figure 27).

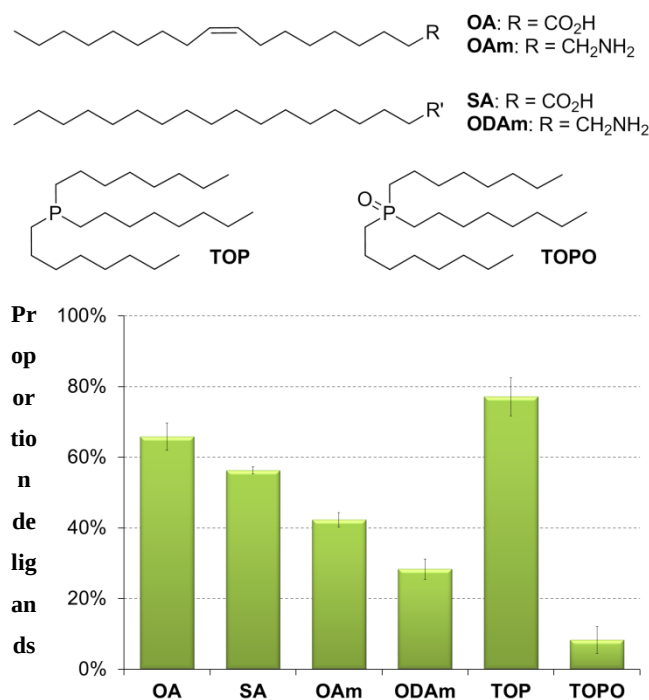


Figure 27. Proportions de ligands OA déplacés par divers type de ligands.

On remarque tout d'abord que l'acide stéarique est quasiment équivalent à l'acide oléique. L'insaturation de la chaîne carbonée ne semble donc pas jouer un rôle majeur. Les amines déplacent environ 20 % d'acide oléique en moins que leurs homologues acides. L'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) ne déplace quasiment pas d'OA, alors que son homologue non oxydé, la trioctylphosphine (TOP) semble déplacer plus d'OA que l'acide oléique lui-même. Or, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2., l'équipe de Hens⁶² a montré que l'échange de ligands passait par un échange de proton. Cependant dans le cas de la TOP ou des amines, il n'y a pas de proton acide échangeable. Il semblerait donc que dans le cas de ces deux fonctions, l'échange de ligands passe par la perte de complexes de cadmium de type $Cd[oléate]_2[amine]_2$ ou $Cd[oléate]_2[TOPSe]_2$ tel que suggéré par Kim *et al.*⁶³

Nous avons ainsi pu quantifier, pour la première fois, la force relative de divers ligands à venir s'échanger à la surface d'un QD de CdSe recouvert d'acide oléique.

4.5 Influence du solvant utilisé pour la purification

La précipitation au méthanol ou à l'éthanol est couramment utilisée pour purifier des QD. C'est pourquoi nous avons utilisé cette technique durant notre étude afin d'obtenir des résultats représentatifs de ce qui se fait communément et, de ce fait, susceptibles d'intéresser un grand nombre de chercheurs du domaine.

Cependant de récentes études (contemporaines de cette thèse) sembleraient indiquer que cette technique de purification communément utilisée pouvait avoir des effets néfastes sur la chimie de surface des nanoparticules. Nous avons procédé à quelques expériences supplémentaires afin d'essayer de comprendre le rôle du solvant sur la composition de la couche organique à la surface des QD. Nous avons donc procédé à un échange de ligands classiques avec de l'oléate tritié mais en changeant la nature du solvant utilisé pour les 2 cycles de précipitation à l'issue de l'échange et avons enfin quantifié l'impact des différents solvants de précipitation sur la densité de ligands à la surface du QD (Figure 28).

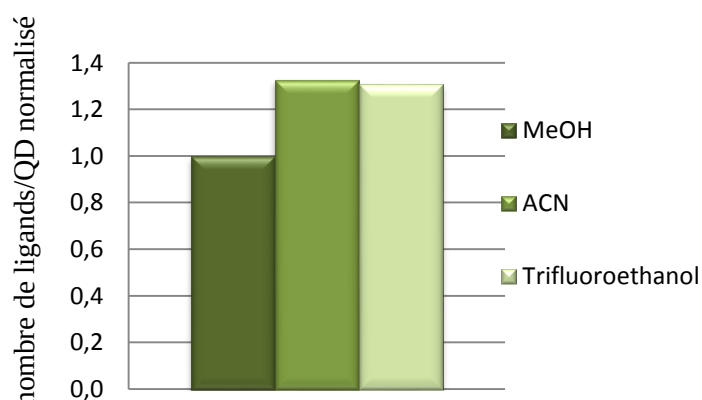


Figure 28. Influence du solvant de précipitation sur le nombre de ligands par QD normée par rapport au méthanol.

Le nombre de ligand par QD a été normalisé en prenant la valeur obtenue pour le méthanol comme référence. On remarque que l'utilisation d'acétonitrile (ACN) qui est un solvant aprotique, donc ne pouvant pas échanger de proton avec les ligands, conduit à une perte de ligands plus faible que dans le cas du méthanol. Nous avons toutefois voulu observer si un solvant protique mais peu nucléophile tel que le trifluoroéthanol (TFE) pouvait désorber des ligands de surface. Or, il semblerait que malgré l'acidité supérieure du proton du TFE, ce dernier soit moins susceptible de déplacer l'acide oléique de surface, probablement à cause de sa faible nucléophilie. Il y aurait donc un effet de synergie, entre la capacité à donner un proton et la nucléophilie du solvant, sur la désorption de ligands lors des cycles de précipitation. Pour des raisons de temps nous n'avons pas pu pousser plus avant notre investigation. Les résultats présentés ici demandent à être confirmés et approfondis.

Nous nous sommes également intéressés à l'impact du solvant sur le premier cycle de précipitation avant échange de ligands. Nous voulions déterminer si la précipitation initiale des QD à l'étape 1 du protocole (cf. Tableau 6) avait une influence sur la densité de ligand finale. Nous avons réalisé les purifications initiales des QD (avant échange de ligands) avec deux solvants différents, réalisé l'étape d'échange de ligands et purifié le QD « échangé » par une étape douce de dialyse. Cela revient à

considérer uniquement l'influence du solvant à l'étape 1 du protocole classique. Nous avons donc précipité les QD (étape 1) dans du méthanol ou de l'acétonitrile, avant de réaliser l'échange de ligand suivi d'une dialyse. Les résultats sont décrits en Figure 29 « Dialyse », avec en parallèle les résultats obtenus précédemment (Figure 29 « Précipitation ») où toutes les étapes de purifications sont réalisées par précipitation (étape 1 et étape 4) avec soit uniquement du méthanol ou uniquement de l'acétonitrile.

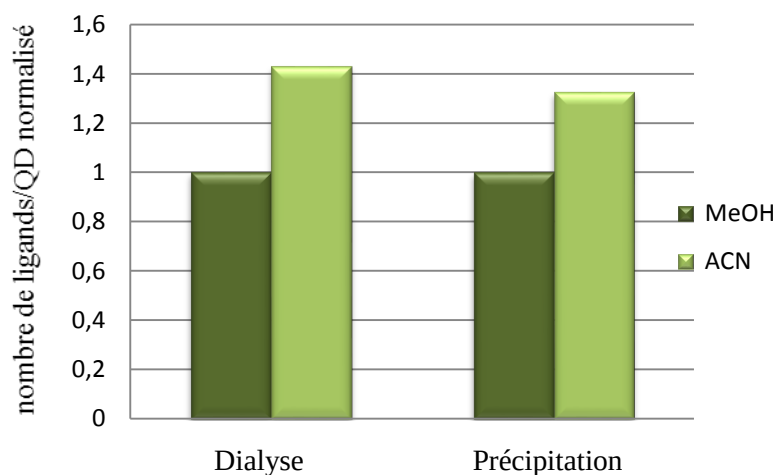


Figure 29. Influence du solvant lors de la précipitation des QD.

Le nombre de ligands/QD a été normalisé par rapport aux résultats obtenus avec le méthanol. On remarque qu'avec l'acétonitrile comme solvant de précipitation (pour l'étape 1) le nombre final de ligands/QD par est supérieur à celui obtenu avec le méthanol. Il semblerait donc que dès la première précipitation au méthanol (étape 1), certains sites à la surface du QD soient rendus inertes et que les ligands comme l'acide oléique ne puissent plus s'y fixer.

5 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons mis au point une méthode efficace pour étudier l'échange de ligands à la surface de nano-objets comme les quantum dots. Nous avons pu comprendre le rôle des ligands non liés et du solvant lors de la précipitation des QD dans les étapes de purification. De plus, une échelle relative de l'affinité des ligands couramment utilisés pour stabiliser la surface des nanoparticules de CdSe a pu être établie.

Notre méthode pourrait être utilisée pour l'étude d'autres nanoparticules comme par exemple les nanoparticules d'or pour lesquelles des ligands portant une fonction thiol chélatante pourraient être marqués au tritium.

Au vu des premiers résultats obtenus concernant l'influence du méthanol sur la surface des nanocristaux de CdSe, des investigations complémentaires doivent être réalisées afin de mieux comprendre les interactions solvant-nanocristal, car la méthode de purification des QD par précipitation au méthanol est la plus couramment utilisée.

III. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés polymérisables.

III. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés polymérisables.

Après nous être attachés à la compréhension de l'interaction entre la surface des nanocristaux et les ligands organiques, nous allons, dans cette partie, nous intéresser à la stabilisation des QD en phase aqueuse avec pour objectif de les utiliser comme outils d'imagerie en biologie. Cette application s'accompagne de diverses contraintes, comme la nécessité d'une stabilité colloïdale élevée. Pour répondre à ces contraintes nous avons cherché à mettre au point un mode d'encapsulation robuste des QD.

Dans ce chapitre nous allons développer une stratégie de stabilisation des QD en milieu aqueux à l'aide de micelles construites par assemblage d'amphiphiles photopolymérisables. Nous développerons dans un premier temps notre stratégie avant de détailler l'obtention des nano-objets ainsi que leur caractérisation. Pour finir nous mènerons une étude de stabilité en solution avant d'utiliser les nanocristaux encapsulés dans une expérience d'imagerie de fluorescence *in vivo* du petit animal.

1 Introduction.

1.1 Pourquoi utiliser un ligand polymérisable ?

Nous avons vu précédemment que les ligands ancrés à la surface des nanocristaux étaient en équilibre dynamique avec leur forme libre. Pour les amphiphiles formant une micelle il en est de même ; il y a un équilibre entre une forme libre et une forme en interaction avec les ligands de surface du nanocristal (Figure 30).

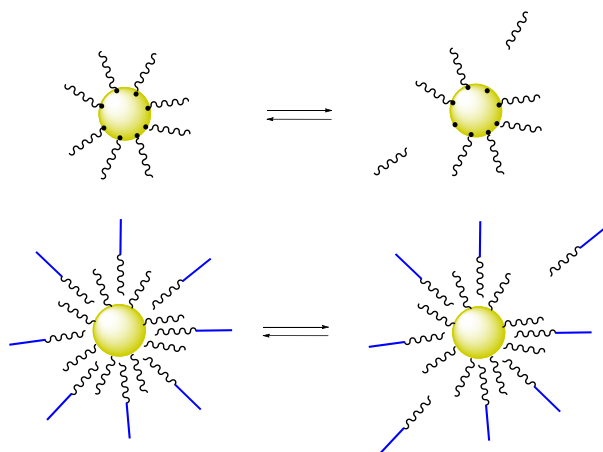


Figure 30. Equilibre entre molécules libres en solution et en interaction avec la surface.

L'inconvénient associé à la désorption des ligands est une diminution de la stabilité colloïdale des particules, donnant lieu à des phénomènes d'aggrégation et de précipitation. Ce problème peut être partiellement contourné en multipliant, pour une unité de ligand donné, le nombre de points d'ancrage à la surface du nanocristal. Ce concept a déjà fait ses preuves.^{79,80,81} Dans la plupart des travaux concernés, l'utilisation de polythiols, voire de polymères avec de multiples points d'ancrage de type thiol, permet d'augmenter la stabilité colloïdale des QD, notamment dans des conditions de pH et de salinité extrêmes. L'utilisation d'ancrages multiples permet de déplacer artificiellement l'équilibre décrit en Figure 30 vers la forme où les ligands interagissent avec la surface. En effet, l'équilibre entre la forme adsorbée et la forme libre du ligand existe également dans le cas des ancrages multiples. Cependant, lorsqu'un des ancrages se retrouve sous sa forme désorbée, les ancrages voisins (en interaction avec la surface du nanocristal) permettent de le maintenir à proximité du QD, facilitant ainsi sa ré-adsorption (Figure 31). Le principe est le même avec les amphiphiles si ce n'est que l'on ne parlera pas d'ancrage mais d'interaction avec la couche organique du QD.

⁷⁹ Yildiz, I.; Deniz, E.; McCaughan, B.; Cruickshank, S. F.; Callan, J. F.; Raymo, F. M. *Langmuir***2010**, 26, 11503.

⁸⁰ Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.***2010**, 132, 9804.

⁸¹ Giovanelli, E.; Muro, E.; Sitbon, G.; Hanafi, M.; Pons, T.; Dubertret, B.; Lequeux, N. *Langmuir***2012**, 28, 15177.

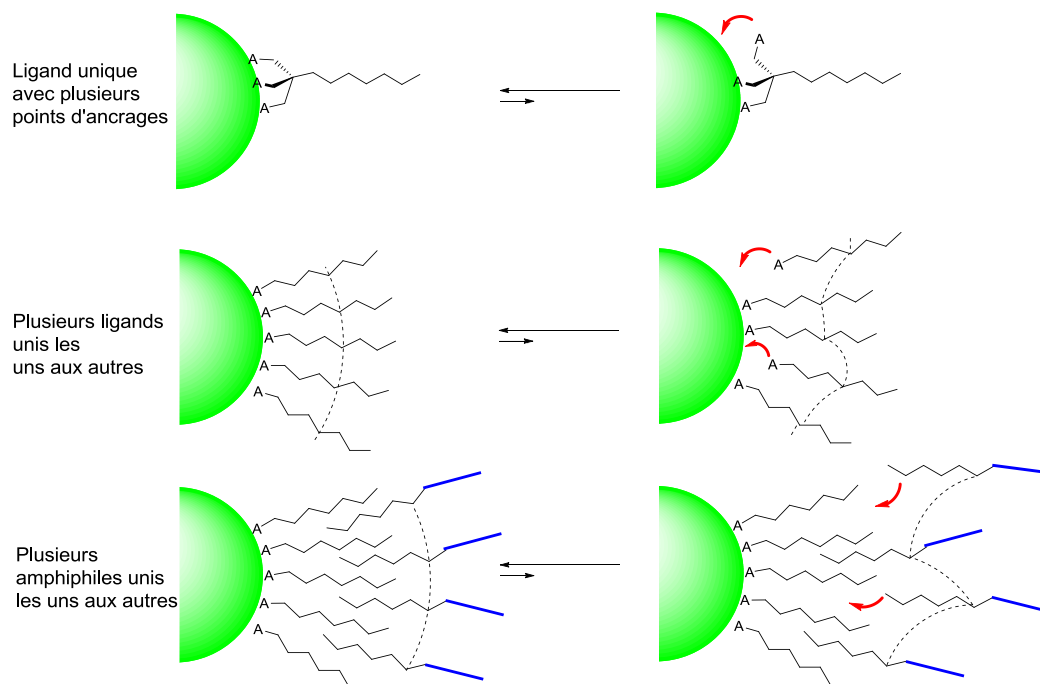


Figure 31. Effet des ancrages multiples sur les équilibres de surface de la couche organique.

De nombreuses études ont ainsi été menées sur l'encapsulation de nanoparticules (QD, or, ...) utilisant des structures polymères. Les ancrages multiples améliorent, en général, la stabilité colloïdale et diminuent les risques d'insertion de molécules endogènes dans le cas des applications *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons envisagé, durant ces travaux de thèse, de développer des ligands originaux ayant une fonction polymérisable qui puisse souder la couche organique et la stabiliser autour de la particule.

1.2 État de l'art.

De nombreuses équipes se sont intéressées à l'utilisation de polymères afin de stabiliser des nanoparticules. Nous allons faire un état des lieux concernant les stratégies d'encapsulation employées pour les QD.

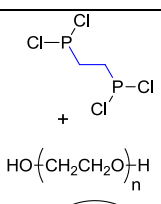
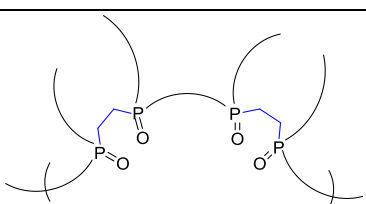
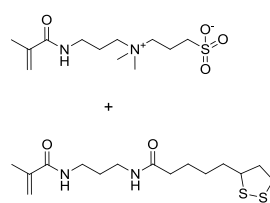
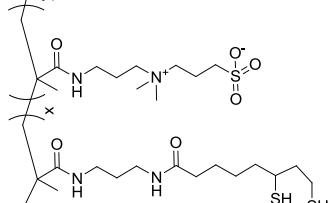
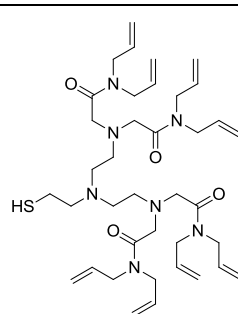
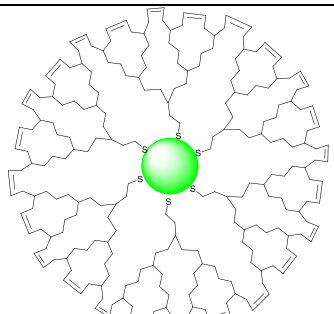
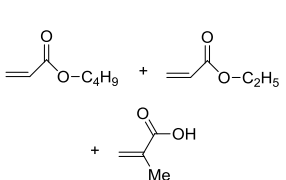
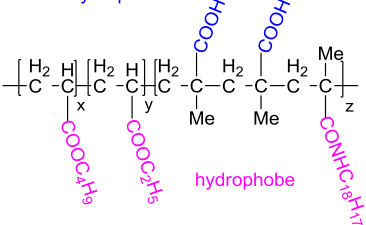
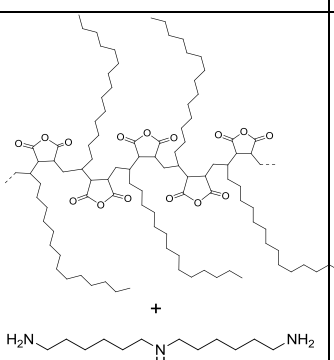
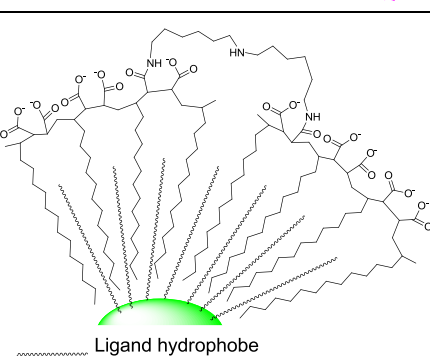
1.2.1 Classement des polymères utilisés pour encapsuler les QD.

Il existe plusieurs types de polymères qui ont été utilisés pour encapsuler des nanoparticules. Selon les cas, la polymérisation est réalisée avant ou après avoir procédé à l'échange des ligands de surface. De plus les polymères utilisés peuvent soit s'adsorber à la surface de la particule en une couche primaire soit former une couche secondaire, de type micelle, qui encapsule la couche primaire

hydrophobe à la surface de la particule. Les techniques les plus utilisées sont présentées dans le Tableau 9. Nous avons volontairement choisi de ne pas présenter l'encapsulation dans une coque de silice,⁸² car cette technique est à cheval entre une coque inorganique et un polymère organique.

⁸²Nann, T.; Mulvaney, P. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5393.

Tableau 9. Classement des divers polymères utilisés pour stabiliser des nanoparticules.

Référence	monomère	polymère	Formation du polymère	Couche polymérisée
Bawendi ⁸³			Avant échange de ligands	Couche primaire en contact avec le nanocristal
Dubertret ⁸¹				
Peng ⁸⁴			Après échange de ligands (métathèse)	
Gao ⁸⁵			Avant insertion de ligands	Couche secondaire de ligands s'insérant dans une couche primaire
Parak ⁸⁶			Après insertion de ligands (liaison amide)	

⁸³ Kim, S.-W.; Kim, S.; Tracy, J. B.; Jasanoff, A.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4556.

⁸⁴ Guo, W.; Li, J. J.; Wang, Y. A.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3901.

⁸⁵ Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 969.

⁸⁶ Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano. Lett.* **2004**, 4, 703.

En analysant de plus près les différentes stratégies développées dans la littérature pour encapsuler des QD à l'aide de polymères, il est possible de dégager quatre approches distinctes. Cette classification dépend essentiellement du monomère utilisé car c'est lui qui conditionnera l'ordre de la séquence échange de ligands/polymérisation (Figure 32). En effet, il est possible de réaliser la polymérisation avant ou après interaction des monomères avec la nanoparticule, c'est-à-dire préformer le polymère avant de l'utiliser ou alors le former directement autour du QD. Cela dépend bien entendu du mode de polymérisation et plus particulièrement de son impact sur la structure ou la fluorescence du QD.

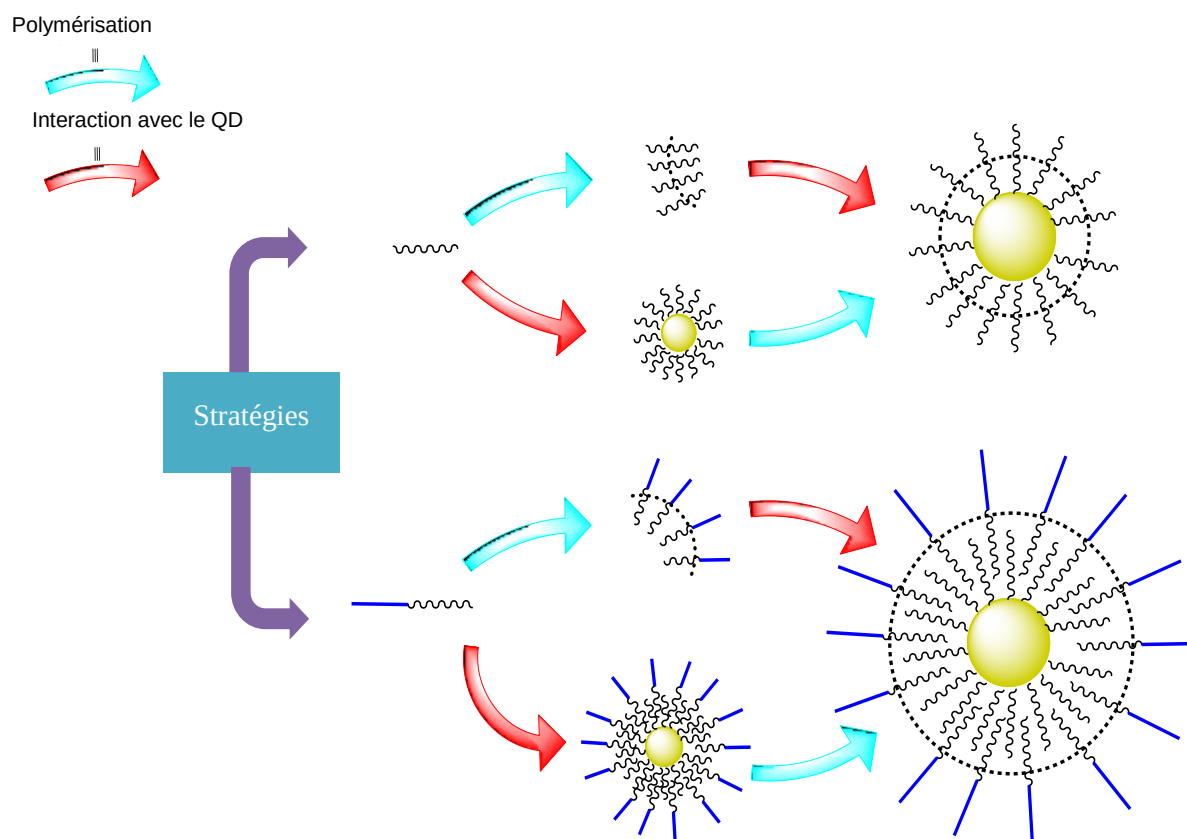


Figure 32. Voies possibles conduisant à des QD encapsulés avec des polymères.

1.2.2 Stratégies précédemment développées au laboratoire.

Au laboratoire, deux approches avaient été mises au point avant mon arrivée. Les deux méthodes consistent en l'utilisation d'un amphiphile de type phospholipide qui pourra, suite à la formation d'une micelle autour du QD, être polymérisé. Dans un premier cas, la polymérisation a été réalisée par une métathèse par ouverture de cycle utilisant un catalyseur de Grubbs II,⁸⁷ alors que dans

⁸⁷Travert-Branger, N.; Dubois, F.; Carion, O.; Carrot, G.; Mahler, B.; Dubertret, B.; Doris, E.; Mioskowski, C. *Langmuir*, **2008**, 24, 3016.

l'autre cas un flux d'électron a été utilisé pour réaliser la polymérisation.⁸⁸ Les deux adduits synthétisés sont décrit en Figure 33.

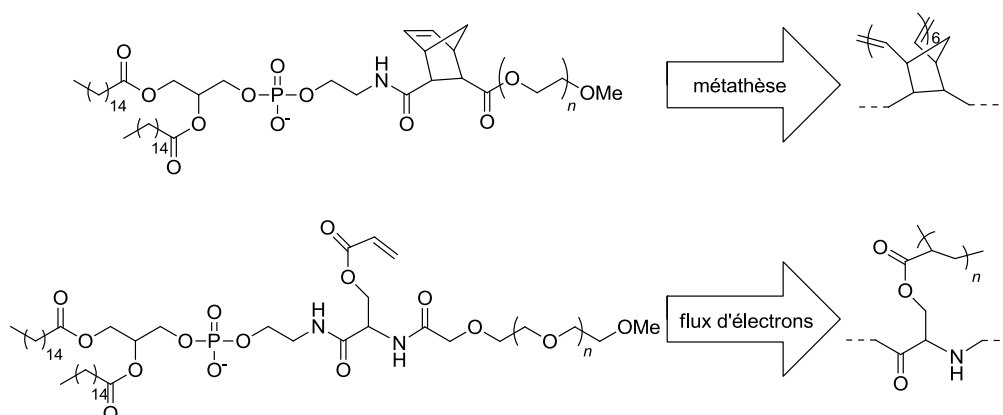


Figure 33. Stratégies de polymérisation développées au laboratoire.

Ces deux polymères ont permis d'augmenter la stabilité colloïdale des QD en milieu salin et à divers pH. Cependant, la méthode utilisant le bombardement d'électrons présente deux avantages majeurs, le premier est l'absence d'un initiateur de radicaux chimique qui pourrait altérer la chimie de surface du QD et le second est qu'aucune purification n'est nécessaire après polymérisation. Ainsi, on peut procéder à l'encapsulation des QD avec l'amphiphile polymérisable et réaliser la polymérisation *in situ* en présence des nanoparticules.

1.2.3 Les polydiacétyléniques (PDA), polymères de choix ?

1.2.3.1 Formation du polymère.

Pour bénéficier des avantages d'une polymérisation propre ne nécessitant aucun initiateur chimique, le choix d'utiliser des groupements photopolymérisables de type diacétylénique semble également intéressant. La polymérisation de ces motifs, initiée par irradiation UV à 254 nm, donne un enchaînement ène-yne, comme le montre la Figure 34, et le polymère résultant est appelé polydiacétylénique (PDA).

⁸⁸Travert-Branger, N.; Dubois, F.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Mahler, B.; Gravel, E.; Dubertret, B.; Doris, E. *Langmuir* **2011**, 27, 4358.

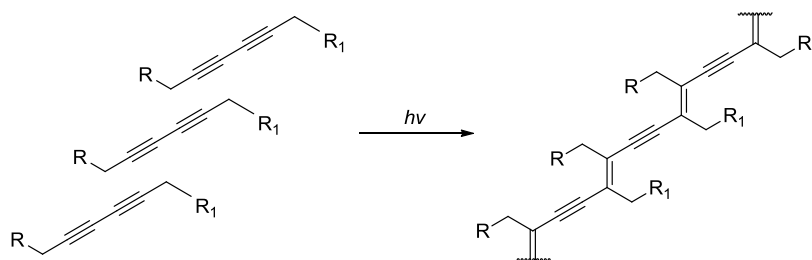


Figure 34. Photopolymérisation de la fonction 1,3-diyne.

Ces composés furent découverts en 1969 par Wegner⁸⁹ qui proposa un mécanisme de polymérisation⁹⁰ dans lequel le monomère excité par irradiation se réarrange pour former un motif dicarbène (Figure 35).

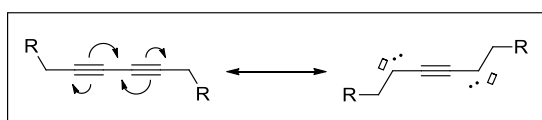


Figure 35. Excitation du monomère en dicarbène.

Ce dicarbène va pouvoir réagir avec un dicarbène voisin en formant un dimère lié par une double liaison.⁹¹ Le dimère pourra à nouveau réagir avec un troisième dicarbène en formant un trimère, et ainsi de suite, menant petit à petit à la formation d'un polymère, comme décrit dans la Figure 36.

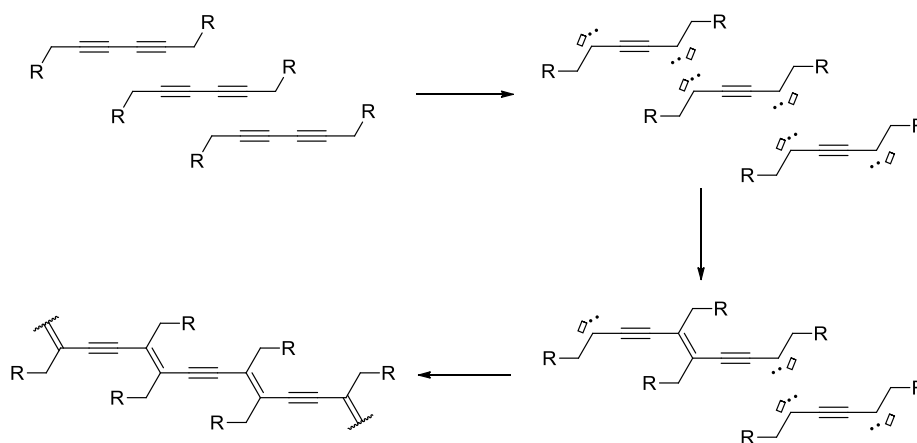


Figure 36. Principe de polymérisation carbénique.

⁸⁹Wegner, G. *Z. Naturforsch.* **1969**, 24b, 824.

⁹⁰Wegner, G. *Pure & Appl. Chem.* **1977**, 49, 443.

⁹¹Kollmar, C. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 2710.

Le second mécanisme qui est proposé dans la littérature implique la formation de diradicaux.^{91,92} Ce mécanisme semble plus probable et implique trois étapes lors de la formation du polymère :

- (1) excitation lumineuse par irradiation UV qui va former une espèce di-radicalaire.
- (2) rapprochement entre une espèce diacétylénique avec un di-radical par excitation vibrationnelle afin de permettre la formation d'un nouveau di-radical.
- (3) propagation de la chaîne de polymère.

La succession de ces étapes permet la formation du polymère comme le décrit la Figure 37.

Figure

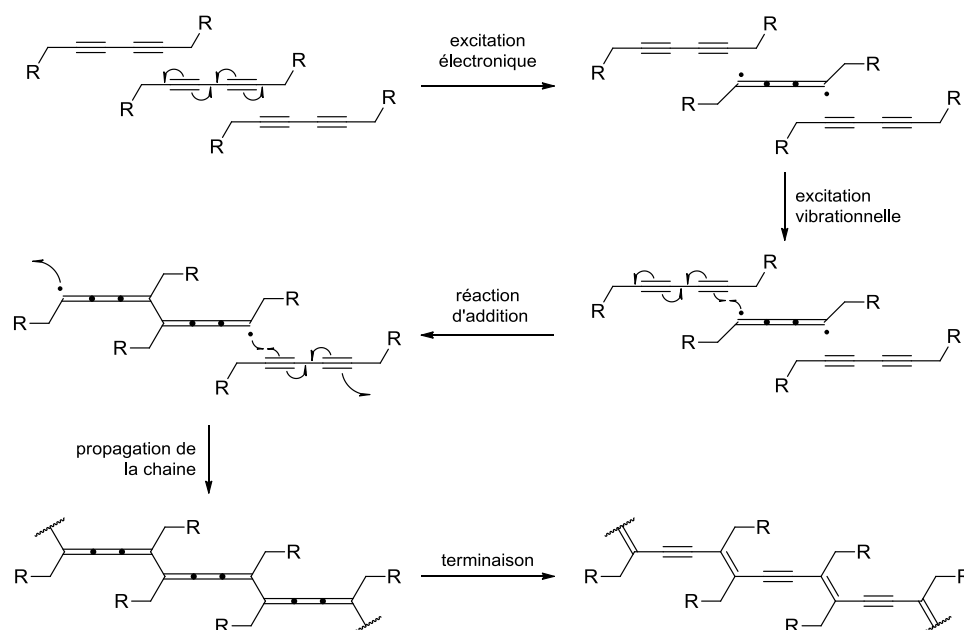


Figure 37. Mécanisme de polymérisation radicalaire.

Les deux mécanismes nécessitent la formation d'une espèce intermédiaire réactive qui sera à l'origine de la polymérisation. Le mécanisme le plus admis pour la polymérisation de motifs diacétyléniques est celui passant par un di-radical.

1.2.3.2 Propriétés des PDA.

Les polymères de type PDA présentent la particularité de pouvoir changer de couleur, en réponse à un stimulus extérieur, en passant du bleu ($\lambda_{\text{max}} = 640\text{nm}$) au rouge ($\lambda_{\text{max}} = 550\text{nm}$). De plus, le passage du PDA sous sa forme rouge s'accompagne d'une apparition de fluorescence⁹³ (Figure 38).

⁹² Itoh, C.; Kondoh, T.; Tanimura, K. *J. Phys. Soc. Jpn.* **1999**, 68, 1711.

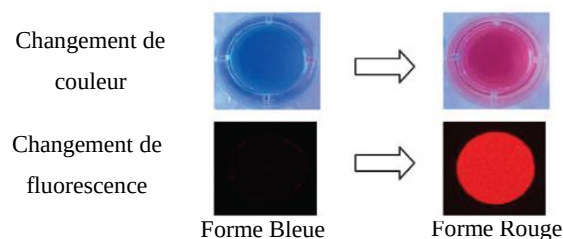


Figure 38. Modification des propriétés optiques du PDA en fonction de la forme adoptée.

Ce changement d'état peut être provoqué par la chaleur (thermochromisme),⁹⁴ par le solvant (solvatochromisme),⁹⁵ par une contrainte mécanique,⁹⁶ ou par interaction ligand-récepteur.⁹⁷

Cette particularité des PDA en a fait des candidats de choix pour l'élaboration de divers capteurs capables de repérer un changement de température,⁹⁸ de détecter sélectivement de l'ATP à des concentrations de l'ordre du millimolaire,⁹⁹ ou encore dans la détection de prolifération bactérienne.¹⁰⁰

Les applications sont diverses et variées mais ce qui va nous intéresser plus particulièrement est le comportement des amphiphiles de type diacétyléniques en phase aqueuse. En effet, les amphiphiles diacétyléniques peuvent former spontanément des assemblages dans l'eau. Dans le cas de l'acide 10-12-pentacosadiynoïque il s'agira de liposomes¹⁰¹ (Figure 39), mais en augmentant la taille de la tête polaire, par exemple avec un groupement polyéthylène glycol, on diminue le paramètre d'empilement critique (« critical packing parameter » : CPP) et ainsi on formera plutôt des micelles. Pour plus de détails sur la notion de CPP, le lecteur pourra se référer à l'Annexe 2.

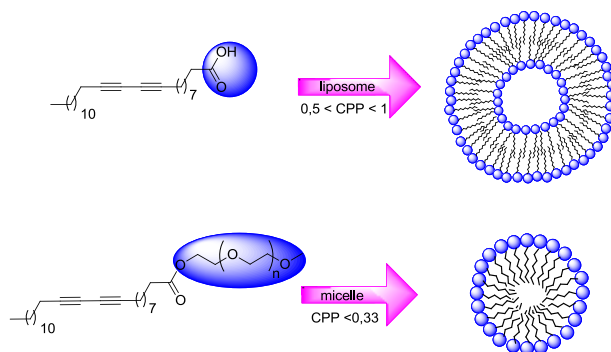


Figure 39. Formation de liposome ou de micelle en fonction de la tête polaire de l'acide 10-12-pentacosadiynoïque.

⁹³Baughman, R. H.; Chance, R. R.; *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.***1976**, 14, 2037.

⁹⁴Chance, R. R.; Baughman, R. H.; Müller, H.; Eckhardt, C. J. *J. Chem. Phys.***1977**, 67, 3616.

⁹⁵Nava, A. D.; Thakur, M.; Tonelli, A. E. *Macromolecules***1990**,23, 3055.

⁹⁶Tomioka, Y.; Tanaka, N.; Imazeki, S. *Thin Solid Films***1989**, 179, 27.

⁹⁷Charych, D. H.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Bednarski, M. D. *Science***1993**, 261, 585.

⁹⁸Ryu, S.; Yoo, I.; Song, S.; Yoon, B.; Kim, J.-M.*J. Am. Chem. Soc.***2009**, 131, 3800.

⁹⁹Jose, D. A.; Stadlbauer, S.; König, B. *Chem. Eur. J.***2009**, 15, 7404.

¹⁰⁰Demikhovskiy, Y.; Kolusheva, S.; Geyzer, M.; Jelinek, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 364, 428.

¹⁰¹Yoon, B.; Lee, S.; Kim, J.-M.*Chem. Soc. Rev.***2009**, 38, 1958.

1.2.3.3 Utilisation des PDA pour encapsuler des nanoparticules.

À notre connaissance, seules des nanoparticules d'or ont été encapsulées dans un polymère de type PDA afin de les solubiliser en milieu aqueux.¹⁰² Les auteurs ont réalisé la synthèse d'un monomère présentant en son centre un motif diacétylénique nécessaire à la polymérisation et à ses extrémités une fonction d'ancrage permettant la fixation à la surface de la nanoparticule d'or ainsi qu'une tête hydrophile procurant la solubilité en milieu aqueux. La structure du monomère est donnée ci-dessous (Figure 40):

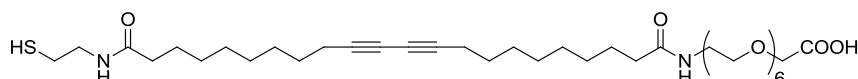


Figure 40. Structure du monomère utilisé pour l'encapsulation de nanoparticules d'or.¹⁰²

Dans un second temps, ce monomère a été utilisé pour encapsuler les nanoparticules d'or, préparées selon la méthode de Turkevich¹⁰³ (réduction et stabilisation par des citrates), avant d'être polymérisé à leur surface. Le processus de photopolymérisation des composés diacétyléniques nécessite une organisation spatiale précise entre les différentes unités. D'après la littérature, la distance séparant deux motifs diynes voisins ne doit pas excéder 5 Å.¹⁰² Dans le cas des nanoparticules d'or, en prenant en compte le rayon d'un atome d'or (1.441 Å) et le paramètre d'une maille cubique à faces centrées, l'équipe de Kanaras¹⁰² a conclu que la distance entre deux motifs diacétyléniques était propice à la polymérisation. Toutefois, il est essentiel d'avoir une couche de ligand de surface très compacte, dans le cas décrit ici, les auteurs ont utilisé des ligands ayant une longue chaîne carbonée, qui selon eux, participe à cette structuration compacte.

Une fois la couche de PDA formée autour de la nanoparticule d'or, des tests de stabilité colloïdale ont été réalisés, notamment par variation de pH et de salinité ou introduction de ligands compétiteurs. Les résultats obtenus montrent une stabilité accrue lorsque les nanoparticules sont entourées du polymère (PDA). Une nuance doit toutefois être apportée pour les particules de petites tailles (3,3 nm), dont la stabilisation avec le polymère est moins marquée. D'après les auteurs, cette moindre stabilisation serait due à une polymérisation partielle des monomères en raison de la courbure plus importante de la surface des petites particules¹⁰² entraînant un éloignement des motifs diacétyléniques de deux ligands voisins (Figure 41).

¹⁰²Bartczak, D.; Kanaras, A. G. *Langmuir* **2010**, 26, 7072.

¹⁰³Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55.

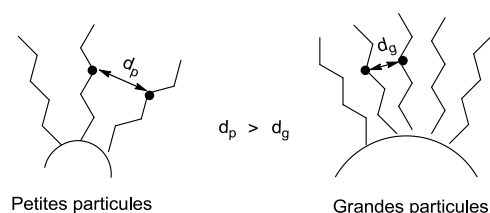


Figure 41. Effet de la courbure de surface des nanoparticules sur la distance entre ligands.

Il est donc nécessaire de tenir compte de la courbure de la surface de la nanoparticule ainsi que de la densité de ligands de surface si l'on veut polymériser les ligands ayant un motif diacétylénique directement à la surface du QD.

2 Stratégies mises en œuvre.

2.1 Les stratégies de polymérisation envisagées.

Comme nous l'avons présenté plus haut, il existe deux voies de modification de la couche organique à la surface des QD : l'échange direct de ligands et l'encapsulation par des amphiphiles. Par ailleurs, dans le cas des ligands polymérisables il est possible de réaliser la polymérisation avant ou après que les monomères soient en interaction avec la nanoparticule. Cela dépend, bien entendu, du mode de polymérisation qui peut ou non altérer la structure et/ou la fluorescence du QD. Dans le cas des ligands de type diacétylénique, la polymérisation ne nécessite aucun initiateur chimique, ce qui implique qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une purification après polymérisation. Nous devons donc, en théorie, pouvoir procéder à une polymérisation post échange en présence du QD, comme il a été fait pour les nanoparticules d'or. Il nous fallait toutefois vérifier que la polymérisation et donc l'exposition prolongée à des rayonnements UV, n'altère pas la fluorescence des nanocristaux.

En analysant les quatre voies possibles pour encapsuler un QD à l'aide d'un polymère, résumées en Figure 32, trois d'entre elles semblaient envisageables. L'option de polymériser les ligands avant de réaliser l'échange de la couche primaire était exclue pour le PDA. En effet, cette technique est adaptée lorsque l'on contrôle aisément la polymérisation et que l'on peut contrôler le nombre de monomères assemblés, or dans le cas des diacétyléniques, la polymérisation étant vraisemblablement de type radicalaire, il sera difficile de contrôler la taille du polymère. De plus, les amphiphiles de type diacétyléniques ont tendance à s'auto-assembler pour former des liposomes, des micelles, des bicouches en forme de rubans ou de nanotubes¹⁰⁴ suivant la tête hydrophile. Or ces auto assemblages,

¹⁰⁴Manuscrit de thèse d'Aurélia Perino, Docteur en Science de l'université de Strasbourg, 2010.

une fois figés par polymérisation, n'auront pas forcément la forme (courbure,...) requise pour s'adapter à la surface du nanocristal.

Il restait donc les trois autres voies possibles, à savoir : *i.* échange des ligands de la couche primaire puis polymérisation, *ii.* encapsulation micellaire puis polymérisation et *iii.* polymérisation d'amphiphiles puis encapsulation micellaire.

2.2 Les stratégies retenues.

2.2.1 Séquences de polymérisation et structures des ligands retenus.

En tenant compte des contraintes liées à l'utilisation d'un polymère de type PDA (cf. paragraphe précédent), deux architectures de ligands étaient envisageables pour l'encapsulation de QD à l'aide d'un polymère de type PDA. Soit un ligand possédant un motif diacétylénique (Figure 42A) que l'on pouvait polymériser une fois les ligands ancrés à la surface (polymérisation de la couche primaire), soit un amphiphile polymérisable (Figure 42B) capable de venir former une micelle autour des ligands hydrophobes de la couche primaire (polymérisation de la couche organique secondaire).

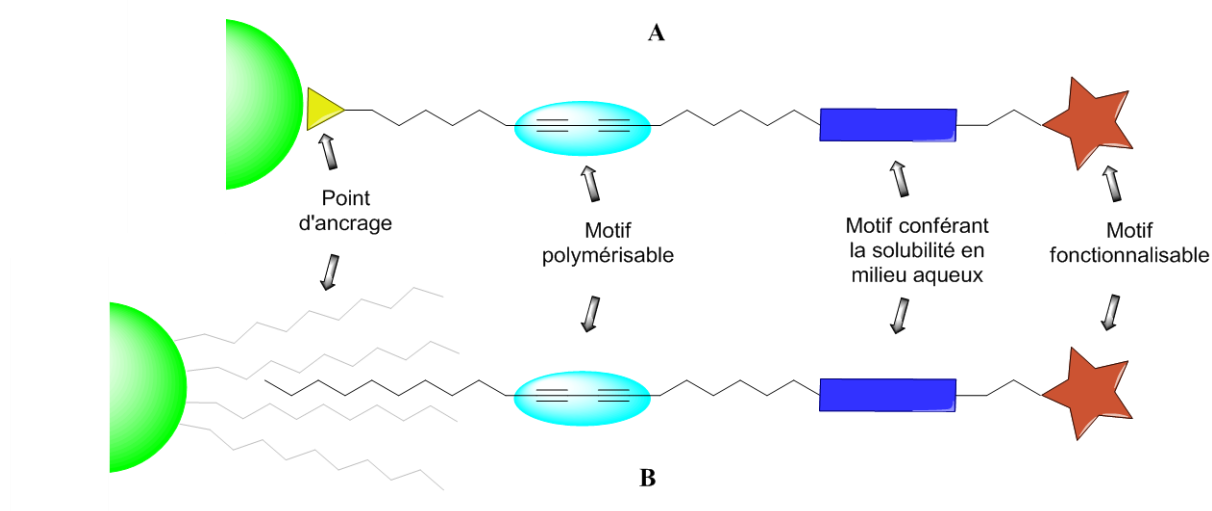


Figure 42. Structures générales envisagées pour les ligands polymérisables.

L'architecture de ces composés est formée de quatre régions distinctes ayant chacune un rôle bien défini :

- Un point d'ancrage :

assurant la liaison avec la nanoparticule. Il s'agit soit d'une chaîne hydrophobe pour les amphiphiles (Figure 42B), permettant par interaction de type Van der Waals de les maintenir

en interaction avec la surface organique du nanocrystal, soit des fonctions chélatantes dans le cas des ligands de la couche primaire (Figure 42A).

- Un motif polymérisable :

dans notre étude il s'agira d'un motif diacétylénique qui est photopolymérisable.

- Un motif pour la solubilité aqueuse:

nous avons choisi d'utiliser des polyéthylène glycols car ils confèrent une bonne hydro-solubilité et sont « furtifs » *in vivo*.

- Un motif fonctionnalisable :

il s'agit d'un point d'accroche potentiel d'un élément permettant un ciblage du nanocrystal. La fonction servant de point d'accroche pourra par exemple être une fonction azoture ou maléimide.

2.2.2 Stratégies de synthèse des ligands.

Il nous a tout d'abord fallu vérifier que la polymérisation des motifs diacétyléniques en présence des QD était possible notamment en ce qui concerne l'altération potentielle des propriétés de fluorescence de ces derniers. Afin d'avoir une architecture plus simple et un accès plus rapide aux composés, nous avons synthétisé des ligands présentant la structure générale illustrée en Figure 42, mais qui n'incorporent pas le motif fonctionnalisable terminal. Les ligands retenus (**L-1** à **L-3**, Figure 43) sont des dérivés de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque. La fonction thiol (**L-2**) a été choisie car elle est connue pour avoir une forte affinité pour la surface des particules. Quant à la fonction amine (**L-3**), elle devait permettre la formation d'un groupement dithiocarbamate qui avait déjà été étudié au laboratoire¹⁰⁵ et qui présente une forte affinité pour la couche extérieure de ZnS des QD de type cœur-coque que nous prévoyons d'utiliser. Enfin, l'amphiphile **L-1** sera utilisé pour la formation de micelles.

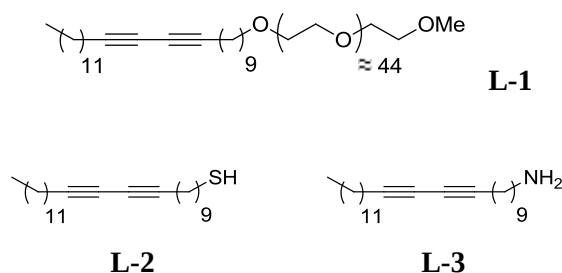


Figure 43. Structure des ligands L-1 à L-3.

¹⁰⁵Dubois, F.; Mahler, B.; Dubertret, B.; Doris, E.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 482.

3 Formation et caractérisation des nano-objets.

3.1 Préparation des ligands.

3.1.1 Synthèse du ligand L-1.

Le ligand **L-1** a été préparé à partir d'acide 10,12-pentacosadiynoïque (Figure 44). La fonction acide est réduite à l'aide de LiAlH_4 dans l'éther anhydre conduisant à l'alcool avec un bon rendement. Ce dernier est traité avec le réactif d'Appel ($\text{PPh}_3/\text{CBr}_4$) afin de convertir la fonction alcool en dérivé bromé de manière quantitative. La dernière étape consiste à coupler le dérivé bromé avec un éther de polyéthylène glycol (PEG_{2000} monométhyléther) dont l'alcool aura préalablement été déprotoné avec NaH . Le rendement de cette dernière étape est moyen, probablement du fait de l'encombrement stérique du motif PEG_{2000} . Il est à noter que la purification des diynes pégylés n'est pas aisée, car ils co-migrent souvent sur silice avec les éthers de départ.

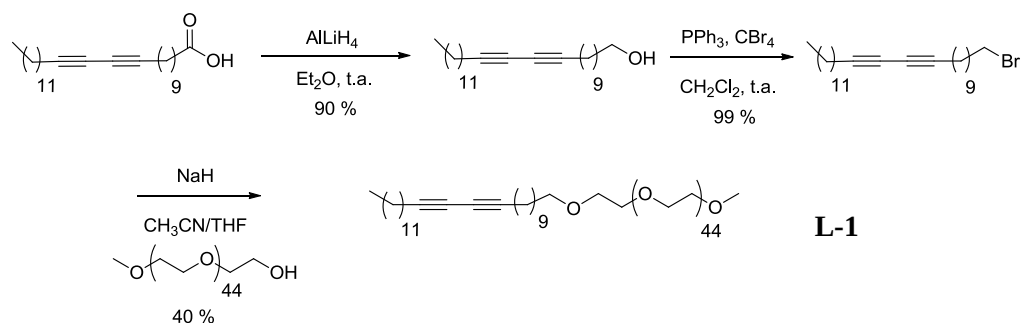


Figure 44. Synthèse du ligand L-1.

3.1.2 Synthèse des ligands L-2 à L-3.

Les ligands **L-2** et **L-3** ont été synthétisés au départ du dérivé bromé obtenu dans la synthèse de **L-1** (Figure 45). Dans le cas de **L-2** on réalise une substitution nucléophile du brome à l'aide de thioacétate de potassium. Il est nécessaire d'utiliser ici un mélange de solvant DMF/ CH_2Cl_2 car le composé bromé est peu soluble dans le DMF et le thioacétate de potassium peu soluble dans le dichlorométhane. Cette étape permet d'introduire le thiol sous une forme masquée. Nous avons choisi de stocker le composé sous sa forme protégée (thioacétate) de façon à éviter l'oxydation du thiol et la formation de ponts disulfures. La libération du thiol est réalisée « à la demande » par réduction avec LiAlH_4 .

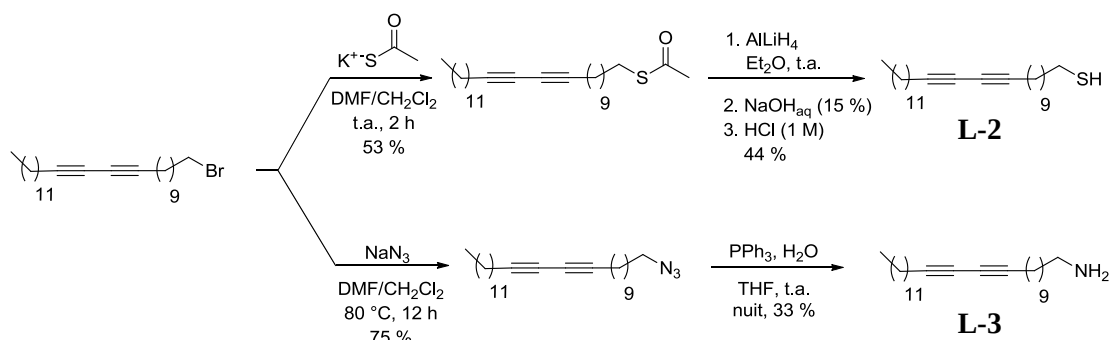


Figure 45. Synthèse des ligands L-2 et L-3

Le composé **L-3** a été synthétisé par une substitution nucléophile sur le même dérivé bromé que pour **L-1** et **L-2** en utilisant de l'azoture de sodium en excès. Le rendement est moins bon que celui observé classiquement pour ce genre de substitution probablement pour des raisons de solubilité des réactifs dans le milieu réactionnel. La dernière étape est une réaction de Staudinger permettant la réduction de l'azoture en amine.

3.2 Polymérisation du motif diacétylénique en présence du QD.

3.2.1 Polymérisation en milieu organique.

Des expériences ont été réalisées pour déterminer si une polymérisation de la couche de ligands photopolymérisables directement à la surface du QD était envisageable. Pour cela nous avons réalisé un échange de ligands sur des nanoparticules de type cœur-coque et composées de $\text{CdSe}/\text{CdS}/\text{ZnS}$. Les ligands natifs issus de la synthèse ont été remplacés par les ligands diacétylénique-thiol (**L-2**). L'échange a été réalisé de manière classique en utilisant un excès de ligands **L-2** et en laissant l'échange se réaliser durant une nuit dans le chloroforme.

Une fois l'échange terminé, les nanoparticules ont été purifiées par précipitation au méthanol afin d'enlever l'excès de thiol non lié à la nanoparticule. Nous avons ensuite resuspendu les QD dans de l'hexane avant de réaliser une photopolymérisation sous irradiation UV à 254 nm. L'absorbance ainsi que la fluorescence de la solution ont été mesurées à différents temps d'irradiation (Figure 46).

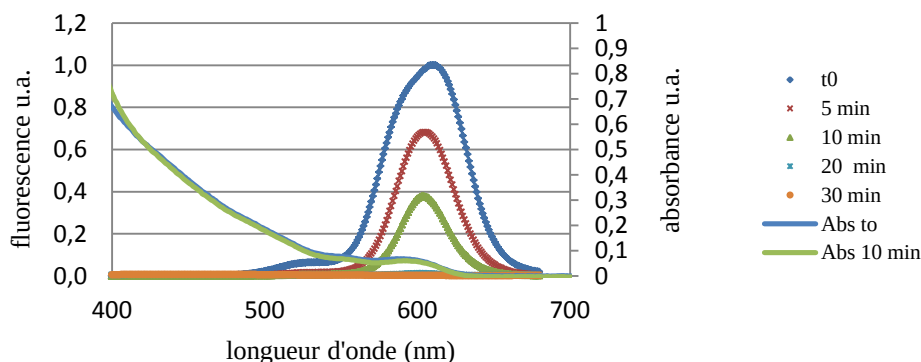


Figure 46. Évolution de l'intensité de fluorescence et de l'absorbance des QD en fonction du temps d'irradiation dans l'hexane.

On remarque qu'après 10 min d'irradiation UV on perd 63 % d'intensité de fluorescence à la longueur d'onde du maximum d'émission. Or, le spectre d'absorbance de la solution n'a quasiment pas été modifié (Figure 46). Cela indique que la concentration des QD est la même et que la perte de fluorescence est bien due à une perte de rendement quantique.

De plus, on remarque qu'entre 10 et 20 min d'irradiation UV il y a une disparition quasi-totale de l'émission de fluorescence. Nous avons pu observer qu'entre ces deux temps d'irradiation, la solution s'était troublée et un précipité fluorescent (vraisemblablement de QD) était apparu au fond du récipient. Il semblerait donc qu'il y ait eu perte de la stabilité colloïdale du nanocrystal. Cette précipitation pourrait être due à un décrochage des ligands thiols suite à un phénomène de photo-oxydation et formation de ponts disulfures ou provenir d'un problème de solubilité intrinsèque de la forme polymérisée des ligands dans l'hexane.

Nous avons donc refait l'expérience de polymérisation dans un autre solvant, en l'occurrence du toluène (Figure 47).

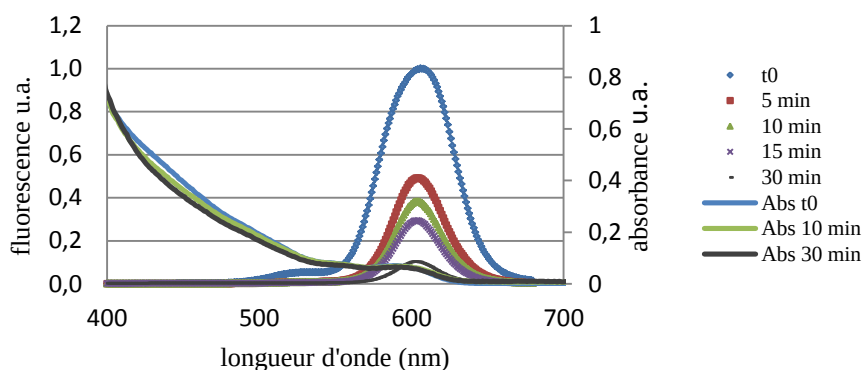


Figure 47. Évolution de l'intensité de fluorescence et de l'absorbance des QD en fonction du temps d'irradiation dans le toluène.

Malgré l'utilisation d'un autre solvant, la perte d'intensité de fluorescence à la longueur d'onde du maximum d'émission au bout de 10 min d'irradiation UV à 254 nm est de 62 %. Cette perte est identique à l'expérience précédente dans l'hexane. Après 30 min d'irradiation on perd quasiment un facteur 10 au niveau de l'intensité de fluorescence, alors que l'absorbance de la solution n'évolue quasiment pas (Figure 47), indiquant une concentration en QD constante (il n'y a pas de précipitation contrairement au phénomène observé dans l'hexane). Ainsi, l'irradiation en présence des ligands photopolymérisables en milieu organique semble avoir un effet néfaste sur la fluorescence des QD. La présence de radicaux libres durant la polymérisation pourrait être la cause de cette perte de fluorescence par réaction avec la surface de la nanoparticule modifiant ainsi sa composition et entraînant par la même occasion des phénomènes non radiatifs de recombinaison de l'exciton.

3.2.2 Polymérisation en milieu aqueux

Toutefois, avant d'écarter la possibilité d'une polymérisation en présence du QD, nous avons réalisé deux expériences supplémentaires, non pas dans un solvant organique mais dans l'eau.

- (i) Dans un cas, le lot de QD recouvert d'un thiol photopolymérisable, et utilisé pour les deux expériences précédentes, a été transféré en phase aqueuse à l'aide de l'amphiphile **L-1**. Ainsi nous avons une bicouche polymérisable (Figure 48), c'est-à-dire la possibilité de lier la couche primaire et la couche secondaire par réticulation croisée.

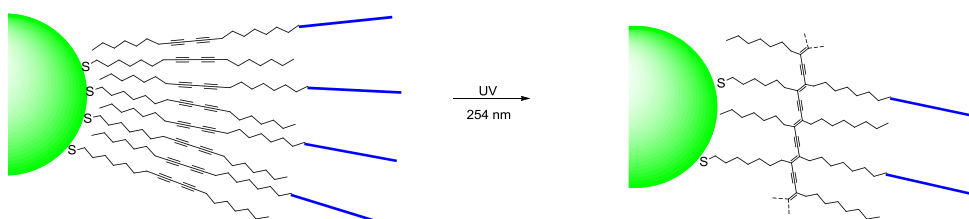


Figure 48. Polymérisation de la bicouche diacétylénique.

- (ii) Dans le second cas, la couche primaire du QD est constituée d'octadécane-thiol non polymérisable et d'une couche secondaire micellaire formée par le ligand **L-1**. Cette approche implique seulement la polymérisation de la micelle périphérique (Figure 49) :

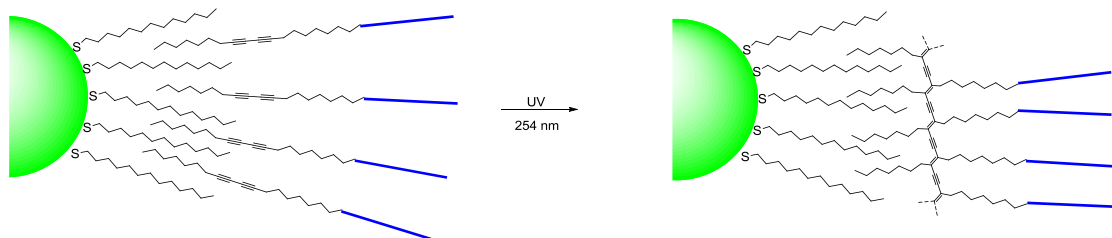


Figure 49. Polymérisation de la monocouche diacétylénique.

Dans le premier cas (i), nous avons réalisé la même expérience d'irradiation que précédemment sur des temps plus courts (Figure 50). La perte de fluorescence après 9 min d'irradiation UV à 254 nm est de 37 %, ce qui est très important compte tenu du faible temps de polymérisation. Cette perte est certes moins importante que dans le cas des solvants organiques mais reste extrêmement élevée. De plus, une irradiation UV de 9 min ne semble pas pouvoir permettre un degré de polymérisation satisfaisant de la micelle, au vu des travaux réalisés précédemment au laboratoire par Julien Ogier¹⁰⁶ qui ont montré que des micelles diacétyléniques devaient être irradiées pendant 5 h avant qu'une polymérisation optimale soit obtenue. Cette perte de fluorescence induite par l'irradiation UV ne nous semblait pas compatible avec le développement d'un procédé d'encapsulation efficace.

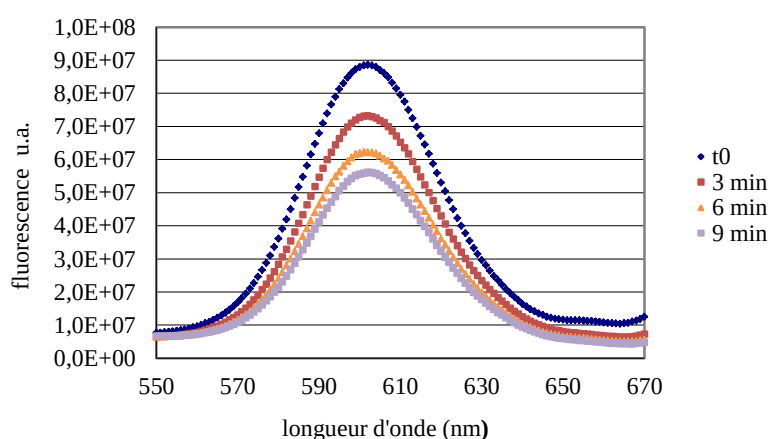


Figure 50. Évolution de l'intensité de fluorescence des QD en fonction du temps d'irradiation dans l'eau.

¹⁰⁶Ogier, J.; Arnauld, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J.-M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3902.

Dans le second cas (ii), le principal problème rencontré a été de transférer le QD en phase aqueuse. En effet, nous n'avons pas réussi à solubiliser correctement le QD dans l'eau car l'amphiphile diacétylénique (**L-1**) n'encapsule que très mal le nanocristal. Les interactions entre les chaînes diacétyléniques favoriseraient plutôt ici la formation de micelles composées uniquement d'amphiphiles **L-1**. Ainsi, sur cet exemple nous n'avons pas pu réaliser de tests de polymérisation, compte tenu de l'instabilité des objets obtenus.

La perte de fluorescence des QD est donc trop importante lors d'une polymérisation en présence de la nanoparticule, que ce soit en milieu organique ou aqueux. Cette approche semble donc compromise, nous obligeant à envisager l'autre possibilité qui est la polymérisation du motif diacétylénique avant l'encapsulation du QD.

3.3 Caractérisations des micelles formées.

À la vue de l'instabilité des QD en présence de composés diacétyléniques et sous irradiation UV, nous avons pris la décision de polymériser le motif diacétylénique avant de l'utiliser pour encapsuler la nanoparticule.

En nous basant sur le travail qui a été réalisé précédemment au laboratoire, nous avons utilisé l'amphiphile **L-1** pour former des micelles polymérisées dans l'eau. Nous avons pour cela irradié à 254 nm une solution d'amphiphile **L-1** à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ pendant 5 h. Cette solution d'amphiphiles polymérisés a ensuite été utilisée pour encapsuler des QD et les faire passer de la phase organique à la phase aqueuse à l'aide d'une sonde à ultra-sons. La solution aqueuse est ensuite centrifugé à 10 000 ×g pendant 5 min afin d'enlever les agrégats. Le surnageant est concentré et purifié par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Les QD ainsi encapsulés à l'aide de l'amphiphile polymérisé **L-1** seront appelés QD@Poly (Figure 51).

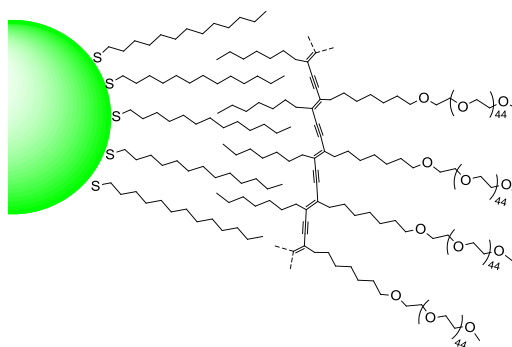


Figure 51. Structure de QD@Poly.

Deux paramètres importants dans le cas des micelles ont été mesurés :

- (i) La concentration micellaire critique de l'amphiphile.
- (ii) La taille de la micelle.

- (i) La concentration micellaire critique (CMC, cf. Annexe 2) de l'amphiphile **L-1**, a été mesurée lors d'une étude préliminaire au laboratoire¹⁰⁷ en utilisant la méthode par encapsulation du pyrène et suivi de fluorescence. La valeur mesurée est de 95 mg.L⁻¹ (Figure 52)

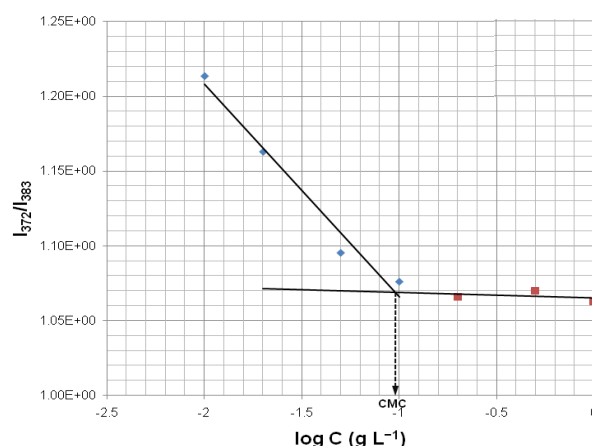


Figure 52. Détermination de la CMC de l'amphiphile diacétylénique-PEG2000 à l'aide de pyrène.¹⁰⁷

- (ii) Les tailles de ces micelles polymérisées vides ou renfermant un QD ont été mesurées par mesure de diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering). Une étude préliminaire au laboratoire¹⁰⁷ a montré que la micelle polymérisée vide avait un diamètre d'environ 13 nm. Nous avons déterminé par DLS que la taille de son équivalent renfermant un QD, noté QD@poly, a un diamètre de 21 nm (Figure 53).

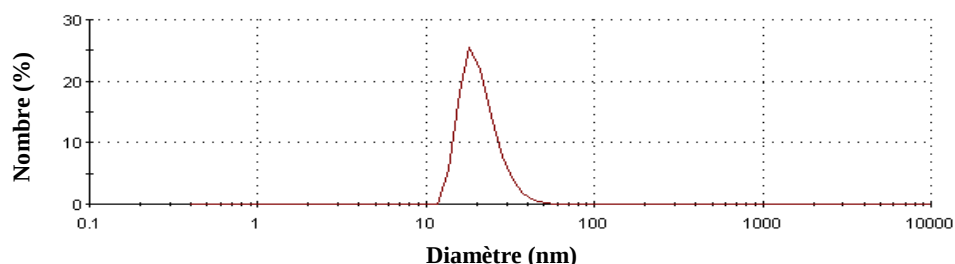


Figure 53. Distribution en nombre de la taille des particules QD@Poly, mesurée par DLS.

¹⁰⁷Mackiewicz, N.; Gravel, E. Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. *Small***2011**, 7, 2786.

Cette mesure de taille semble concorder avec le diamètre des particules de type CdSe/CdS/ZnS, utilisées dans notre étude qui sont composées d'une coque en monocouches de 3 CdS, 2 CdZnS et 1,5 ZnS ce qui donne une épaisseur de coque théorique de 2,1 nm et par conséquent une taille finale de 6,5 nm. Ainsi en additionnant la taille de la micelle vide et le diamètre du QD on obtient une valeur théorique de 19,5 nm, ce qui est proche de la mesure DLS (21 nm).

Après avoir formé et caractérisé nos objets, nous allons maintenant nous intéresser à l'étude de leur stabilité colloïdale en phase aqueuse dans différentes conditions.

4 Études de stabilité de QD@Poly en solution

4.1 Introduction.

Dans cette partie, nous avons étudié la stabilité de QD@Poly dans différentes conditions « dures » (pH, salinité, milieu oxydant, présence de ligands compétiteurs), entraînant classiquement une perte de stabilité colloïdale des nanoparticules.

4.2 Protocole de mesure.

4.2.1 Utilisation d'un amphiphile de référence.

Pour évaluer le nanocrystal encapsulé dans sa micelle diacétylénique, nous avons besoin d'un point de repère pour pouvoir comparer la stabilité éventuellement apportée par l'étape de polymérisation. La difficulté ici réside dans l'identification d'une référence pertinente. Nous ne pouvons pas utiliser l'amphiphile **L-1** non-polymérisé dont on sait qu'il ne permet pas l'obtention d'une suspension stable de QD dans l'eau. Nous avons donc décidé d'utiliser comme élément de comparaison un amphiphile connu dans la littérature pour sa stabilité, le 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] ou DSPE-PEG (Figure 54).

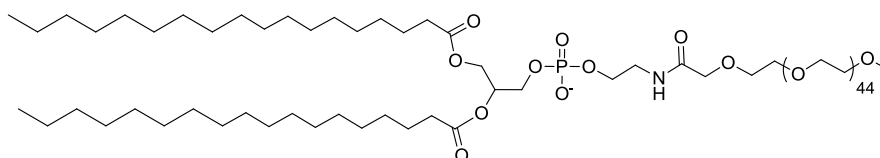


Figure 54. Structure de DSPE-PEG

C'est un amphiphile de ce type qui a été utilisé par Dubertret *et al.*¹⁰⁸ pour encapsuler des QD dans des micelles qui ont été utilisées dans l'étude du développement embryonnaire chez *Xenopus*. Les dérivés de phospholipides permettent de former des nano-objets avec de très bonnes stabilités colloïdales. Afin d'avoir des éléments de comparaison aussi pertinents que possible, un même lot de QD recouverts d'octadécane-thiol a été encapsulé d'une part avec la micelle polydiacétylénique (QD@Poly) et d'autre part avec l'amphiphile DSPE-PEG (QD@DSPE). La taille de la chaîne PEG de l'amphiphile DSPE-PEG est la même que celle incorporée dans notre micelle polydiacétylénique (PM : 2000 Da).

4.2.2 [Méthode de mesure.](#)

4.2.2.1 [Spectroscopie de fluorescence.](#)

Nous avons suivi l'évolution de la fluorescence tout en vérifiant que l'absorbance, qui reflète la concentration des QD, ne diminuait pas de manière significative. Nos particules étant destinées à l'imagerie, la stabilité de leur émission de fluorescence dans divers milieux est primordiale. Ainsi, nous avons mesuré le spectre d'émission des QD entre 500 et 700 nm (excitation à 400 nm), dans diverses conditions de salinité et à différents pH. La valeur du maximum du pic d'émission a été relevée et son évolution a été suivie au cours du temps. Afin de comparer l'évolution de l'intensité de fluorescence entre les divers lots de QD, nous avons établi un ratio entre la valeur du maximum de fluorescence à un instant t et la valeur du maximum de fluorescence à l'instant initial.

4.2.2.2 [Préparation des solutions.](#)

Des aliquotes de chacun des lots de QD (20 μ L de QD@DSPE d'une suspension à environ 1,2 μ M et 100 μ L de QD@Poly à environ 0,1 μ M) ont été dilués dans les solutions utilisées lors de l'étude de stabilité (variation du pH, du potentiel redox, et de la salinité) en veillant à rester dans une même gamme de concentration (entre 3 et 8 nM) afin de permettre une comparaison rigoureuse. La fluorescence mesurée quelques minutes après la préparation des solutions de QD a été prise comme référence. Les valeurs des mesures de fluorescence réalisées par la suite ont été normées pour chaque lot par rapport à cette valeur initiale.

¹⁰⁸Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science***2002**, 298, 1759.

4.3 Résultats.

4.3.1 Stabilité vis-à-vis du pH.

Nous avons en premier lieu réalisé l'étude de stabilité de nos nanoparticules en les soumettant à des variations de pH.

Pour ce faire, nous avons préparé cinq solutions à partir d'un tampon phosphate salin, PBS dont le pH a été ajusté à des valeurs de : 4, 6, 8, 9, et 12. Les solutions à pH 4, 9 et 12 ne sont plus rigoureusement des tampons, ce qui n'est toutefois pas fondamentalement gênant dans la mesure où nos QD n'expriment pas de fonctions chimiques qui pourraient influencer significativement le pH. Toutes ces solutions présentent l'avantage de contenir des sels et des ions phosphates à des concentrations proches de celles rencontrées *in vivo* (phosphates 0,01 M ; NaCl 0,138 M ; KCl 0,0027). La fluorescence des différentes solutions a ensuite été mesurée régulièrement sur des durées pouvant aller jusqu'à une quinzaine de jours et les différentes mesures ont été rapportées à la valeur initiale (4.2.2.1).

En analysant les courbes obtenues, représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps à divers pH (Figure 55), on remarque dès le départ une différence d'évolution de l'intensité de fluorescence entre la référence QD@DSPE qui décroît progressivement et QD@Poly qui présente une chute plus accentuée quelque soit le pH de travail. Cette perte de fluorescence initiale semble être suivie, au bout de 72 h, d'une phase plus stable durant laquelle l'évolution de l'intensité de fluorescence est plus faible, semblant se stabiliser avec un palier entre 5 % (pH 4) et 30 % (pH 12) de la fluorescence initiale (Figure 55). Cette tendance à se stabiliser n'est pas observée pour la référence QD@DSPE puisque même si la décroissance de fluorescence est lente, elle est continue.

En résumé, quel que soit le pH entre 4 et 12, l'utilisation de DSPE pour l'encapsulation des QD permet le maintien d'une intensité de fluorescence supérieure à la micelle polydiacétylénique.

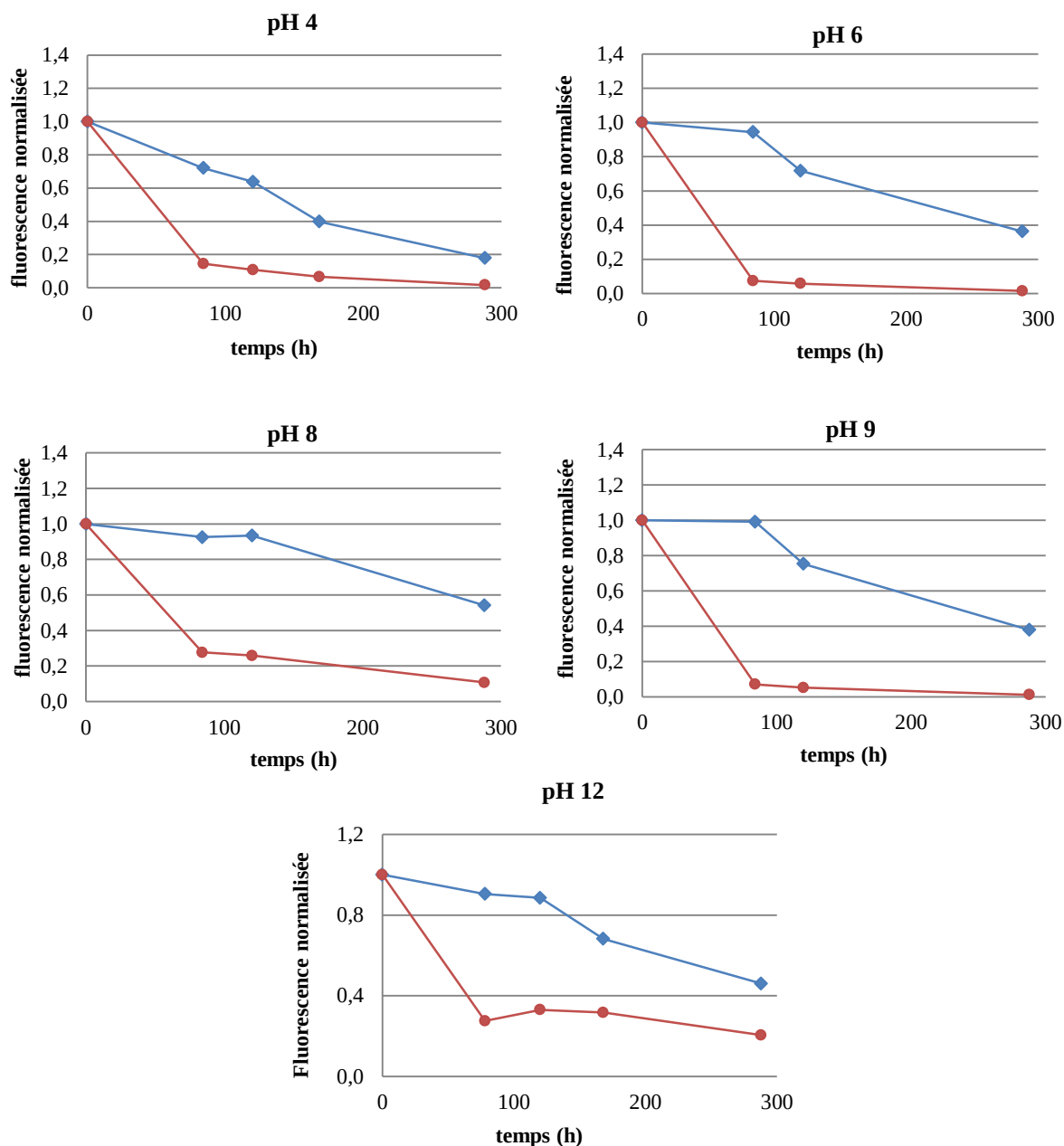


Figure 55. Évolution de la fluorescence de QD@DSPE (◆) et QD@Poly (●) en fonction du temps à différentes valeurs de pH.

4.3.2 Stabilité vis-à-vis de la salinité.

Nous avons également voulu tester la stabilité des divers lots de QD en les soumettant à une forte concentration saline. Nous avons pour cela préparé une solution de NaCl 1 M et procédé suivant la méthode décrite précédemment (4.2.2). L'évolution de la fluorescence (Figure 56) est donnée avec une échelle de temps logarithmique pour une lecture plus aisée.

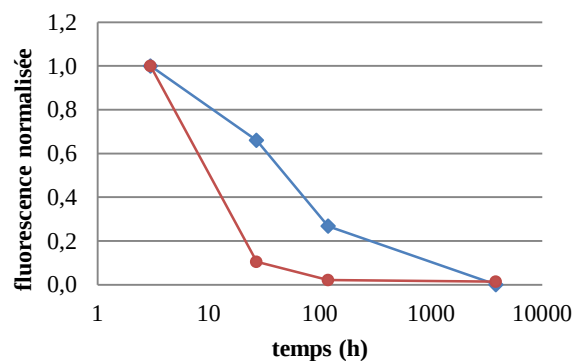


Figure 56. Fluorescence de QD@DSPE (♦) et QD@Poly (•) au cours du temps dans NaCl 1 M.

Après un peu plus de 24 h d'incubation, le lot QD@DSPE présente une intensité de fluorescence correspondant à 67 % de l'intensité initiale (33% perte), tandis que QD@Poly a perdu près de 90% de sa fluorescence initiale. À nouveau, la référence QD@DSPE semble présenter une stabilité supérieure à QD@Poly. Nous avons toutefois enregistré un spectre de fluorescence après 5 mois et avons observé que QD@Poly présentait une fluorescence résiduelle supérieure à celle de la référence QD@DSPE, avec respectivement 1 et 0,1 % de l'intensité initiale. Ces valeurs restent cependant peu significatives.

4.3.3 Stabilité en présence de ligands compétiteurs.

Afin de déterminer si l'encapsulation des QD dans les micelles amphiphiles permettait de protéger la couche de ligands en interaction avec la surface de la particule, nous avons réalisé des tests de compétition en présence de glutathion sous sa forme réduite (thiol). Le glutathion est un tripeptide endogène issu de la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, qui est principalement localisé dans le foie, organe connu pour accumuler les nano-objets. Il intervient dans le maintien du potentiel redox dans la cellule et joue également un rôle dans la chélation des métaux lourds, notamment celle du cadmium.¹⁰⁹ La concentration de glutathion dans le foie d'un rat est aux alentours de 6 mM.¹¹⁰ Pour réaliser ces tests, un volume (20 μ L à environ 1,2 μ M pour QD@DSPE et 100 μ L à environ 0,1 μ M pour QD@Poly) de chaque lot de QD (de manière à avoir une concentration finale voisine) a été ajouté à 2 mL d'une solution de glutathion à 0,1 M, ce qui correspond à plus de 15 fois la concentration rencontrée dans les cellules du foie.

L'évolution de la fluorescence (Figure 57) nous indique à nouveau une brusque chute de l'intensité de fluorescence pour les deux lots de nanocristaux, cependant plus marquée pour

¹⁰⁹Delalande, O.; Desvaux, H.; Godat, E.; Valleix, A.; Junot, C.; Labarre, J.; Boulard, Y. *FEBS J.***2010**, 277, 5086.

¹¹⁰Shaik, I. H.; Mehvar, R. *Anal Bioanal Chem.***2006**, 285, 105.

QD@Poly. En effet, après environ 24 h, la fluorescence de QD@Poly se situe entre 10 et 17 % de la fluorescence initiale, alors que la décroissance de la référence QD@DSPE obéit à une diminution linéaire avec une perte de fluorescence d'environ 0.6 % par heure. Encore une fois la stabilité de l'intensité de fluorescence de la référence est supérieure à celle de QD@Poly.

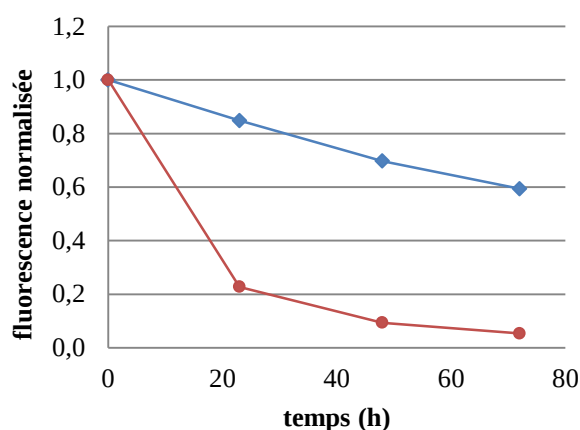


Figure 57. Évolution de la fluorescence des QD@DSPE (♦) et QD@Poly au cours du temps dans glutathion 0,1 M.

4.3.4 Stabilité en milieu oxydant.

Nous avons également voulu tester la stabilité vis-à-vis d'un milieu oxydant. Pour cela nous avons préparé une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration d'environ 1 μM , ce qui est 10 à 100 fois supérieur à la concentration intracellulaire (estimée entre 10^{-7} et 10^{-8} M).¹¹¹

L'évolution de la fluorescence en fonction du temps (Figure 58) nous indique à nouveau une chute de la fluorescence pour les deux lots (QD@DSPE et QD@Poly) même si la décroissance est plus franche pour QD@Poly dont l'intensité décroît à environ 10 % de sa valeur initiale au bout de 24 h.

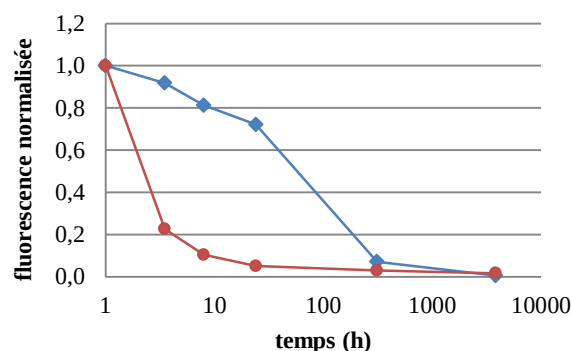


Figure 58. Evolution de la fluorescence de (♦) QD@DSPE et (●) QD@Poly en fonction du temps dans H_2O_2 1 μM .

¹¹¹Antunes, F.; Cadenas, E. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 30, 1008.

4.3.5 Stabilité en milieu de culture

Avant de passer à une étude *in vivo*, nous avons voulu contrôler la stabilité des QD@poly dans un milieu de culture utilisé classiquement en biologie. Le milieu utilisé (*DMEM complet*, 10 % SVF) contient un certain nombre de compétiteurs potentiels des ligands de surface présents sur le QD, tels que la L-glutamine (1 mM), le β -mercaptoéthanol (50 μ M) ou des acides aminés non-essentiels. Les mesures ont été faites suivant le même protocole que précédemment suivant la méthode décrite dans la partie C paragraphe 4.2.2.

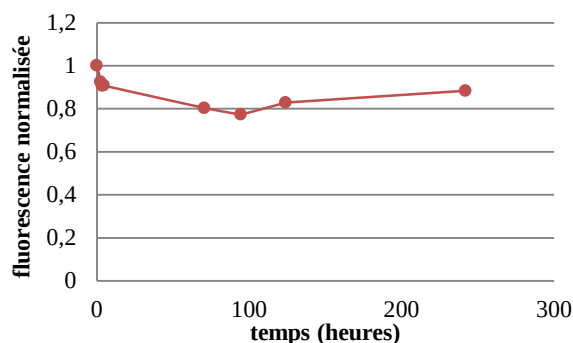


Figure 59. Évolution de la fluorescence des QD@Poly en fonction du temps dans un milieu de culture cellulaire.

On remarque que 80 % de la fluorescence des QD@Poly est maintenue même après 10 jours en milieu de culture. Cela nous donne bon espoir que les QD@Poly soient suffisamment stables dans des milieux complexes comme le sang qui comporte de nombreux composés présentant une affinité pour la surface des QD et qui pourraient se comporter comme des ligands compétiteurs.

4.4 Conclusion

La stabilité de l'intensité de fluorescence au cours du temps pour QD@Poly est globalement moins bonne que pour QD@DSPE dans les diverses conditions testées. Toutefois, le suivi de la fluorescence de QD@Poly dans un milieu de culture utilisé classiquement en biologie nous indique une stabilité de l'intensité de fluorescence (80 % de la valeur initiale) sur une période de 10 jours. Ces résultats nous confortent quant à l'utilisation potentielle de QD@Poly pour une étude *in vivo*.

5 Étude de QD@Poly *in vivo*

5.1 Introduction

Outre les études *in vitro*, l'étude *in vivo* des QD est également indispensable lorsque l'on vise une utilisation biomédicale car de nombreux éléments endogènes peuvent venir perturber la stabilité colloïdale des QD. Les fonctions thiols portées par les cystéines des peptides peuvent, par exemple, interagir avec la surface du cristal alors que les phospholipides des membranes cellulaires peuvent potentiellement venir interagir avec la couche primaire de ligands hydrophobes à la surface de la nanoparticule et de fait, remplacer les amphiphiles formant la couche secondaire. D'autre part, des effets de toxicité du nanoobjet peuvent être associés aux amphiphiles de surface de la nanoparticule qui peuvent déstabiliser la membrane cellulaire.

5.2 Préparation des QD émettant dans le proche infra-rouge

Ainsi, après avoir procédé à des études de stabilité en solution sur des QD de type CdSe/CdS/ZnS émettant vers 600 nm, nous avons appliqué cette méthode à des QD de type CuInS₂/ZnS émettant dans le proche infra-rouge avec une maximum d'émission à 800 nm. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de ces QD sont situées dans la « fenêtre de transparence » des tissus biologiques. Ces nanocristaux sont, de ce fait, bien adaptés à une utilisation pour l'imagerie *in vivo*. Nous avons donc utilisé le même amphiphile polymérisé **L-1**, tout comme pour les QD@Poly visibles, pour l'encapsulation des QD CuInS₂/ZnS. Dans un premier temps, nous avons effectué un échange primaire de ligands à l'aide d'octadécane-thiol, puis nous avons encapsulé les QD à l'aide d'une micelle pré-polymérisée de l'amphiphile **L-1**, avant de les purifier par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Ces nanoobjets seront notés QD_{NIR}@Poly.

5.3 Résultats

Nous n'avons eu le temps de réaliser ici qu'une étude préliminaire *in vivo* de la biodistribution des QD_{NIR}@Poly. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Frédéric Ducongé du Service Hospitalier Frédéric Joliot du CEA. L'injection de 200 μ L (10 nmol) d'une solution de QD_{NIR}@Poly a été effectuée par voie intraveineuse dans la queue d'une souris de type nude. Puis un suivi de la biodistribution des QD_{NIR}@Poly a été réalisé par imagerie de fluorescence en temps réel (Figure 60). Après 24 h, l'animal a été sacrifié et les organes ont été prélevés et analysés individuellement (Figure 61). Sur la durée de l'expérience, la souris n'a montré aucun changement de comportement ou signe apparent de souffrance.

La distribution sur les 5 premières heures (Figure 60) montre un signal intense au niveau du foie. Le foie est souvent le siège d'une accumulation des nanoparticules de par son rôle dans l'excrétion de ces dernières et son implication dans le système réticulo-endothélial qui prend en charge un grand nombre de corps étrangers circulant dans le sang. On constate également l'apparition progressive d'un signal diffus de fluorescence sur l'ensemble du corps de l'animal. Cette observation semble indiquer une accumulation des objets dans la peau. L'origine de ce phénomène inattendu est incertaine, bien qu'un tropisme similaire ait déjà été observé avec d'autres nanoparticules pégylées.^{33,112}

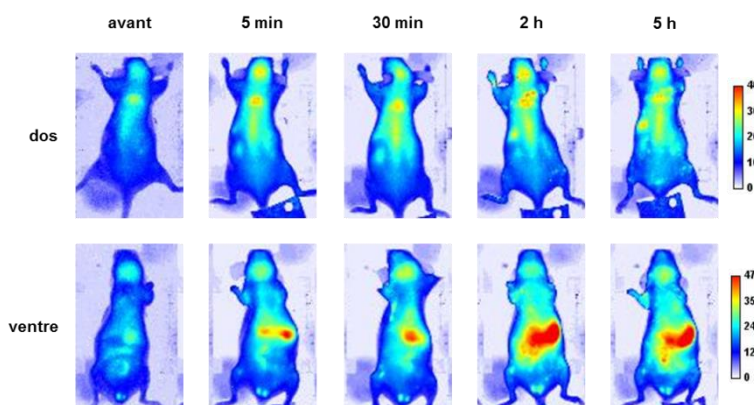


Figure 60. Images proche infra-rouge à divers temps post injection de QD_{NIR}@Poly.

L'analyse des organes (Figure 61) confirme l'accumulation des objets dans le foie et la peau mais montre également un signal très fort au niveau du rein. Cette accumulation au niveau du rein est surprenante, surtout à un temps relativement long. Si les objets suivaient une voie d'excrétion urinaire, ils devraient transiter par le rein (sans s'y accumuler) et se retrouver rapidement dans la vessie. Or, aucun signal n'a été observé dans la vessie, que ce soit sur les images du corps entier aux temps courts

¹¹² Faure, A. C.; Dufort, S.; Josserand, V.; Perriat, P.; Coll, J. L.; Roux, S.; Tillement, O. *Small* **2009**, 5, 2565.

ou après résection des organes à 24 h. Par ailleurs, le diamètre moyen des QD_{NIR}@Poly (ca. 20 nm) est supérieur au seuil de filtration glomérulaire (ca. 8 nm), ce qui rend très improbable leur présence dans les urines. Il n'y a que très peu d'accumulation dans les autres organes.

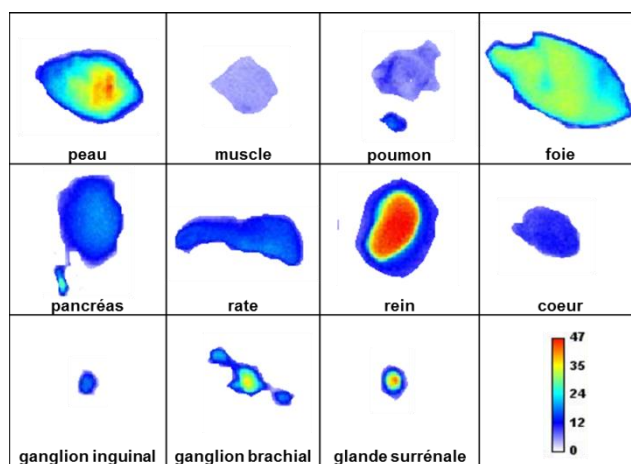


Figure 61. Images de fluorescence de divers organes 24 h après injection de QD_{NIR}@Poly.

Des études complémentaires doivent être menées pour mieux comprendre la distribution des QD dans les organes. Il semble notamment que la suspension des QD_{NIR}@Poly soit stable dans le flux sanguin, comme l'indique la faible accumulation au niveau des ganglions. Cela semble indiquer une stabilité satisfaisante de QD_{NIR}@Poly *in vivo* chez la souris, mais demande à être vérifié par d'autres techniques comme une analyse ICP-AES sur les organes collectés afin de doser la totalité des QD présents même ceux ayant cessé d'émettre de la fluorescence.

5.4 Conclusion et perspectives

L'étude préliminaire *in vivo* a montré que les QD_{NIR}@Poly pouvaient être utilisés pour l'imagerie de fluorescence du petit animal. Aucun signe de toxicité aiguë n'a été observé et une accumulation préférentielle a été notée au niveau du foie, de la peau et des reins. Ces résultats nécessitent d'être validés par des études complémentaires pour mieux comprendre la biodistribution de QD_{NIR}@Poly dans les reins et la peau.

Nous avons, en parallèle de ce travail sur les nanocristaux encapsulés dans des micelles polydiacétyléniques, élaboré une seconde stratégie d'encapsulation qui repose non plus sur l'utilisation de micelles polymérisées mais sur l'utilisation de micelles composées d'amphiphiles perfluorés.

IV. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés perfluorés.

IV. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés perfluorés.

Après nous être intéressé à des micelles polymérisables au chapitre précédent, nous allons dans cette partie, développer une nouvelle stratégie d'encapsulation des QD. Le but étant toujours d'apporter une stabilité colloïdale en milieu aqueux pour des applications en biologie.

Nous allons nous intéresser à une toute autre famille de ligands, les composés perfluorés. Nous espérons pouvoir mettre à profit les interactions spécifiques existant entre chaînes perfluorées dans notre quête de stabilité. Après avoir fait une brève introduction sur les applications des composés perfluorés, nous exposerons notre stratégie puis nous développerons la préparation et la caractérisation des nano-objets étudiés. Pour finir une étude de stabilité sera réalisée et les QD préparés utilisés en imagerie de fluorescence du petit animal.

1 Introduction.

1.1 Brève histoire des composés fluorés.

1.1.1 Les débuts au 19^e siècle.

La synthèse du premier composé fluoré, fluorure de méthyle (aussi appelé fréon-41), a été réalisée par Dumas *et al.* en 1835, à partir de diméthylsulfate¹¹³ (Figure 62).

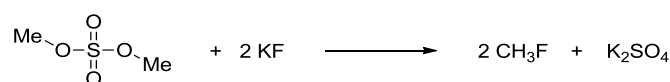


Figure 62. Synthèse de fluorure de méthyle selon la méthode décrite par Dumas *et al.*

Quelques années plus tard Alexander Borodine (1833-1887), qui fût également un compositeur de musique, réalisa une substitution nucléophile de divers halogènes par du fluor.¹¹⁴ Ses travaux furent publiés en 1862 (Figure 63).

¹¹³Banks, R. E.; Tatlow, J. C. *J. Fluorine Chem.* **1986**, 33, 71.

¹¹⁴Borodin, A. *Compt. Rend.* **1862**, 55, 553.

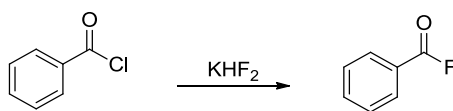


Figure 63. Synthèse de fluorure de benzoyle selon la méthode décrite par Borodine.

Ce n'est que 24 ans plus tard, en 1886, que l'isolation du fluor élémentaire par Moissan¹¹⁵ a été réalisée par électrolyse d'un mélange fondu de KHF_2 et de KF . Toutefois, à cause des difficultés à manipuler des réactifs extrêmement dangereux et corrosifs, la chimie des composés fluorés ne se développa quasiment pas jusque dans les années 1920, et c'est durant la seconde guerre mondiale qu'elle connut un essor fulgurant grâce au Projet Manhattan.^{116,117}

1.1.2 L'essor durant la seconde guerre mondiale.

La première production en masse de fluor (F_2) fût réalisée pour la production de bombes atomiques, dans le cadre du Projet Manhattan. Le composé F_2 était alors nécessaire à la production de UF_6 dont le traitement permettait de séparer l'uranium 238 non-fissile de l'uranium 235 fissile. Il a fallu développer de nouveaux matériaux capables de résister dans les conditions de production et d'utilisation de UF_6 , extrêmement corrosif. Cela incluait des molécules à haut poids moléculaire, utilisées comme lubrifiants, ou encore des polymères pour réaliser des revêtements protecteurs. L'utilisation de composés perfluorés pour résoudre le problème a été suggéré par Simons.¹¹⁹ Une fois la compatibilité des composés perfluorés vérifiée, le problème de synthétiser des molécules organofluorées à grande échelle s'est posé.

Une des principales méthodes pour produire des composés organofluorés fût développée par Fowler.¹¹⁸ Cette méthode utilise du trifluorure de cobalt (CoF_3) capable de remplacer les protons des chaînes alcanes par des atomes de fluor (Figure 64).

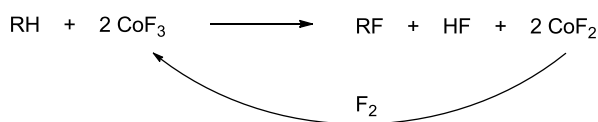


Figure 64. Fluoration utilisant le CoF_3 .

¹¹⁵Flahault, J.; Viel, C. *J. Fluorine Chem.***1986**, 33, 27.

¹¹⁶Okazoe, T.; *Proc. Jpn. Acad., Ser. B***2009**, 85, 276.

¹¹⁷Goldwhite, H. *J. Fluorine Chem.***1986**, 33, 109.

¹¹⁸Fowler, R. D. et al. *Ind. Eng. Chem.***1947**, 39, 292.

La réaction a lieu à 400 °C et permet de remplacer l'ensemble des protons d'un hydrocarbure par des atomes de fluor. La réaction forme du difluorure de cobalt (CoF_2) qui pourra être régénéré en trifluorure de cobalt (CoF_3) par réaction avec du fluor.

L'autre procédé développé pour la synthèse de composés perfluorés a été mis au point par Simons¹¹⁹ et ne fût publié qu'en 1949 pour des raisons de confidentialité liées au Projet Manhattan. Il s'agit d'une fluoration par voie électro-chimique (electrochemical fluorination : ECF). Les composés organiques sont injectés dans une cellule d'électrolyse scellée contenant du HF liquide et anhydre. C'est à l'anode, composée de nickel, que la réaction de fluoration se produit.

Grâce à ces deux approches, des composés perfluorés capables de résister à UF_6 ont pu être produits à grande échelle. La chimie des composés perfluorés s'est donc d'abord développée en réponse aux besoins du Projet Manhattan, mais s'est ensuite étendue à de nombreux domaines civils.

1.1.3 Les applications civiles après la guerre.

L'application la plus connue des composés perfluorés est le Teflon[®], composé de polytétrafluoroéthylène (PTFE), qui fut commercialisé par DuPont dès 1948.

Ce polymère résiste à quasiment tous les composés chimiques et est stable à haute température ($T_f > 300$ °C). Il sert notamment comme revêtement dans les poêles antiadhésives, comme joint pour des raccords en plomberie, comme revêtement antireflet sur des lunettes, il entre dans la composition des semelles des fers à repasser, ou encore des vêtements antitaches.

En chimie, il sert notamment à faire des contenants pour les super-acides, des tubes pour divers appareils d'analyse capables de résister aux solvants organiques, des septa pour les flacons HPLC, des filtres, etc. L'utilisation du PTFE et de ses dérivés a permis d'améliorer de nombreux objets utilisés au quotidien mais aussi dans l'industrie et les laboratoires.

1.1.4 Un nouvel outil de synthèse dans les années 90.

En 1997, l'équipe de Curran¹²⁰ publie un article dans le journal *Science*, dans lequel elle décrit un nouveau mode de synthèse utilisant une étiquette perfluorée qui permet de combiner les avantages de la synthèse sur support solide et de la synthèse en solution « classique ». Leur idée repose sur le fait que les phases fluorées ne sont miscibles ni avec l'eau ni avec les solvants

¹¹⁹Simons, J. H. J. *Electrochem. Soc.***1949**, 95, 47.

¹²⁰Studer, A.; Hadida, S.; Ferritto, R.; Kim, S.-Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science***1997**, 275, 823.

organiques. Il est donc possible de faire une synthèse en solution puis d'extraire le composé marqué avec une étiquette perfluorée grâce à une extraction liquide-liquide. La fixation de l'étiquette perfluorée étant réversible cela permet de récupérer la molécule d'intérêt après avoir réalisé la réaction voulue (Figure 65).

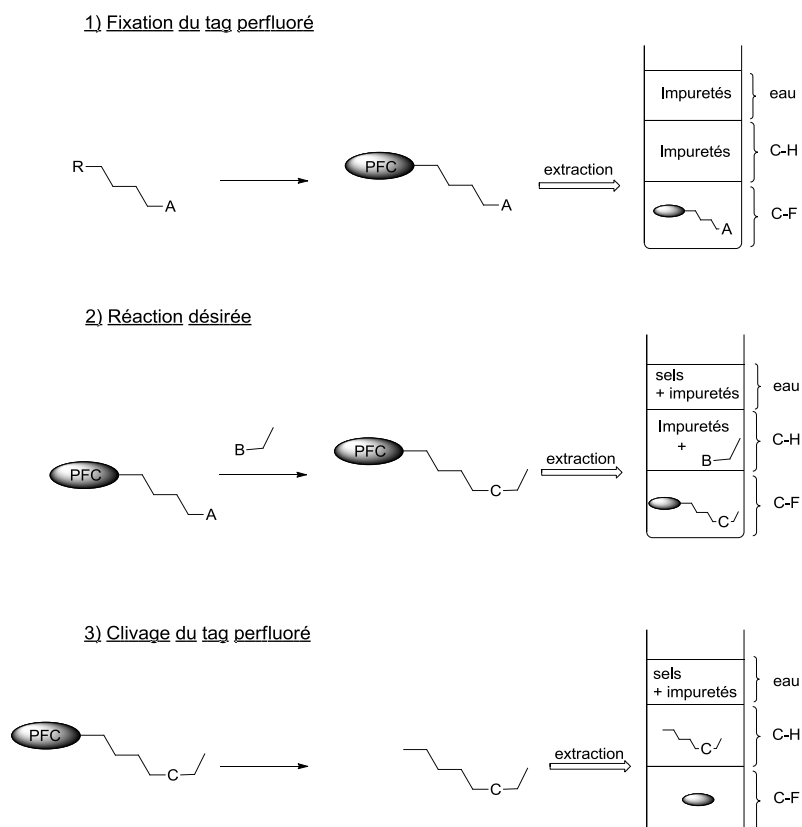


Figure 65. Principe de la synthèse utilisant une étiquette fluorée

Dans certains cas, il sera possible de réaliser la fixation de l'étiquette perfluorée et la réaction voulue en une seule étape. L'avantage de cette technique, par rapport à la synthèse sur support solide, est que les techniques d'analyse classiques (RMN, HPLC, ...) peuvent être utilisées en cours de synthèse. Par rapport à la synthèse en solution, la purification des composés est facilitée tout en gardant des conditions de réaction proches de celles utilisées « classiquement » en solution. Petit à petit, des alternatives à l'extraction en phase fluorée, qui est coûteuse, ont été développées, notamment avec la venue de gels de silice avec une phase stationnaire composée d'un perfluorocarbure (PFC).¹²¹

¹²¹Curran, D. P. *Synlett***2001**, 09, 1488.

1.1.5 Les applications médicales des 20^e et 21^e siècles.

De nombreuses applications médicales se développent, ou sont envisagées, avec les PFC,^{122,123,124} notamment la ventilation liquidienne.¹²⁵ Celle-ci consiste à remplir les poumons, de manière partielle ou totale, avec un PFC liquide, ainsi l'interface au niveau des poumons ne serait plus de type air-liquide mais liquide-liquide. Cette application a été envisagée parce que les PFC sont les liquides possédant la plus grande capacité de dissolution de divers gaz, dont l'oxygène. D'autre part, les PFC sont inertes biologiquement, ce qui a permis leur utilisation chez l'homme. Une étude de ventilation liquidienne partielle chez des nourrissons prématurés ayant une insuffisance respiratoire a été publiée en 1996.¹²⁵

Les PFC sont également utilisés comme agent de contraste pour les échographies.¹²² Il a été montré que des microbulles de gaz pouvaient améliorer la résolution des images d'échographie et améliorer le dépistage de certaines maladies, cardiaques notamment.¹²² Le problème est que la durée de vie de ces microbulles est de quelques secondes, ce qui est insuffisant pour la plupart des examens. L'utilisation de PFC a permis de stabiliser ces microbulles a des temps allant jusqu'à 40 min¹²² pour le F-diglyme ($C_6F_{14}O_3$). Un produit utilisant ce concept a d'ailleurs reçu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis en 2002, sous le nom de Imagent. Les images d'échographie de la Figure 66 montrent la différence de résolution de l'image d'une tumeur chez un lapin avec et sans le produit de contraste.¹²²

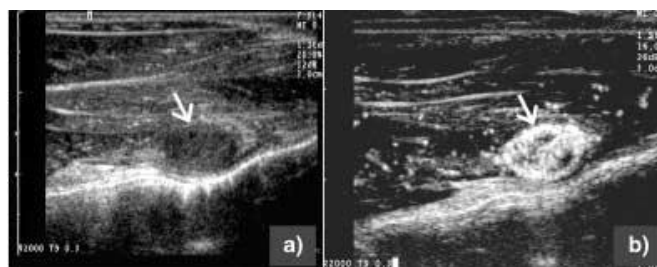


Figure 66. Image de l'échographie d'une tumeur chez un lapin a) avant et b) après injection du produit de contraste¹²².

Les applications listées ici ne représentent qu'une partie des applications possibles dans le domaine médical utilisant des composés perfluorés.

¹²²Schutt, E. G.; Klein, D. H.; Mattrey, R. M.; Riess, J. G. *Angew.Chem. Int. Ed.***2003**, 42, 3218.

¹²³Rapoport, N. patent US2010/0178305 A1.

¹²⁴Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Papolla, M. A.; Böker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. *J. Med. Chem.***2006**, 49, 2812.

¹²⁵Leach, C. L.; Greenspan, J. S.; Rubenstein, S. D.; Shafeer, T. H.; Wolfson, M. R.; Jackson, J. C.; DeLemos, R.; Fuhrman, B. P. *N. Engl. J. Med.***1996**, 335, 761.

1.2 Pourquoi utiliser des amphiphiles perfluorés pour encapsuler des QD ?

1.2.1 Interaction spécifique entre chaînes perfluorées.

Toujours dans l'optique de stabiliser les QD en milieu aqueux, pour l'utilisation en milieu biologique, nous avons voulu mettre à profit la double orthogonalité entre les phases fluorées et les phases organiques et aqueuses. L'idée est de créer une couche de ligands PFC autour du QD, permettant une interaction forte avec des amphiphiles ayant une étiquette perfluorée (Figure 67). Cette approche implique la synthèse d'amphiphiles dans lesquels la partie lipophile est remplacée par une partie fluorophile, tout en conservant la partie hydrophile.

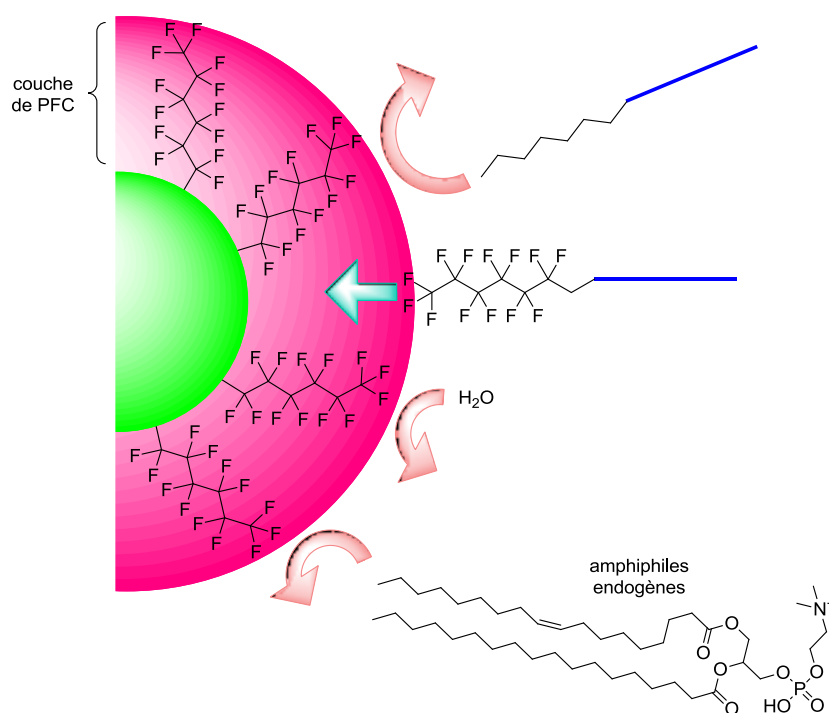


Figure 67. Intérêt d'une couche de PFC autour du QD.

Cette couche de PFC à la surface du QD joue un double rôle, au niveau de (i) l'équilibre entre les formes libres et adsorbées des ligands à la surface du QD et de (ii) la protection de la surface du nanocristal.

(i) Elle permet, dans un premier temps, de déplacer l'équilibre de l'interaction des amphiphiles perfluorés avec le nanocristal vers la forme liée. En effet, les parties perfluorées des amphiphiles auront une forte affinité pour la couche de PFC à la surface du QD, puisque sous leur forme libre ils seront en interaction défavorable soit avec de l'eau, soit avec des solvants organiques.

(ii) De par la nature même de la couche de ligands PFC, elle ne permet pas aux amphiphiles endogènes de venir s'interdigiter comme dans le cas d'une couche de ligands organiques. Cette propriété devrait limiter la fixation d'amphiphiles endogènes qui pourrait entraîner une diminution de la stabilité colloïdale des particules. Nous espérons que cette couche de ligands perfluorés à la surface du nanocristal se comporte un peu comme un bouclier empêchant les diverses attaques du milieu environnant d'atteindre le nanocristal. Ainsi les propriétés optiques et de stabilité colloïdale de la particule seraient préservées.

1.2.2 Possibilité d'élaborer une sonde bimodale.

Les composés perfluorés peuvent être utilisés pour l'IRM du ^{19}F , comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce chapitre. Outre l'espoir d'une stabilité colloïdale accrue, cette caractéristique est l'autre raison pour laquelle nous avons envisagé l'utilisation de ligands perfluorés.

Le fluor est un élément présent à l'état de traces (os et dents) dans notre organisme, d'où un de bruit de fond minime en IRM du ^{19}F . En développant des QD émettant dans le proche infra-rouge et recouverts de ligands perfluorés nous souhaitons mettre au point une sonde bimodale permettant de visualiser le cœur inorganique par imagerie optique (fluorescence) et la couche de ligands par IRM du ^{19}F (Figure 68). Il deviendrait ainsi possible de suivre l'évolution du nano-objet injecté *in vivo*, en vérifiant la co-localisation de la couche de ligands périphériques avec le cœur inorganique ou leur éventuelle dissociation.

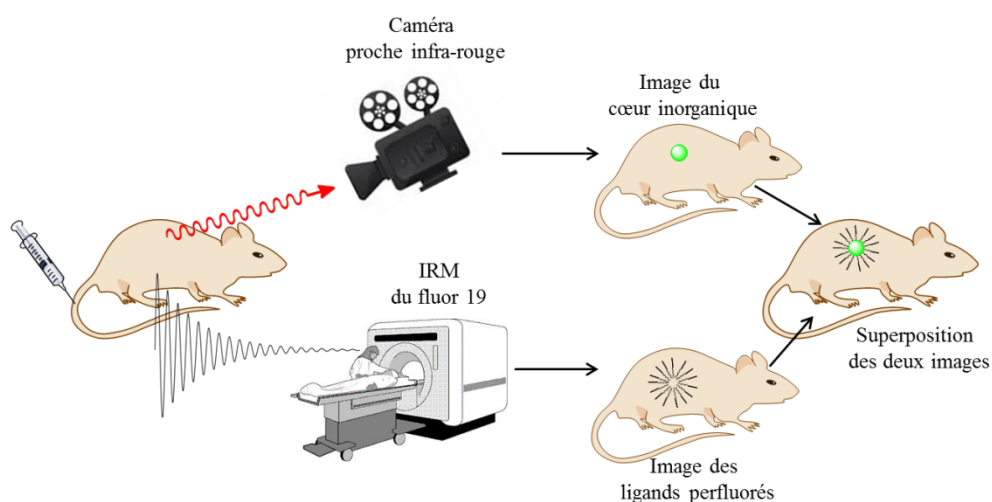


Figure 68. Principe de la sonde bimodale.

Pour qu'une image bimodale soit possible, il faut que la concentration en fluor à la surface du QD soit suffisamment importante, dans les conditions d'une injection *in vivo* de QD. De plus, le signal du fluor

doit être bien résolu avec une largeur à mi-hauteur la plus faible possible. Pour mettre l'imagerie du fluor au point nous avons collaboré avec le Dr. Julien Valette qui est spécialisé dans ce domaine et qui travaille à l'Institut d'Imagerie BioMédicale (I²BM) dans le service MIRCen (Molecular Imaging Research Center). Pour la partie proche infra-rouge nous avons collaboré avec Frédéric Ducongé de l'Institut d'Imagerie BioMédicale (I²BM) dans le Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay.

1.3 État de l'art.

1.3.1 Propriétés des amphiphiles perfluorés.

Les surfactants perfluorés, tout comme leur homologues hydrogénés, sont capables de s'auto-assembler en structures de type micellaire dans l'eau. Toutefois il existe plusieurs différences notables entre les amphiphiles perfluorés et hydrogénés :

- (i) Les surfactants perfluorés (SF) sont moins solubles dans l'eau que leurs homologues hydrogénés (SH), ce qui a pour conséquence de modifier, à longueur de chaîne égale, la valeur de la CMC. D'après la littérature, on peut déduire en première approximation que la CMC d'un SF est équivalente à celle de son homologue SH lorsque la partie hydrophobe de SH contient $1,5^{126}$ à $1,7^{127}$ fois plus d'atomes de carbone. En résumé, cela signifie que l'on peut utiliser des longueurs de chaîne plus courtes pour réaliser des assemblages micellaires lorsque l'on travaille avec des SF.
- (ii) Les surfactants perfluorés diminuent la tension de surface des solutions aqueuses à des valeurs impossibles à atteindre avec les surfactants hydrogénés.
- (iii) Des études^{128,129} ont suggéré que les interactions entre chaînes perfluorées étaient plus fortes que celles qui existent entre des chaînes hydrocarbonées classiques.
- (iv) Une chaîne carbonée perfluorée est plus rigide qu'une chaîne carbonée hydrogénée. Cela vient du fait que la différence d'énergie entre les conformations *trans* et *gauche* est très élevée pour les PFC (4.6 kJ/mol),¹³⁰ ce qui implique que la probabilité d'avoir une liaison C–C avec une conformation *gauche* est extrêmement faible. Alors que pour une chaîne hydrocarbonée en équilibre, il y a statistiquement un groupe CH₂ en conformation *gauche* tous les 4 CH₂, dans le

¹²⁶Shinoda, K.; Hato, M.; Hayashi, T. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 909.

¹²⁷Ravey, J. C.; Stébé, M. *J. Colloids Surf. A.* **1994**, 84, 11.

¹²⁸Jacquemain, D.; Wolf, S. G.; Leveiller, F.; Frolow, F.; Eisenstein, M.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9983.

¹²⁹Shin, S.; Collazo, N.; Rice, S. A. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 1352.

¹³⁰Wang, K.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Asakawa, T. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 9237.

cas des chaînes perfluorocarbonées la quasi-totalité des CF₂ ont une conformation *trans*.¹³¹ C'est la raison pour laquelle il est plus facile d'empiler des chaînes perfluorées de manière compacte car on perd moins d'entropie puisque les chaînes ont déjà une conformation *trans*.¹³⁰

La structure des agrégats micellaires peut dans de nombreux cas être rationalisée grâce au paramètre d'empilement critique (CPP) (*cf.* Annexe 2). Un amphiphile perfluoré aura un CPP plus grand que son analogue hydrogéné pour une longueur de chaîne carbonée équivalente et une tête polaire identique. Or, selon la valeur du CPP la structure des micelles ne sera pas la même. Pour former des micelles sphériques il faut un CPP < 0,33, alors que pour des micelles cylindriques il faut un CPP compris entre 0,33 et 0,5. On comprend aisément qu'à structure équivalente, les SF n'auront pas forcément la même structure agrégée que les SH. Prenons l'exemple du dodécylsulfate de sodium (SDS). Dans le cas d'une chaîne hydrocarbonée, on formera des micelles sphériques alors que pour son homologue perfluoré on formerait plutôt des micelles cylindriques.

1.3.2 Les applications des micelles d'amphiphiles perfluorés.

1.3.2.1 Agents de transport biocompatibles.

Une étude menée par Ortial *et al.*¹³² sur des agents antioxydants a montré qu'il était possible d'augmenter la biodisponibilité de certains composés en les greffant sur un amphiphile perfluoré. L'avantage majeur d'utiliser un amphiphile perfluoré plutôt qu'un amphiphile avec une chaîne hydrogénée est la faible interaction avec les membranes cellulaires du fait du caractère lipophile des chaînes perfluorées. Actuellement, il est communément admis que les amphiphiles perfluorés ont un effet détergeant sur les membranes cellulaires quasi-inexistant contrairement à leurs homologues hydrogénés.^{133,134} C'est une des raisons de leur faible cytotoxicité.

Les micelles d'amphiphiles perfluorés sont également étudiées comme substituant artificiels à l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène. L'idée est de stabiliser des gouttes de perfluorocarbonate (PFC), ayant des capacités remarquables de stockage de l'oxygène, à l'intérieur de ces micelles qui serviraient ensuite de transporteurs. Ces micelles de PFC peuvent également servir comme agent de contraste lors d'échographies.¹²²

¹³¹ Hoffmann, H.; Kalus, J.; Thurn, H. *Colloid Polym. Sci.* **1983**, 261, 1043.

¹³² Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Papolla, M. A.; Börker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2812.

¹³³ Durand, G.; Polidori, A.; Ouari, O.; Tordo, P.; Geromel, V.; Rustin, P.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5230.

¹³⁴ Park, K.-H.; Berrier, C.; Lebaupain, F.; Pucci, B.; Popot, J.-L.; Ghazi, A.; Zito, F. *Biochem. J.* **2007**, 403, 183.

Récemment, Chung *et al.*¹³⁵ ont mis au point un amphiphile, composé d'un peptide cyclique portant des chaînes perfluorées, capable de s'auto-arranger en nanocapsule. Ils ont démontré que cette nanocapsule recouverte de groupements guanidine était capable de transporter des composés hydrophiles à l'intérieur des cellules. Leur modèle utilise des nanocapsules chargées en calcéine qui ont été incorporées dans des cellules HeLa. La Figure 69 décrit la structure des amphiphiles utilisés ainsi que celle de la nanocapsule.

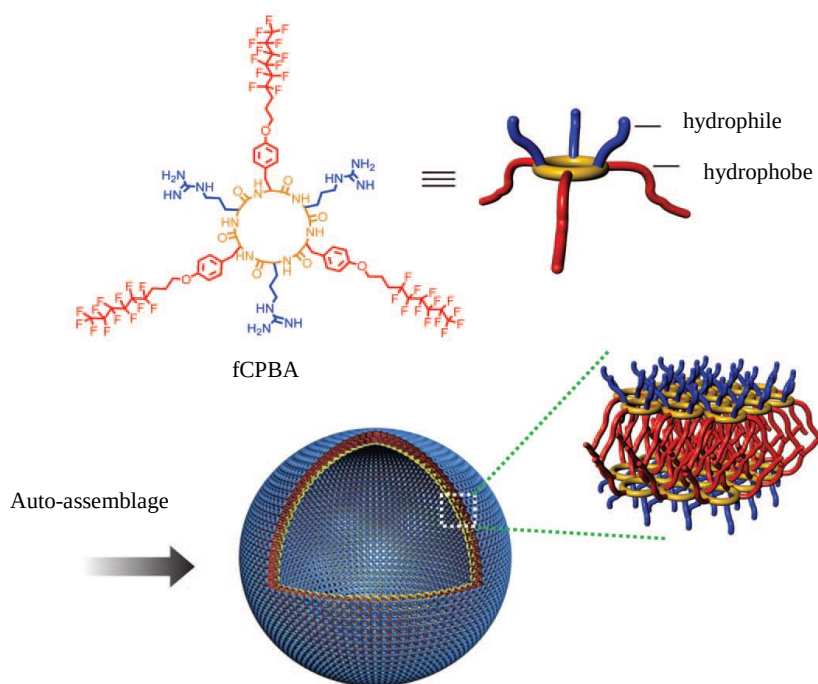


Figure 69. Structure de l'amphiphile et de la nanocapsule formée¹³⁵

1.3.2.2 Imagerie par résonance magnétique du ¹⁹F.

L'une des grandes applications des micelles perfluorées est l'imagerie *in vivo* par IRM (imagerie par résonance magnétique) du fluor (¹⁹F).

Les composés fluorés ont été étudiés de manière intensive (plusieurs centaines de publications) pour l'IRM du ¹⁹F, depuis la première image d'abdomen de rat publiée en 1985 par McFarland *et al.*¹³⁶ Des

¹³⁵Chung, E. K.; Lee, E.; Lim, Y.-B.; Lee, M. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 5305.

¹³⁶McFarland, E.; Koutcher, J. A.; Rosen, B. R.; Teicher, B.; Brady, T. J. *Comput.-Assisted Tomogr.* **1985**, 9, 8.

applications biologiques comme la mesure de la pression d'oxygène,¹³⁷ la mesure du pH,¹³⁸ ou l'étude du métabolisme de composés actifs¹³⁹ ont été développées.

En 2009, Peng *et al.*¹⁴⁰ furent les premiers à décrire la synthèse et les propriétés en IRM du ¹⁹F de copolymères à blocs (Figure 70A) partiellement fluorés capables de former des micelles dans l'eau (Figure 70B).

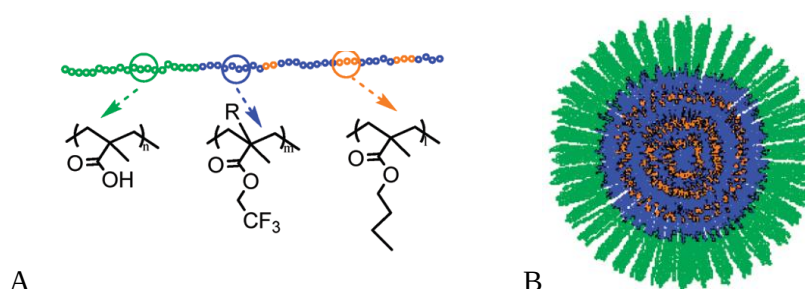


Figure 70. (A) Structure du copolymère synthétisé par Peng *et al.*¹⁴⁰ (B) Micelle formée par le copolymère.

Leurs travaux permirent de déterminer trois critères essentiels pour avoir un bon agent d'imagerie pour l'IRM du ¹⁹F :

- (i) une grande quantité de fluor
- (ii) un temps de relaxation T_1 court
- (iii) un temps de relaxation T_2 long

D'autres travaux sur des micelles de copolymères ont été menés, notamment par Pandey *et al.*¹⁴¹ qui utilisent un copolymère à base de polyéthylène glycol (Figure 71).

¹³⁷Zhao, D.; Constantinescu, A.; Jiang, L.; Hahn, E. W.; Mason, R. P. *Am. J. Clin. Oncol.***2001**, 24, 462.

¹³⁸Mehta, V. D.; Kulkarni, P. V.; Mason, R. P.; Constantinescu, A.; Antich, P. P. *Bioconjugate Chem.***1994**, 5, 257.

¹³⁹P. Bachert *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***1998**, 33, 1.

¹⁴⁰Peng, H.; Blakey, I.; Dargaville, B.; Rasoul, F.; Rose, S.; Whittaker A. K. *Biomacromolecules***2009**, 10, 374.

¹⁴¹Pandey, M. K.; Tyagi, R.; Yang, K.; Fisher, R. J.; Colton C. K.; Kumar, J.; Parmar, V. S.; Aiazian, E.; Watterson, A. C. *Polymer***2011**, 52, 4727.

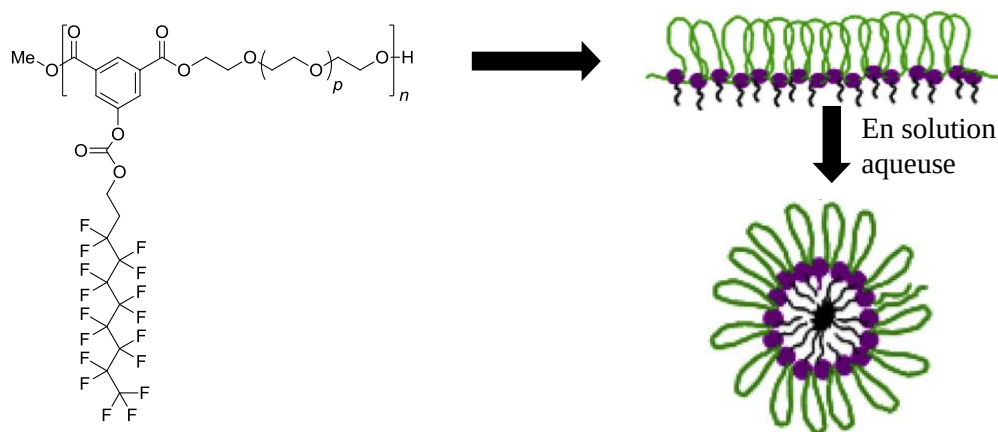


Figure 71. Structure du copolymère de Pandley *et al* et de l'auto-assemblage.

Dans cette étude les auteurs ont montré que le signal en RMN ^{19}F du groupement $-\text{CF}_3$ terminal avait un déplacement chimique différent en fonction de la structuration du copolymère soit sous forme de micelle, c'est-à-dire à une concentration supérieure à la CMC, soit sous la forme d'un amphiphile isolé à une concentration inférieure à la CMC. Cette observation avait déjà été faite par Iijima *et al.*¹⁴² en 1999 au cours de son étude sur les surfactants perfluorés.

1.3.3 L'encapsulation de nanoparticules avec des molécules perfluorées.

À notre connaissance, il y a très peu de travaux publiés sur la solubilisation de nanoparticules à l'aide de composés perfluorés (PFC). On dénombre quatre études principales, l'une portant sur des nanoparticules d'or¹⁴³ (i), deux portant sur les quantum dots^{144,145} (ii) et une troisième¹⁴⁶ (iii) plus ancienne qui fût la première à montrer qu'il était possible de faire un transfert de phase vers une phase perfluorée de diverses nanoparticules (or, CdSe,...) stabilisées par des ligands perfluorés.

(i) Nanoparticules d'or.

La préparation de nanoparticules d'or à l'aide d'un dérivé soufré amphiphile est décrite dans une étude publiée par Gentilini *et al.*¹⁴³ en 2008.

¹⁴²Iijimata, H.; Koyama, S.; Fujio, K.; Uzu, Y. *Bull.Chem. Soc. Jpn.***1999**, 72, 171.

¹⁴³Gentilini, C.; Evangelista, F.; Rudolf, P.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.***2008**, 130, 15678.

¹⁴⁴Lim, Y. T.; Cho, M. Y.; Kang, J.-H.; Noh, Y.-W.; Cho, J.-H.; Hong, K. S.; Chung, J. W.; Chung, B. H. *Biomaterials***2010**, 31, 4964.

¹⁴⁵Gorelikov, I.; Martin, A. L.; Seo, M.; Matsuura, N. *Langmuir***2011**, 27, 15024.

¹⁴⁶Voggu, R.; Biswas, K.; Govindaraj, A.; Rao, C. N. R. *J. Phys. Chem. B***2006**, 110, 20752.

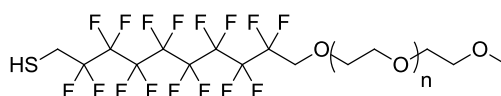


Figure 72. Structure de l'amphiphile utilisé dans les travaux de Gentilini *et al.*¹⁴³

Dans leurs travaux, les auteurs ont utilisé deux approches distinctes. La synthèse des nanoparticules directement avec le ligand perfluoré d'une part et d'autre part un échange de ligand avec le composé perfluoré. Le principal problème rencontré, fût la faible nucléophilie du thiol perfluoré dû à l'effet inductif attracteur des CF_2 . Pour pallier ce souci, les auteurs ont déprotoné le thiol et utilisé la forme thiolate afin d'augmenter la densité électronique sur l'atome de soufre.

Dans une étude complémentaire,¹⁴⁷ les auteurs ont caractérisé par une approche combinant simulation et expérimentation, des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche organique composée d'un mélange de ligands perfluorés et hydrogénés. Pour chaque type de ligand la partie hydrophile était composée de polyéthylène glycol. Ils ont démontré que quelle que soit la proportion de ligands perfluorés, même très faible ($\approx 4\%$)¹⁴⁷, il y avait ségrégation entre les ligands hydro- et perfluorocarbonés à la surface de la particule. Les ligands de perfluorés ont tendance à former soit des îlots soit des bandes. Dans certains cas extrêmes on peut avoir deux hémisphères distincts l'un comportant les ligands hydrogénés et l'autre les ligands perfluorés. La forme des domaines occupés par les ligands perfluorés dépend du ratio ligands -H/-F mais aussi de la taille des nanoparticules d'or et de la longueur des chaînes perfluorées ou hydrogénées.

(ii) Quantum dots (en nano-goutte)

Les deux études réalisées sur des quantum dots développent une stratégie identique de formation de nanogouttes de PFC dans lesquelles se trouvent des QD (Figure 73). L'une utilisant des QD de type InGaP/ZnS¹⁴⁴ et l'autre des QD de type CdSe/ZnS avec une coque de silice¹⁴⁵.

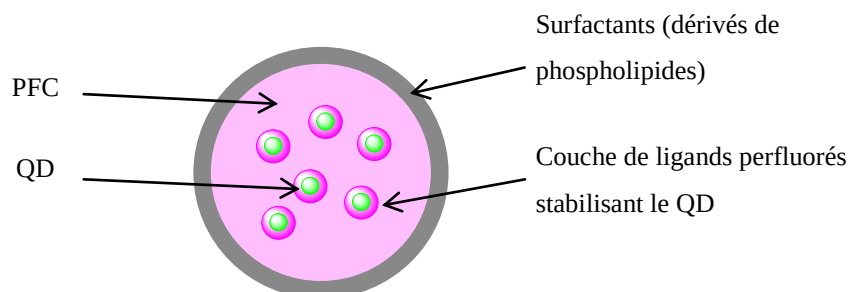


Figure 73. Architecture du système de nanogouttes de PFC contenant des QD.

¹⁴⁷Posocco, P.; Gentilini, C.; Bidoggia, S.; Pace, A.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Pasquato, L. *ACS Nano***2012**, 6, 7243.

L'idée principale développée dans cette stratégie est la combinaison des propriétés *in vivo* des gouttes de PFC (vu précédemment) ainsi que leur application pour l'IRM ^{19}F avec les propriétés optiques des QD, notamment ceux émettant dans le proche infra-rouge. Des sondes bimodales, combinant résonance magnétique et émission optique, ayant un intérêt grandissant dans le domaine de l'imagerie¹⁴⁴, sont ainsi obtenues.

(iii) Quantum dots (phase perfluorée)

Une étude plus ancienne de Voggu *et al.*¹⁴⁶ a montré qu'il était possible de solubiliser diverses nanoparticules comme des nanotubes de carbone, des nanoparticules d'or ou encore des QD de type CdSe dans un solvant perfluoré. Dans ce cas il ne s'agit pas de nanogouttes comme en (ii) mais d'objets uniques en suspension dans le solvant. Dans le cas qui nous intéresse concernant CdSe, les auteurs ont ajouté lors de la synthèse de la nanoparticule de l'heptadecafluoro-1-décane-thiol (HDFD), puis après formation de nanocristaux ils les ont extraits dans une phase perfluorée. Ils ont observé un déplacement de la longueur d'onde d'émission de l'exciton vers le rouge qui est dû à la différence importante de l'indice de réfraction et de la polarité des solvants perfluorés avec leurs homologues alcanes.

2 Stratégie mise en œuvre.

Nous voulions dans un premier temps faire une preuve de concept. L'idée étant d'accéder rapidement à un QD encapsulé dans une micelle d'amphiphiles perfluorés afin de faire les premiers tests de stabilité. Dans cette optique nous avons préféré utiliser une approche simple ne nécessitant pas de synthèse de ligands complexes.

2.1 Stratégie d'encapsulation des QD.

Nous avons opté pour une stratégie de bicouche où nous avons besoin d'un ligand perfluoré monofonctionnel facile d'accès, voire commercial (pour la couche primaire), et d'un amphiphile perfluoré (non fonctionnalisé dans un premier temps), pour la couche secondaire. Ainsi nous procéderions à un premier échange de ligand par passage d'une phase organique à une phase perfluorée, puis à une encapsulation par l'amphiphile perfluoré durant un second transfert de la phase perfluorée vers la phase aqueuse. La Figure 74 ci-dessous résume notre stratégie.

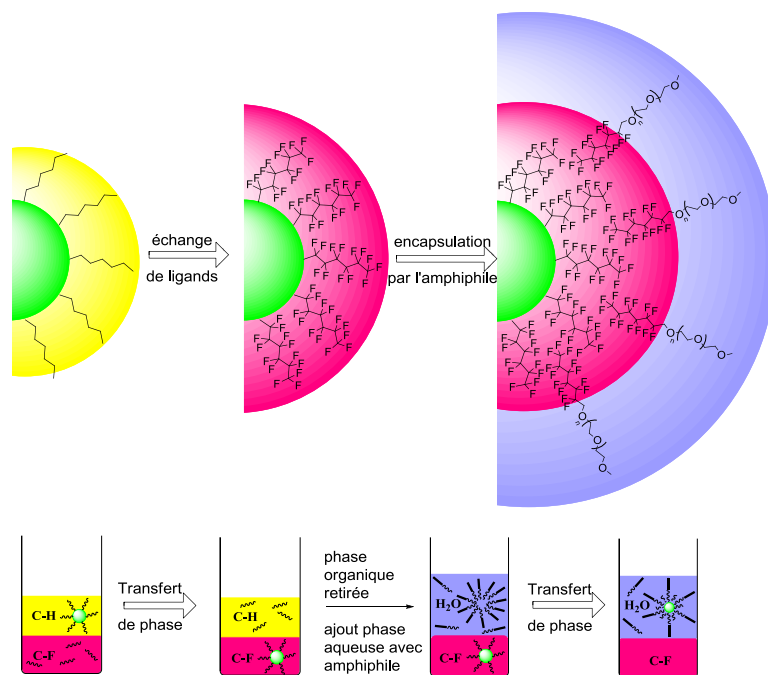


Figure 74. Stratégie mise en œuvre pour encapsuler les QD à l'aide d'une micelle perfluorée.

L'encapsulation des QD ainsi que leur solubilisation dans l'eau comporte plusieurs étapes de transfert de phase qui sont basées sur le principe mis au point par Curran avec une étiquette perfluorée, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.1.4.

Une première étape consiste à faire l'échange des ligands hydrogénés issus de la synthèse des QD par les ligands perfluorés, cet échange s'accompagnant d'un transfert de phase (organique $\rightarrow$ perfluorée). Pour que ce passage soit possible il faut que les ligands perfluorés soient présents en excès mais surtout que leurs fonctions d'ancrage au QD aient une affinité plus grande pour la surface de ce dernier que les fonctions des ligands hydrogénés. Une fois les QD passés en phase fluorée, la phase organique, contenant les ligands hydrogénés ayant été échangés, est éliminée. L'excès de ligands perfluorés non liés au QD est retiré (par précipitation) puis les QD sont transférés en la phase aqueuse contenant les amphiphiles perfluorés à une concentration supérieure à la CMC. Pour finir, les QD présents en phase aqueuse devront être séparés de l'excès d'amphiphiles perfluorés par précipitation.

2.2 Stratégie de synthèse des ligands.

En tenant compte du critère d'affinité mais aussi de la facilité d'accès à la molécule nous avons choisi comme ligands perfluorés primaires les ligands dont les structures sont présentées en Figure 75.

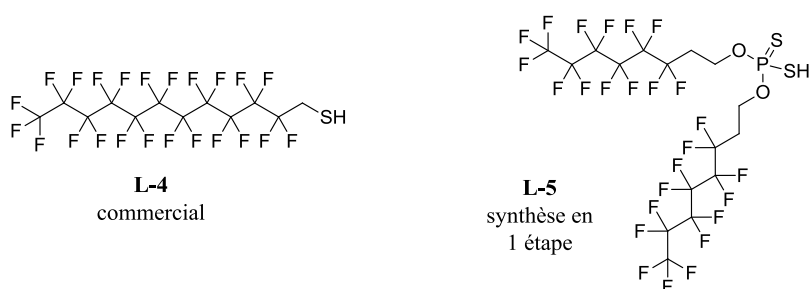


Figure 75. Structure des ligands perfluorés utilisés pour l'échange primaire de ligands.

Les motifs soufrés étant connus dans la chimie des nanocristaux fluorescents pour être de bon complexants, cette affinité particulière devrait permettre un échange de ligands et un transfert de phase efficaces. De plus le ligand **L-4** est commercial et le ligand **L-5** pourrait être obtenu par réaction d'un alcool perfluoré avec du pentasulfure de diphosphore.

La seconde étape d'encapsulation des QD nécessite la synthèse d'un amphiphile perfluoré. Nous avons choisi différents amphiphiles dans lesquels la partie perfluorée est couplée un motif polyéthylène glycol par l'intermédiaire d'un lien éther (Figure 76, **L-6**) ou d'un lien amide (Figure 76, **L-7** et **L-8**). Le composé **L-7** a été synthétisé, en plus de **L-8**, afin de disposer d'un motif fonctionnalisable sous la forme d'une fonction azoture. Cette fonction pourra, par la suite, servir de point d'ancrage par chimie click à divers composés d'intérêt pour un ciblage biologique.

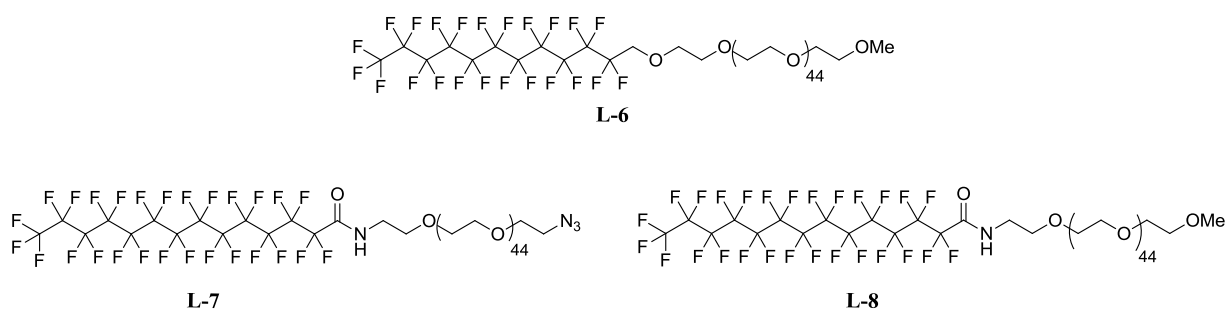


Figure 76. Structure des amphiphiles utilisés pour l'encapsulation micellaire des QD.

3 Préparation et caractérisation des nano-objets.

3.1 Préparation des ligands.

3.1.1 Synthèse du ligand L-5.

Le ligand **L-5** a été synthétisé par substitution nucléophile de 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-perfluorooctan-1-ol sur du pentasulfure de diphosphore (Figure 77) dans du toluène préalablement séché sur sodium. Durant la réaction un flux d'azote est maintenu afin d'évacuer le H₂S formé au cours de la réaction, ce dernier est neutralisé en sortie par passage dans une solution de soude concentrée. Le P₂S₅ qui n'a pas réagi est éliminé par filtration et le composé **L-5** est extrait dans un solvant perfluoré (perfluoro-1,3-diméthylcyclohexane).

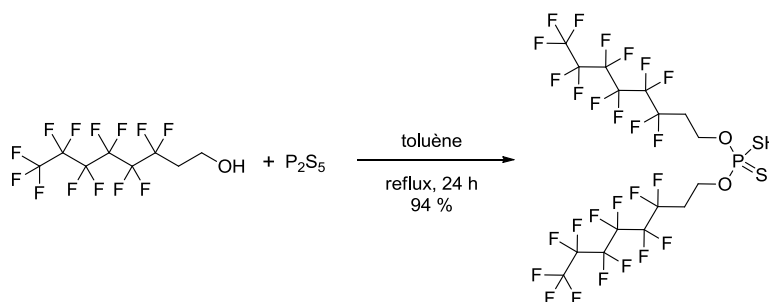


Figure 77. Synthèse du ligand L-5.

3.1.2 Synthèse des amphiphiles L-6 à L-8.

L'amphiphile **L-6** a été synthétisé en deux étapes à partir de l'alcool 1*H*, 1*H*-perfluorotetradécan-1-ol et de PEG₂₀₀₀ monométhyl éther dont la fonction hydroxyle a été préalablement activée sous forme mésylate (Figure 78). La réaction de couplage est difficile et doit être chauffée à 70 °C pendant 48 h en présence d'un excès de l'alcool perfluoré. Le rendement moyen obtenu à cette étape peut être expliqué par la faible nucléophilie de l'alcool due aux effets inductifs des fluors. De plus, l'encombrement stérique du motif PEG complique également les choses. Le composé est ensuite purifié sur un cake de silice puis précipité dans l'éther.

Les composés **L-7** et **L-8** ont été synthétisés à partir de perfluorotetradécanoate de méthyle et de PEG mono amine (Figure 79 et Figure 80). La présence des fluors active suffisamment l'ester pour permettre un couplage direct avec l'amine. Dans un premier temps, il nous a fallu synthétiser les deux motifs PEG mono amine nécessaires pour les étapes de couplage. Leur synthèse a été réalisée selon un schéma classique, par activation de l'alcool à l'aide d'un groupement tosyloxy, suivi d'une substitution par un azoture qui a ensuite fait l'objet d'une réduction de Staudinger. On peut noter que le rendement de cette dernière étape est beaucoup plus faible dans le cas de **L-7**. Cela est dû à la réduction non désirée du second azoture.

Page | 130

3.2 Caractérisation des micelles formées.

3.2.1 Formation des micelles perfluorées.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer la CMC des amphiphiles synthétisés. De par la nature perfluorée des composés nous avons rencontré quelques difficultés. La méthode classique par suivi de la variation de fluorescence d'un chromophore organique en fonction de la concentration en amphiphile nous paraissait non adaptée, du fait du caractère lipophile des chaînes perfluorées. Cette supposition a été dans un premier temps confirmée par plusieurs publications utilisant des chromophores modifiés par greffage d'une étiquette perfluorée pour réaliser des études de CMC.^{148,149} Cependant l'utilisation de ces chromophores nécessitait leur synthèse préalable. Nous avons donc préféré trouver une méthode plus rapide. Une technique utilisant la RMN du fluor,¹⁵⁰ plus précisément la modification du déplacement chimique du $-CF_3$ terminal de l'amphiphile suivant qu'il soit sous forme de micelle ou à l'état libre, nous a semblé intéressante. Malheureusement les premiers essais ne furent pas très concluants, la CMC de notre amphiphile étant basse nous n'avons pas réussi à obtenir un signal exploitable. Nous avons donc voulu utiliser la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour déterminer une première approximation de la valeur de CMC par disparition du signal de la micelle en abaissant progressivement la concentration du milieu. La CMC de **L-6** a pu être déterminée en traçant l'intensité du pic correspondant à la micelle (en coups par seconde) en fonction du logarithme de la concentration en amphiphile en $g.L^{-1}$ (Figure 81). La valeur de la CMC de **L-6** est aux alentours de 65 mg.L^{-1} soit $24\text{ }\mu\text{M}$. Ce résultat semble être en accord avec la littérature.¹⁵¹

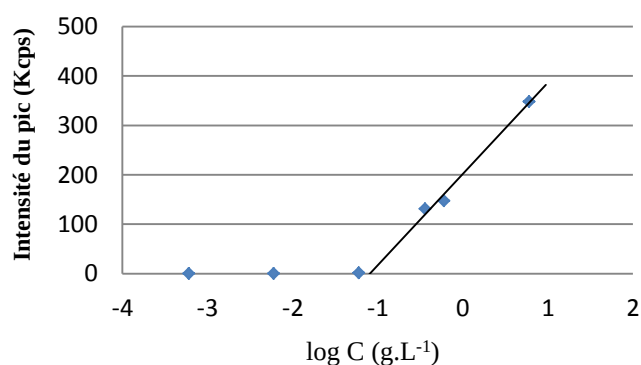


Figure 81. Détermination de la CMC de L-6 en traçant l'intensité du pic de la micelle en DLS en fonction du logarithme de la concentration en amphiphile.

¹⁴⁸Stähler, K.; Selb, J.; Candau, F. *Langmuir***1999**, 15, 7565.

¹⁴⁹Stähler, K.; Selb, J.; Barthelémy, P.; Pucci, B.; Candau, F. *Langmuir***1998**, 14, 4765.

¹⁵⁰Huc, I.; Oda, R. *Chem. Commun.***1999**, 2025.

¹⁵¹Kunleda, H.; Shinoda, K. *J. Phys. Chem.***1976**, 80, 2468.

Nous avons également déterminé la taille des micelles perfluorées formées par l'amphiphile **L-6**, **L-7** et **L-8** (Figure 82) par DLS. La mesure a été réalisée à une concentration d'environ 1 mM (3 g.L^{-1}) pour les trois amphiphiles. Nous avons obtenu des diamètres de 12,5 nm, 13,2 nm et 11,5 nm pour **L-6**, **L-7** et **L-8** respectivement.

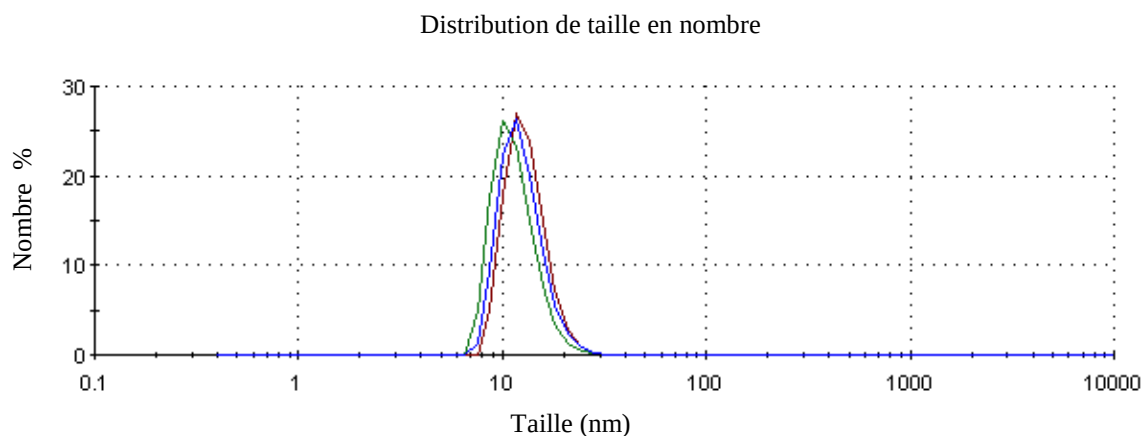


Figure 82. Distribution en nombre de la taille mesurée par DLS pour (—) L-6, (—) L-7, (—) L-8.

Les diamètres hydrodynamiques des micelles formées par les trois amphiphiles sont très proches. La micelle de l'amphiphile **L-7** semble légèrement plus grande mais cela peut être dû aux charges présentes sur les groupements azotures.

Des mesures complémentaires de diffraction des rayons-X aux petits angles (SAXS) sont en cours de réalisation. Nous espérons qu'elles pourront apporter des précisions sur la taille et la forme des micelles.

3.2.2 Encapsulation des QD.

Afin d'encapsuler les QD de type CdSe/CdS/ZnS dans une bicouche de composés perfluorés nous avons procédé par transfert de phase comme décrit en 2.1. Dans un premier temps les QD doivent être transférés de la phase organique vers la phase perfluorée. De nombreux essais ont été réalisés avec le thiol **L-4** mais sans succès. Malgré des temps d'échange de plus de 24 h, l'utilisation de divers solvants organiques et l'ajout de base pour déprotoner le thiol, nous ne sommes jamais parvenus à avoir un transfert de phase correct. Cela est sûrement dû à une diminution de la nucléophilie du thiol par l'effet inductif attracteur des CF_2 comme suggéré précédemment par Gentilini *et al.*¹⁴³. Par contre,

les essais de transfert de phase réalisés à l'aide du dithiophosphate **L-5** ont été plus fructueux. Une simple agitation de quelques minutes en présence du ligand **L-5** a permis un transfert de phase efficace du nanocrystal de la phase organique vers la phase perfluorée.

Une fois les QD passés en phase perfluorée, la phase organique a été retirée et trois lavages avec du trifluoroéthanol (TFE) ont été réalisés afin d'enlever l'excès de ligands **L-4** non liés au QD. Ensuite, le second transfert de phase a été réalisé entre le solvant perfluoré et la phase aqueuse contenant un des amphiphiles perfluoré **L-6** à **L-8**. Cependant ce transfert de phase a conduit à une émulsion très stable formant une sorte de gel entre les deux phases. Afin d'optimiser le passage de la phase perfluorée à la phase aqueuse nous avons opté pour une activation à la sonde à ultrasons. Le volume de la phase perfluorée contenant les QD a été réduit à une centaine de microlitres avant d'être mis au contact de la phase aqueuse contenant les amphiphiles perfluorés **L-6** à **L-8**. L'énergie dispensée par la sonde à ultrasons permet également d'évaporer l'hexane perfluoré, ne laissant que la phase aqueuse dans laquelle sont passés les QD encapsulés dans une bicouche de ligands perfluorés (Figure 83). Une purification par ultracentrifugation sur gradient de sucrose a permis, pour finir, de séparer les micelles vides des micelles contenant un QD.

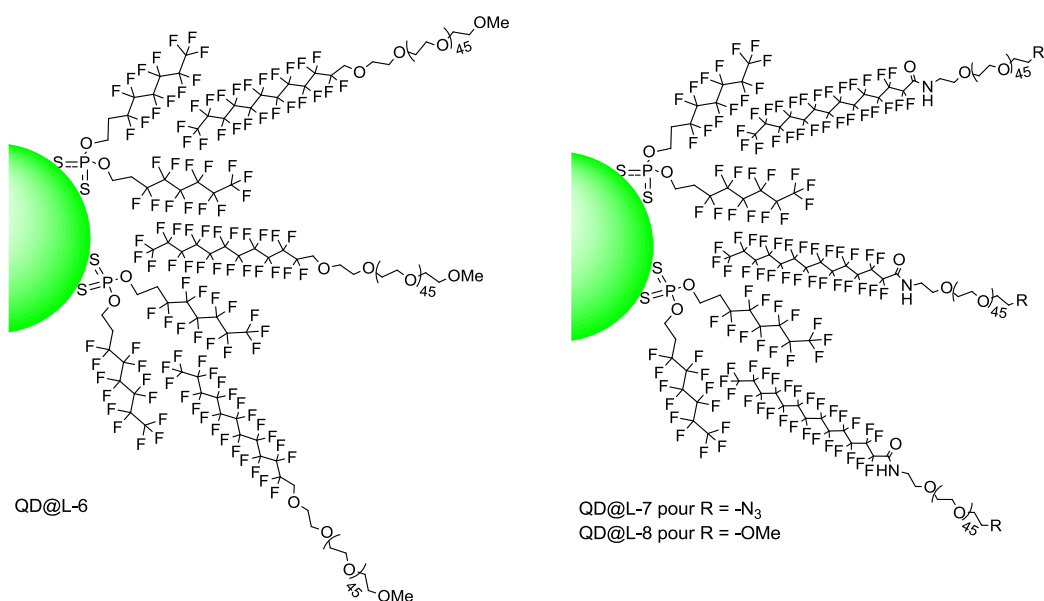


Figure 83. Schéma des structures des QD@L-6, QD@L-7 et QD@L-8.

La taille de ces QD encapsulés a été déterminée par DLS sur les lots purifiés par ultracentrifugation et indique un diamètre d'environ 17 nm avec un QD de départ dont le diamètre est de 6,5 nm. Des mesures complémentaires de diffraction des rayons-X aux petits angles (SAXS) sont également en cours de réalisation. Nous espérons qu'elles pourront apporter des précisions sur la taille et la forme des objets.

Après avoir formé et caractérisé nos objets, nous allons maintenant nous intéresser à l'étude de leur stabilité colloïdale en phase aqueuse à divers conditions de pH et de salinité.

4 Études de stabilité des QD formés

4.1 Introduction.

Dans cette partie, nous avons étudié la stabilité des QD encapsulé par les ligands perfluorés dans différentes conditions « dures » (pH, salinité, milieu oxydant, présence de ligands compétiteurs), entraînant classiquement une perte de stabilité colloïdale des nanoparticules. Plusieurs lots de QD de type CdSe/CdS/ZnS (ayant un maximum d'émission à 600 nm) solubles en milieu aqueux ont été préparés selon la stratégie développée précédemment. Nous avons ainsi obtenu trois lots QD@L-6, QD@L-7 et QD@L-8, tous les trois composés de QD portant une couche primaire de dithiophosphates perfluorés **L-5** et une couche secondaire d'amphiphiles perfluorés (**L-6**, **L-7** ou **L-8**).

Nous avons dans un premier temps étudié la stabilité de deux lots de QD (QD@L-7 et QD@L-8) en parallèle des expériences de stabilité des QD@poly réalisés pour le chapitre précédant dans les différents milieux et avec comme référence QD@DSPE. Nous ne disposions pas encore de QD@L-6 à ce moment-là. Nous avons toutefois procédé à une étude de stabilité de QD@L-6 ultérieurement dans des conditions similaires avec la même référence (QD@DSPE). Les résultats obtenus pour QD@L-6 sont identiques à ceux obtenus pour QD@L-7 et QD@L-8, c'est pourquoi dans un souci de clarté de notre discours nous ne présenterons les résultats obtenus pour QD@L-6 que lorsqu'il existe une différence de comportement marquée avec QD@L-7 et QD@L-8.

4.2 Protocole de mesure.

Le protocole de mesure est identique à celui utilisé précédemment, utilisant comme référence QD@DSPE.

Rappel

Nous avons utilisé comme élément de comparaison un amphiphile connu dans la littérature pour sa stabilité, le 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] ou DSPE-PEG (Figure R1).

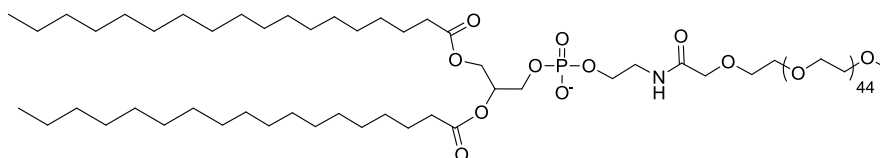
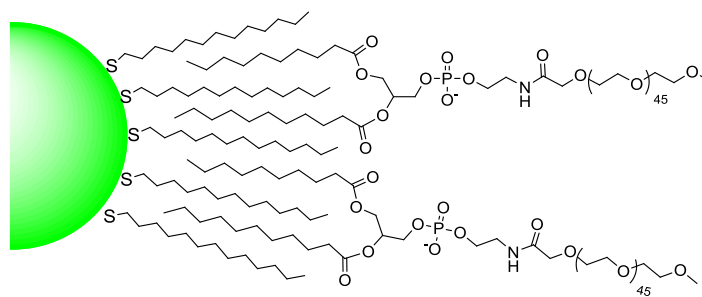


Figure R1. Structure de DSPE-PEG

Afin d'avoir une comparaison la plus pertinente possible, nous avons préparé un lot de QD recouverts d'octadécane-thiol et utilisé l'amphiphile DSPE-PEG pour réaliser, l'encapsulation micellaire et le passage en phase aqueuse. La taille du PEG incorporé à l'amphiphile DSPE-PEG est la même que pour les amphiphiles perfluorés (2000 Da). Ces particules de référence seront notées QD@DSPE (Figure R2).



FigureR2. Schéma de la structure de QD@DSPE.

4.2.1 Méthode de mesure.

4.2.1.1 Spectroscopie de fluorescence.

Comme dans le chapitre précédent, nous avons suivi l'évolution de la fluorescence tout en vérifiant que l'absorbance, qui reflète la concentration des QD, ne diminuait pas de manière significative. Nos particules étant destinées à l'imagerie, la stabilité de leur émission de fluorescence dans divers milieux est primordiale. Ainsi, nous avons mesuré le spectre d'émission des QD entre 500 et 700 nm après excitation à 400 nm, dans diverses conditions de salinité et à divers pH. La valeur du maximum du pic d'émission a été relevée et son évolution a été suivie au cours du temps.

4.2.1.2 Préparation des solutions.

Des aliquotes de chacun des lots de QD (20 μ L à 1,2 μ M pour QD@DSPE et 40 μ L pour QD@L-7 à environ 4,5 μ M et QD@L-8 à environ 3,5 μ M) ont été diluées dans les diverses solutions utilisées lors de l'étude de stabilité (variation du pH, du potentiel redox et de la salinité) en veillant à rester dans une même gamme de concentration en QD (entre 3 et 8 nM) afin de permettre une comparaison rigoureuse. La fluorescence mesurée quelques minutes après la préparation des solutions de QD a été prise comme référence. Les mesures de fluorescence réalisées par la suite ont été normées pour chaque lot par rapport à cette valeur initiale.

4.3 Résultats.

4.3.1 Stabilité vis-à-vis du pH.

Rappel

Nous avons préparé cinq solutions (pH 4, pH 6, pH 8, pH 9, et pH 12) à partir d'un tampon phosphate salin, PBS (phosphates 0,01 M ; NaCl 0,138 M ; KCl 0,0027 M ; pH 7,4, à 25 °C).

La fluorescence des différentes solutions a ensuite été mesurée régulièrement sur des durées pouvant aller jusqu'à une quinzaine de jours et les différentes mesures ont été rapportées à la valeur initiale.

En étudiant les courbes obtenues, représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps à divers pH (Figure 84), on remarque dès le départ une différence d'évolution de l'intensité de fluorescence entre la référence (décroissance progressive) et les lots QD@L-7 et QD@L-8 qui présentent une chute brutale de la fluorescence à tous les pH, excepté à pH 12 dont nous discuterons par la suite. Cette chute brutale semble être suivie d'une phase plus stable durant laquelle l'évolution de l'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible, formant un palier à une valeur de fluorescence résiduelle (par rapport à la fluorescence initiale) de 20 % à pH 4, 30 % à pH 6 et environ 50 % à pH 8 et 9 (Figure 84).

À court terme, la fluorescence de QD@DSPE semble mieux résister aux variations de pH que les QD encapsulé par des ligands perfluorés. Toutefois, il faut noter qu'au bout de 12 jours l'intensité de la fluorescence est équivalente pour ces trois objets aux pH 4 à 9.

Concernant la solution à pH 12 (Figure 84), on note une augmentation de la fluorescence pour les lots QD@L-7 et QD@L-8 par rapport à la valeur de départ. Cette augmentation n'a pas lieu pour la

référence QD@DSPE. Le phénomène semble être propre aux ligands perfluorés, ce phénomène de *photobrightening* a déjà été observé dans la littérature et peut avoir plusieurs causes environnementales, comme par exemple, la stabilisation des charges positives à la surface des nanocristaux par les anions hydroxides diminuant ainsi les phénomènes de dissipation non-radiative de l'énergie de l'exciton.¹⁵² Une question se pose cependant : pourquoi les lots QD@L-7 et QD@L-8 sont-ils les seuls affectés et pas la référence QD@DSPE? Des investigations complémentaires devront être menées pour tenter de comprendre l'origine du phénomène.

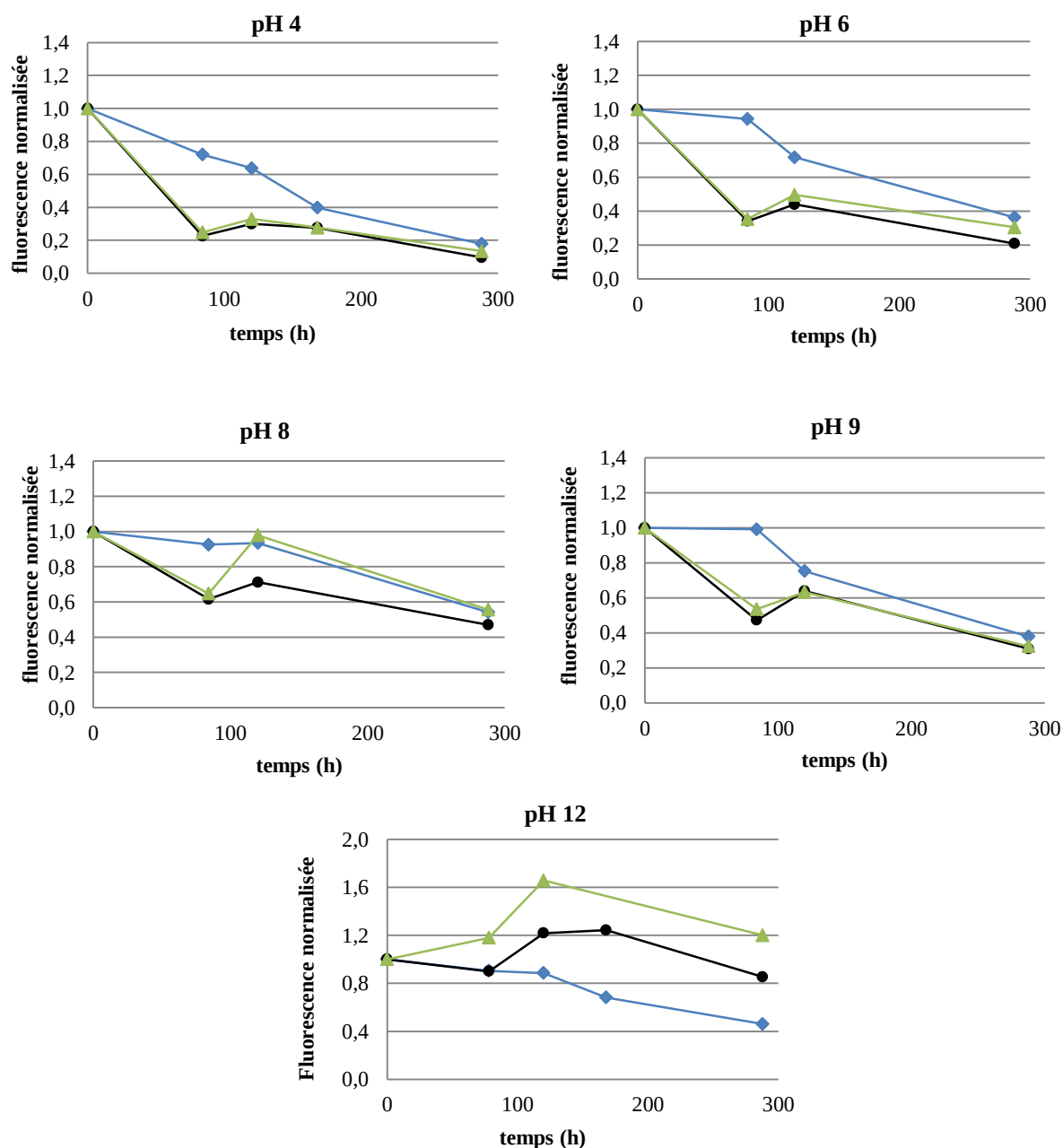


Figure 84. Évolution de la fluorescence de QD@DSPE (♦), QD@L-7 (●) et QD@L-8 (▲) en fonction du temps à différents pH.

¹⁵²Lee, S. F.; Osborne, M. A. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2174.

Nous avons également mesuré l'intensité de fluorescence de nos échantillons à des temps beaucoup plus longs afin de nous assurer de la persistance ou non du signal. Nous avons donc réalisé une mesure après 5 mois d'incubation des QD dans les différentes solutions et, à notre grande surprise, les lots QD@L-7 et QD@L-8 émettaient encore de la fluorescence à toutes les valeurs de pH (de 4 à 12) tandis que le lot de référence QD@DSPE n'était plus que très faiblement fluorescent (Figure 85).

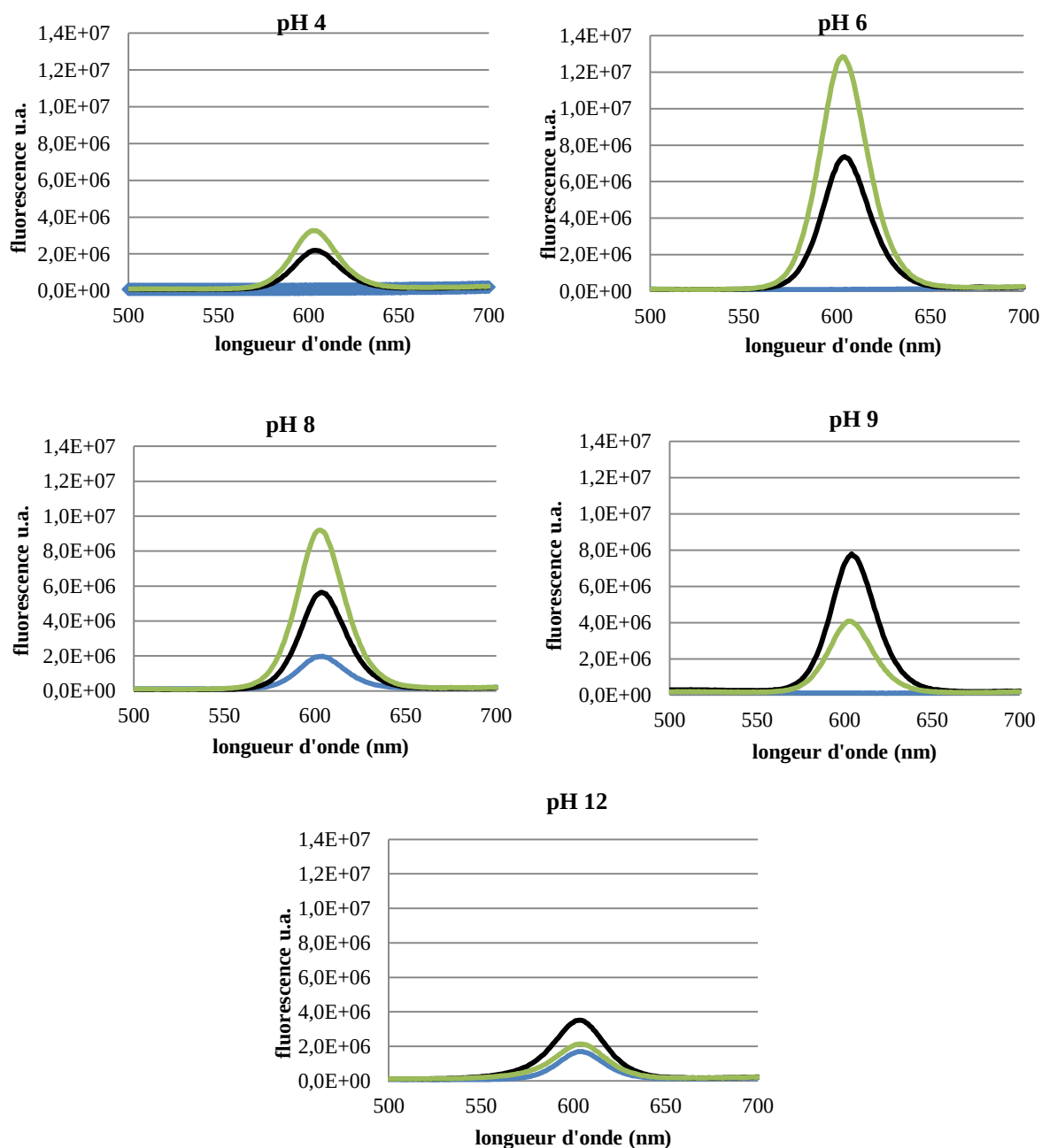


Figure 85.Évolution de la fluorescence des QD@DSPE (—), QD@L-7 (—) et QD@L-8 (—) après 5 mois à pH 4, pH 6, pH 8, pH 9 et pH 12.

Nous avons volontairement utilisé la même échelle pour l'axe des ordonnées pour chaque valeur de pH de façon à pouvoir comparer les résultats aisément. Pour fixer les idées, la valeur de l'intensité de fluorescence résiduelle, après 5 mois, oscille entre 5 % (par rapport à la fluorescence initiale) pour QD@L-8 à pH 4 (Figure 85) et 17 % à pH 6. Ainsi, même à des pH très acides (pH 4) les micelles perfluorées semblent conférer une stabilité à long terme aux QD. La fluorescence résiduelle de la référence QD@DSPE est quasiment nulle quelle que soit la valeur du pH.

Il faut noter qu'en milieu basique il y a une perte significative de l'intensité de fluorescence entre pH 8-9 et 12 pour QD@L-7 et QD@L-8. Les intensités de fluorescence résiduelles (par rapport à la fluorescence de départ) après 5 mois sont données dans le Tableau 10.

Tableau 10. Ratios de fluorescence de QD@L-7 et QD@L-8 aux pH 6 à 12

	pH 6	pH 8	pH 9	pH 12
QD@L-7	11 %	10 %	14 %	4 %
QD@L-8	17 %	17 %	10 %	6 %

Ce qui est plus troublant c'est que dans ce cas précis, le comportement du lot QD@L-6, dont l'évolution de la fluorescence était jusque-là identique à celle de QD@L-7 et QD@L-8 (cf. 4.1.), ne présente pas cette diminution de fluorescence entre aux pH alcalins. Rappelons que l'amphiphile **L-6** possède un lien éther entre la partie perfluorée et le motif PEG, tandis que pour **L-7** et **L-8** ce lien est un amide.

Cette perte de stabilité en milieu fortement alcalin pourrait avoir pour origine une hydrolyse lente de la liaison amide entre le PEG et la chaîne perfluorée (QD@L-8 et QD@L-7). Cette hydrolyse entraîne une perte progressive des ligands à la surface des QD et agrégation de ces derniers. Cette agrégation semble être confirmée par une chute importante de l'absorbance de la solution QD@L-8 (Figure 86) indiquant une diminution de la concentration en QD suspendus.

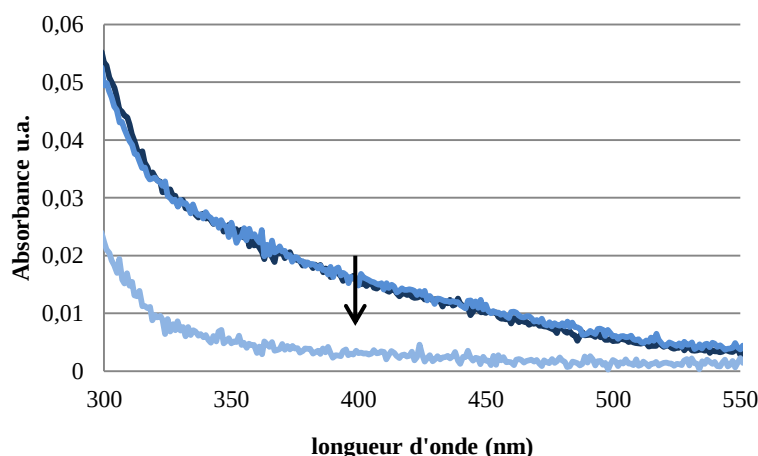


Figure 86. Absorbance des QD@L-8 après 120 h (—), 288 h (—) et 3936 h (—) à pH 12.

En conclusion, nous avons pu montrer que les QD@L-7 et QD@L-8 présentent une perte de fluorescence à court terme entre pH 4 et 9 plus prononcée que la référence QD@DSPE. Cependant cette perte de fluorescence finit par se stabiliser pour les QD encapsulés dans des amphiphiles perfluorés alors que la fluorescence de la référence continue de décroître. Il en résulte qu'à long terme (5 mois) la fluorescence résiduelle des QD@L-7 et QD@L-8 est supérieure à celle de la référence QD@DSPE, qui ne fluoresce quasiment plus. Finalement, le comportement des nanocristaux QD@L-7 et QD@L-8 à pH alcalin semble plus prometteur que celui de la référence puisque nous avons une meilleure préservation globale des propriétés de fluorescence à pH 12.

4.3.2 Stabilité vis-à-vis de la salinité.

Nous avons également voulu tester la stabilité des divers lots de QD en les soumettant à une forte concentration en sels. Nous avons pour cela préparé une solution à 1 M de NaCl et procédé suivant la méthode décrite précédemment (4.2.2). L'évolution de la fluorescence (Figure 87) est donnée avec une échelle de temps logarithmique pour une lecture plus aisée.

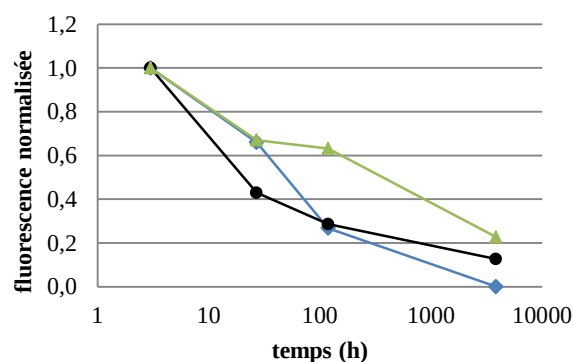


Figure 87. Fluorescence des QD@DSPE (◆), QD@L-7 (●) et QD@L-8 (▲) au cours du temps dans une solution de NaCl 1 M.

Après un peu plus de 24 h les lots QD@DSPE et QD@L-8 présentent une intensité de fluorescence correspondant à 67 % de leur fluorescence de départ, tandis qu'elle n'est que de 43 % pour QD@L-7.

Aux temps plus longs (> 100 h), il semblerait que la micelle de référence confère moins de stabilité en milieu salin que les lots QD@L-7 et QD@L-8 dont la fluorescence résiduelle après 5 mois correspond respectivement à 13 et 23 % de la fluorescence de départ, tandis qu'elle n'est que de 0,1 % pour QD@DSPE.

4.3.3 Stabilité en présence de ligands compétiteurs.**Rappel**

Pour réaliser ces tests, un volume de chaque lot de QD ($20\mu\text{L}$ à $1,2\mu\text{M}$ pour QD@DSPE et $40\mu\text{L}$ pour QD@L-7 à environ $4,5\mu\text{M}$ et $40\mu\text{L}$ pour QD@L-8 à environ $3,5\mu\text{M}$) a été ajouté à 2 mL d'une solution de glutathion à $0,1\text{ M}$.

L'évolution de la fluorescence (Figure 57) nous indique à nouveau une brusque chute de l'intensité de fluorescence pour les lots QD@L-7 et QD@L-8. En effet, après environ 24 h, la fluorescence de ces deux lots se situe entre 10 et 17 % de la fluorescence initiale. Une légère augmentation se produit ensuite pour QD@L-7 et QD@L-8, amenant les valeurs normalisées de fluorescence à 27 et 19 %, respectivement au bout de 48 h. Puis la fluorescence semble se stabiliser à cette valeur. La décroissance de la référence QD@DSPE obéit par contre à une diminution linéaire avec une perte de 0.6 % de fluorescence par heure.

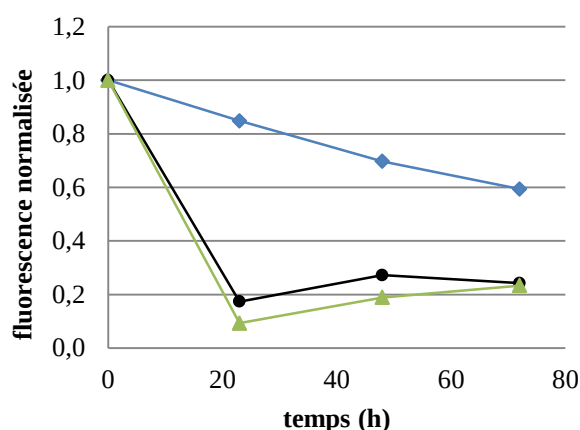


Figure 88. Évolution de la fluorescence des QD@DSPE (♦), QD@L-7 (●) et QD@L-8 (▲) au cours du temps dans une solution de glutathion à $0,1\text{ M}$.

4.3.4 Stabilité en milieu oxydant.**Rappel**

Pour tester la stabilité vis-à-vis d'un milieu oxydant nous avons préparé une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration d'environ $1\ \mu M$, ce qui est 10 à 100 fois supérieur à la concentration intracellulaire (estimée entre 10^{-7} et $10^{-8}\ M$).¹⁵³

L'évolution de la fluorescence (Figure 89) nous indique à nouveau une brusque chute de la fluorescence pour les lots QD@L-7 et QD@L-8, la fluorescence atteignant, au bout de 24 h, environ 10 % de sa valeur initiale pour ces deux lots. La fluorescence demeure ensuite stable sur plusieurs jours, voire plusieurs mois pour QD@L-7 et QD@L-8. Pour ces deux lots, la fluorescence résiduelle au bout de 5 mois (Figure 89) est aux alentours de 7 % alors que la fluorescence du lot QD@DSPE est devenue négligeable. Concernant le lot QD@DSPE, la diminution de fluorescence durant les premières 24 h est d'environ 1,7 %/h (contre environ 3,7 %/h pour les autres lots) mais elle s'accélère ensuite, si bien que la fluorescence chute à 7 % au bout de 312 h pour finir à 0,5 % au bout de 5 mois.

Tout comme pour les conditions précédentes, l'intensité de fluorescence chute au départ pour les QD stabilisés par des ligands perfluorés mais elle finit par se stabiliser à une valeur minimale, de telle sorte qu'après 5 mois l'intensité de fluorescence résiduelle pour QD@L-7 et QD@L-8 est supérieure à celle de la référence QD@DSPE. Dans le cas précis du milieu oxydant, la stabilité accrue des QD encapsulés par des composés perfluorés n'est vraisemblablement pas due uniquement aux interactions entre composés perfluorés mais également à la fonction d'ancrage qui est un dithiophosphate et non un thiol comme pour QD@DSPE. Les thiols ont tendance à s'oxyder facilement pour former des ponts disulfures déstabilisant ainsi la couche de ligands de surface, ce qui n'est pas le cas des dithiophosphates.

¹⁵³Antunes, F.; Cadenas, E. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 30, 1008.

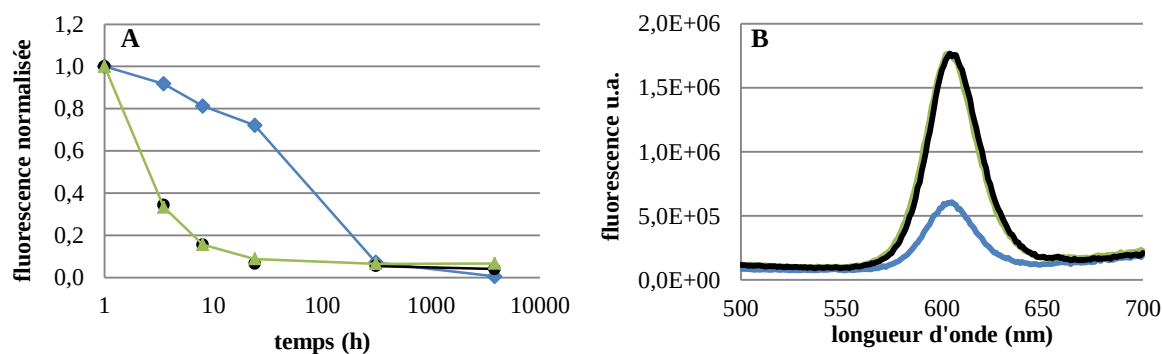


Figure 89. Evolution de la fluorescence de (♦) QD@DSPE, (●) QD@L-7 et (▲) QD@L-8 en fonction du temps dans une solution de H_2O_2 1 μM .

4.4 Conclusion.

Nous avons pu montrer que l'encapsulation de QD par des micelles perfluorées permettait de préserver la fluorescence sur le long terme (5 mois), malgré une chute de fluorescence observée dans les premiers temps de l'incubation, supérieure à celle des amphiphiles DSPE et ce dans tous les milieux testés. Il faut toutefois veiller à ne pas tirer de conclusions trop hâtives concernant la stabilité des interactions entre composés hydrogénés et perfluorés, étant donné la nature différente des ligands à la surface de la nanoparticule (couche primaire) entre QD@DSPE et QD@L-6, QD@L-7 ou QD@L-8.

Nous avons produit au cours de ce travail des nanocristaux encapsulés dans une phase micellaire fluorée qui sont solubles dans l'eau. Nous avons donc, en parallèle des études de stabilité décrites ci-dessus, évalué cette nouvelle formulation de QD *in vivo* dans une expérience d'imagerie de fluorescence chez la souris.

5 Étude de QD@L-6 *in vivo*

5.1 Préparation des QD émettant dans le proche infra-rouge

Ainsi, après avoir procédé à des études de stabilité en solution sur des QD de type CdSe/CdS/ZnS émettant vers 600 nm, nous avons appliqué cette méthode à des QD de type CuInS₂/ZnS émettant dans le proche infra-rouge avec une maximum d'émission à 800 nm.

Nous avons utilisé le même ligand dithiophosphate **L-5** et le même amphiphile pegylé **L-6** que pour l'assemblage des nanocristaux encapsulés QD@**L-6** émettant dans le visible. Dans un premier temps, nous avons effectué un échange primaire de ligands à l'aide de **L-5**, puis nous avons encapsulé les QD à l'aide d'une micelle de l'amphiphile perfluoré **L-6**, avant de les purifier par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Ces nano-objets seront notés QD_{NIR}@L-6.

5.2 Résultats

Les nanocristaux fluorescents et hydrosolubles QD_{NIR}@L-6 (200 µL – 60 nmol) ont été injectés par voie intraveineuse à une souris nude. Malheureusement, l'animal n'a survécu qu'un peu plus d'une heure après injection des objets. Une image prise quelques minutes avant le décès montre une fluorescence diffuse au niveau du thorax et de la tête de l'animal (Figure 90).

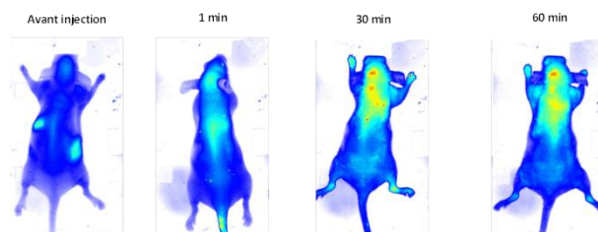


Figure 90. Biodistribution des QD_{NIR}@L-6

Les organes ont été prélevés à l'issue de l'expérience et leur analyse a permis de mettre en évidence accumulation très nette des nanoparticules au niveau des poumons (Figure 91). Ce phénomène est vraisemblablement le reflet de la présence d'agrégats suffisamment importants pour bloquer la circulation pulmonaire, entraînant la mort par asphyxie. La formation de ces agrégats peut être due à une dénaturation de l'échantillon (concentré) au cours du temps. En effet, il s'est écoulé plusieurs mois entre préparation des nanocristaux encapsulés et le moment où les animaux ont été disponibles pour l'expérience.

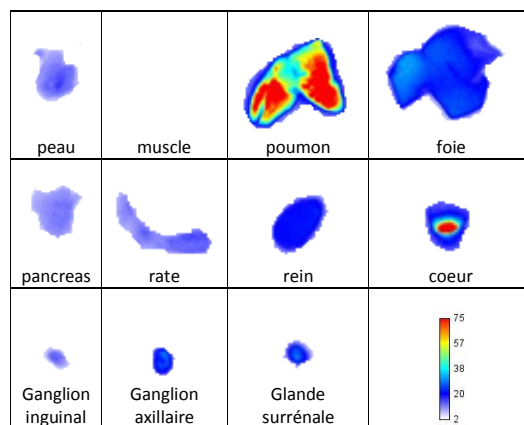


Figure 91. Collection d'organes 1 h après injection de QD_{NIR}@L-6.

5.3 Conclusion

L'étude *in vivo* ne nous a malheureusement pas apporté beaucoup d'information sur la biodistribution des nanoparticules, étant donné leur accumulation dans les poumons. Des études complémentaires devront donc être réalisées. D'autre part une amélioration de l'encapsulation des QD_{NIR} est envisagée afin de limiter la perte de fluorescence lors du passage en phase aqueuse permettant ainsi de diminuer la quantité de particules à injecter ainsi que les phénomènes d'agrégation.

Conclusion générale

Conclusion générale

Durant cette thèse nous avons, dans un premier temps, mis au point un protocole robuste pour quantifier l'échange de ligands à la surface de nano-objets, en prenant les quantum dots comme particules d'étude. Cette méthode se base sur la sensibilité de détection d'un élément radioactif, le tritium. Pour étudier l'échange de ligands, nous avons synthétisé de l'acide oléique tritié, dont l'équivalent non-marqué est un composé très couramment utilisé dans la chimie des QD. Après de nombreuses mises au point et la résolution de bon nombre de difficultés, nous avons finalement réussi à élaborer un protocole permettant de déterminer la densité de ligands à la surface de quantum dots de type CdSe zinc blende. Notre méthode innovante se démarque de ce qui était connu dans la littérature du fait qu'elle n'est pas limitée par le seuil de détection des composés organiques à la surface du nanocristal comme la plupart des méthodes utilisant la RMN (^1H , ^{31}P , DOSY,...) ou encore l'XPS. Nous avons, de plus, pu confirmer les soupçons apparus dans la littérature selon lesquels le protocole de purification des QD par précipitation au méthanol, utilisé classiquement, pouvait avoir un effet néfaste sur la densité de ligands et la surface des cristaux.

Par ailleurs, nous avons réalisé une étude permettant de déterminer la capacité qu'a un ligand à remplacer l'acide oléique présent à la surface des QD. On a ainsi obtenu une échelle des forces relatives de liaison de diverses fonctions chimiques suivant leur aptitude à déplacer l'acide oléique. Cette étude devrait permettre d'améliorer la compréhension et la mise au point des protocoles utilisés pour la préparation des QD.

Dans un second temps, nous avons développé deux stratégies d'encapsulation de QD afin de les solubiliser dans l'eau avec comme objectif des applications en imagerie *in vivo*. Ces deux approches tentent de répondre aux nombreuses exigences liées à l'utilisation de QD en milieux biologiques. Ces milieux sont complexes et déstabilisants, notamment de par la présence d'espèces compétitrices des ligands présents à la surface des QD. C'est dans cette optique que nous avons développé des amphiphiles polymérisés d'une part et des amphiphiles perfluorés d'autre part. La première stratégie est basée sur des interactions multiples pour stabiliser la couche organique et donc la stabilité colloïdale de la particule, tandis que la seconde se fonde sur les interactions entre chaînes perfluorées, qui sont à la fois hydrophobes et lipophobes, formant une couche protectrice perfluorée autour de la particule. L'avantage de la seconde stratégie est le caractère inerte des composés perfluorés, dont certains sont déjà utilisés *in vivo*. Des lots de QD, de type CdSe/CdS/ZnS émettant dans le visible, solubilisés selon ces deux stratégies ont été préparés et leur stabilité éprouvée dans plusieurs conditions de pH, salinité et potentiel redox. Nous avons ensuite appliqué notre savoir-faire à des QD de type CuInS₂/ZnS émettant dans le proche infrarouge. Des études préliminaires chez la souris ont pu être effectuées afin de réaliser une imagerie de fluorescence *in vivo* des micelles.

Partie expérimentale

II. Étude de l'échange de ligands.

Protocole de synthèse des quantum dots de type CdSe.

Réactifs.

L'1-Octadecene (ODE, 90%), l'acide oléique (OA, 90%), le nitrate de cadmium ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99,999%), l'oxyde de cadmium (CdO , 99,99%), et la poudre de sélénium 100 mesh (Se, 99,99%) ont été achetés chez Aldrich. Le myristate de sodium ($\text{Na}(\text{Myr})$, 99%) proviennent de chez Fluka. Les produits commerciaux ont été utilisés tels que reçus du fournisseur sans purification supplémentaire.

Préparation des précurseurs.

Le myristate de cadmium a été préparé suivant une procédure établie précédemment.¹⁵⁴ 1,23 g de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ont été dissous dans du méthanol (40 mL) après 1 h d'agitation et de sonication. Dans un autre ballon, 3,13 g de $\text{Na}(\text{Myr})$ ont été dissous dans du méthanol (250 mL). La solution de cadmium a ensuite été ajoutée goutte à goutte à la solution de myristate de sodium. Le précipité blanc formé a été récupéré par filtration et séché sous vide pendant une nuit.

Sous atmosphère d'argon, une solution d'oléate de cadmium dans de l'acide oléique (0,5 M, approx. 1:6) a été préparée par chauffage de 6,42 g de CdO dans 100 mL d'OA à 160 °C, jusqu'à obtenir une solution limpide. Cette solution a ensuite été dégazée sous vide à 80 °C pour enlever l'eau formée durant la réaction.

Une solution de Se dans l'ODE à 0,1 M a été préparée de la manière suivante : 190 mL d'ODE ont été dégazés à 70 °C, la solution a ensuite été chauffée à 170 °C sous argon. Une seconde solution de Se (1,58 g) dispersé dans l'ODE (10 mL) a été mise au bain à ultra-sons puis ajoutée doucement à la solution d'ODE par petites injections. Entre chaque injection, on laisse le temps à la poudre noire de Se de se dissoudre. Puis la solution a été chauffée doucement jusqu'à 205 °C pendant 30 min, résultant en une solution jaune foncée.

¹⁵⁴Yang, Y. A.; Wu, H. M.; Williams, K. R.; Cao, Y. C. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6712.

Synthèse des QD de type CdSe zinc blende.

La synthèse des QD de type CdSe est inspirée du protocole de *Cao et al.*¹⁵⁴ légèrement modifié¹⁵⁵.

Un mélange de 16 mL d'ODE, de 0,3 mmol de myristate de cadmium (174 mg), et 0.15 mmol de Se (12 mg), a été dégazé à température ambiante durant 30 min. La solution a ensuite été portée à 240 °C, sous argon, en quelques minutes.

Pour les particules de plus petite taille, 1 mL d'acide oléique a été injecté après quelques minutes de réaction (< 8 min) afin de remplacer l'acide myristique avant de retirer le chauffe ballon pour stopper la réaction. Les particules ont ensuite été purifiées par deux cycles de précipitation à l'éthanol avant d'être redispersées dans de l'hexane (ou du chloroforme).

Pour les particules de plus grande taille, la solution est laissée à réagir pendant 8 min à 240 °C avant d'injecter 2 mL d'acide oléique et de porter la solution à 300 °C. Lorsque la température atteint 265 °C, un mélange de sélénium dans l'ODE (0,1 M) et d'oléate de cadmium dans l'acide oléique (0,5 M) est ensuite ajouté goutte à goutte (Cd/Se 1:1, 36 mL h⁻¹). Lorsque la taille souhaitée est atteinte la réaction est stoppée et les nanocristaux lavés par deux cycles de précipitation à l'éthanol puis resuspendus dans l'hexane (ou le chloroforme).

¹⁵⁵Mahler, B.; Lequeux, N.; Dubertret, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 953.

Préparation de l'acide oléique marqué.

Synthèse de l'acide oléique ^3H .

L'acide oléique marqué a été préparé par réduction de 22,6 mg ($8,1 \cdot 10^{-2}$ mmol) d'acide stéarolique sous 2 bar de tritium dans 5 mL de méthanol (préalablement dégazé par plusieurs cycles de congélation sous vide), en présence de 7,9 mg de catalyseur de Lindlar. La réaction est agitée à température ambiante pendant 40 min. Le milieu réactionnel a été filtré sur un embout de silice pour seringue afin d'enlever le catalyseur. Le méthanol a ensuite été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Purification de l'acide oléique ^3H .

L'acide oléique ^3H a été purifié par HPLC en phase inverse sur une colonne C18 avec un système éluant acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (80:20:0,1) à 2 mL min^{-1} et une détection à 200 nm. Le temps de rétention est de 55 min. Afin de minimiser les phénomènes de radiolyse, l'acide oléique marqué a été stocké dans du toluène à -20°C , à une concentration de 1 mCi mL^{-1} .

Caractérisation de l'acide oléique ^3H .

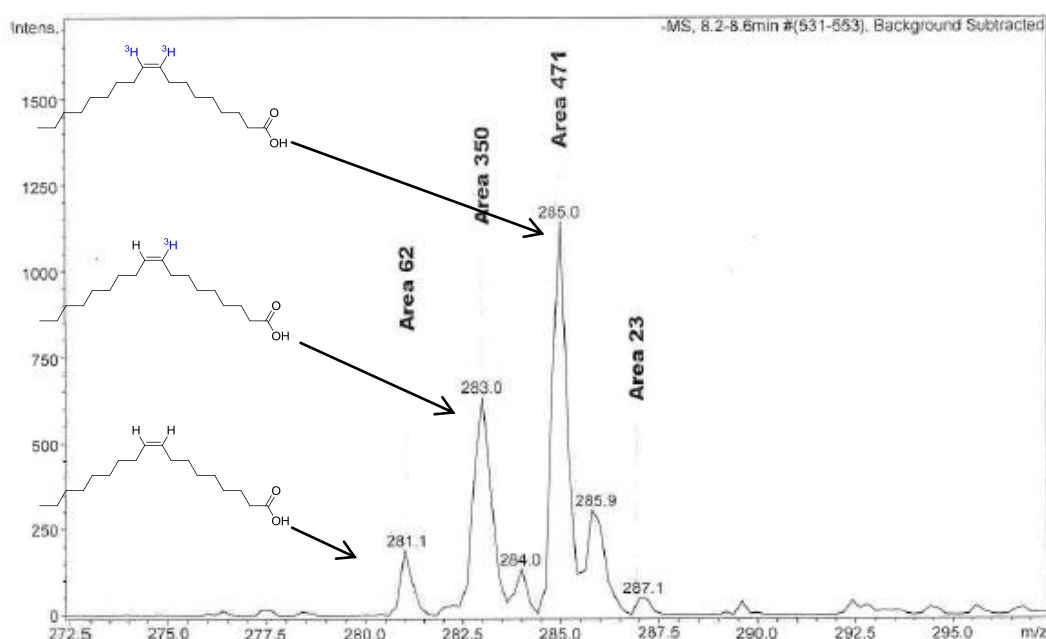
L'acide oléique ^3H purifié a été caractérisé par co-injection en HPLC avec de l'acide oléique commercial, spectrométrie de masse et RMN du tritium.

RMN ^3H : 5,28 (s, 2^3H , position vinylique)

Masse (MS-ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 281,1

$[\text{M}'+\text{H}]^+$ 283,0 où $\text{M}' = \text{M}+2$ (1 atome de tritium)

$[\text{M}''+\text{H}]^+$ 285,0 où $\text{M}'' = \text{M}+4$ (2 atomes de tritium)



Caractérisation des QD de type CdSe.

Étude du ratio Cd/Se de surface par analyse XPS et EDX.

Les mesures du ratio Cd/Se par EDX ont été réalisées sur un microscope électronique Hitachi S-3600N.

Concernant les mesures XPS nous avons utilisé une observation faite par Mulvaney *et al.*¹⁵⁶ selon laquelle il est possible d'intégrer séparément le signal provenant du Cd de surface et le signal provenant du Cd du cœur du cristal. Ainsi, en déterminant les deux aires, il est possible de connaître le ratio $Cd_{\text{surface}}/Cd_{\text{cœur}}$. Or, il est communément admis que le cœur du nanocristal présente une stœchiométrie Cd : Se de 1 : 1. Ainsi on peut déduire le ratio Cd/Se uniquement à partir de l'analyse des pics des orbitales $d_{3/2}$ et $d_{5/2}$ du cadmium.

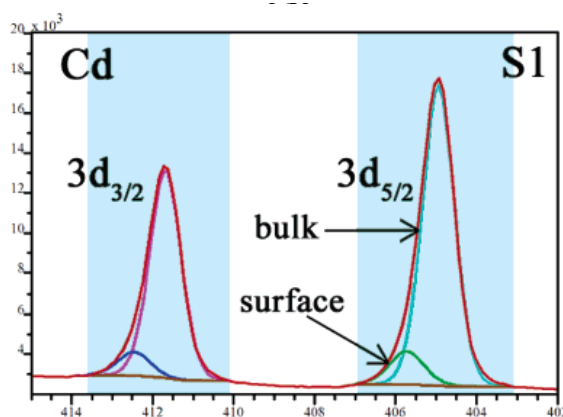


Figure 92. Différenciation du cadmium de surface et du cadmium de cœur sur le spectre XPS.¹⁵⁶

Cependant, cette méthode est approximative, dépendant notamment de la façon de calculer les fonctions permettant d'ajuster la courbe correspondant aux pics $3d_{3/2}$ et $3d_{5/2}$ du cadmium. Les résultats obtenus à l'aide des spectres réalisés dans notre cas (Figure 93), nous ont permis d'obtenir des valeurs relativement proches de celles déterminées par EDX (Tableau 11)..

¹⁵⁶Jasieniak, J.; Mulvaney, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2841

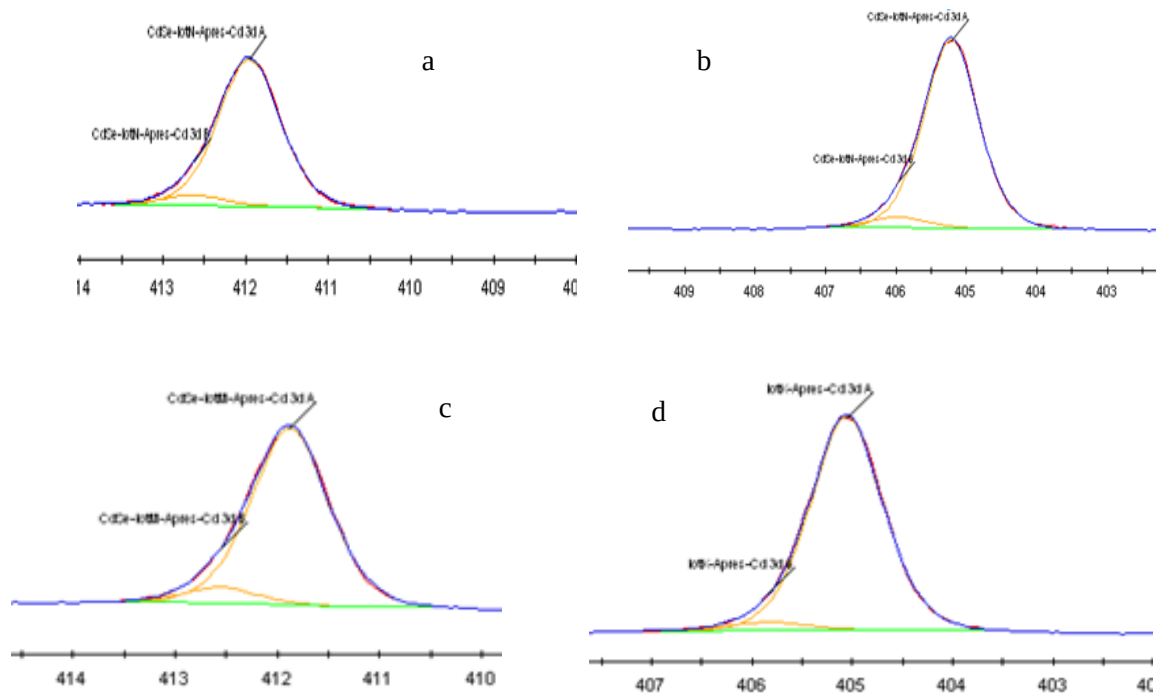


Figure 93. Exemples de spectres XPS obtenus pour les QD CdSe. a) $3d_{3/2}$ du Cd, lot N ; b) $3d_{5/2}$ du Cd, lot N ; c) $3d_{3/2}$ du Cd, lot M ; d) $3d_{5/2}$ du Cd, lot K.

Tableau 11. Résultats de la détermination du ratio Cd/Se par EDX et XPS.

Lot	h^2	Ratio Cd/Se EDX	Ratio Cd/Se XPS	écart relatif des ratios (%)
I	11,56	1,14	1,09	4,6
J	18,40	1,07	1,03	3,8
K	21,53	1,09	1,05	3,9
L	24,40	1,13	1,07	5,6
N	28,09	1,15	1,11	3,6
M	47,75	1,11	1,09	1,8

Analyse de la structure cristalline de CdSe

Des mesures de DRX (diffractométrie de rayons X) ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre Philips X'Pert avec une source $\text{CuK}\alpha$. Ces valeurs ont été comparées à celles présentes dans la base de données internationale ICSD (Inorganic Crystal Structure Database). Nous avons ainsi pu déterminer que la structure cristalline de nos objets était de type Zinc Blende (ou cubique à faces centrées).

Mesure d'absorbance des QD de type CdSe

Les spectres d'absorbance UV-visible ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre UV-visible Varian CARY 50 Probe. La cuve utilisée est une cuve en quartz d'une épaisseur de 1 cm. Un spectre d'absorbance UV-visible pour chaque taille de QD utilisée est donné en Figure 94.

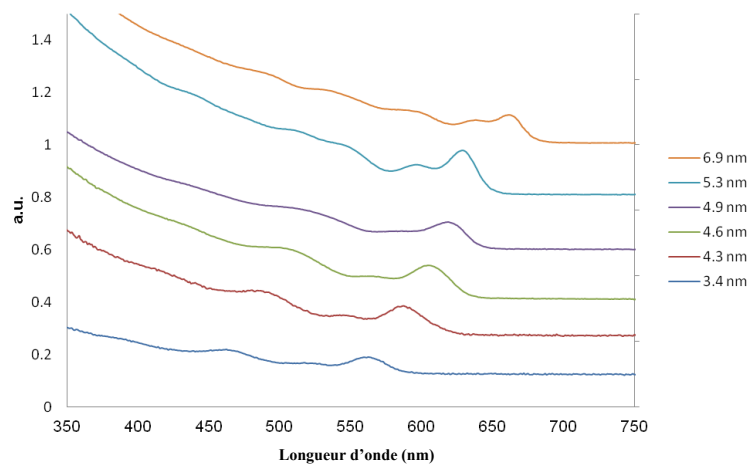


Figure 94. Spectre d'absorbance UV-Vis pour divers tailles de QD de type CdSe Zinc Blende.

Protocole d'échange de ligands.

Un protocole typique d'échange de ligands est donné pour le lot N ($h = 5,3$ nm).

Préparation de la solution d'acide oléique

La solution stock d'acide oléique marqué (1 mL) est diluée dans une solution d'acide oléique non-marqué à 0,18 M (1 mL) pour obtenir une solution d'acide oléique ayant une activité spécifique de $3,5 \cdot 10^{-3}$ Ci mmol⁻¹ (**solution 1**).

Préparation des QD

Les QD (150 µL d'une solution à 50,7 µM) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 ×g) puis resuspendus dans du toluène (1 mL).

Échange de ligand et purification

La solution de QD (250 µL) est ajoutée à la **solution 1** d'acide oléique dans le toluène (2 mL, 0,36 mmol, $3,5 \cdot 10^{-3}$ Ci mmol⁻¹). Le tout est laissé à température ambiante pendant 4 h pour que l'échange de ligands se fasse. Le mélange est ensuite transféré dans un tube en polypropylène de 15 mL contenant du méthanol (10 mL) et centrifugé (5 min, 8 000 ×g). Le précipité est resuspendu dans du toluène (1 mL) et transféré dans un second tube en polypropylène contenant du méthanol (11 mL) pour être centrifugé (5 min, 8 000 ×g) une seconde fois. Le précipité est lavé au méthanol (2 × 2 mL) et repris dans de l'hexane (3 mL, **solution 2**). La concentration en QD de la **solution 2** est déterminée par absorbance UV-Vis à 340 nm^{157,158} et la concentration en ligands est mesurée par scintillation liquide.

¹⁵⁷. Čapek, R. K.; Moreels, I.; Lambert, K.; De Muyinck, D.; Zhao, Q.; Van Tomme, A.; Vanhaecke, F.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 6371.

¹⁵⁸ Leatherdale, C. A.; Woo, W.-K.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 7619.

Tableau de résultats.

Dans un souci de clarté nous ne présentons que la moyenne des 3 mesures réalisées pour chaque lot de QD.

Lot	h^2 (nm ²)	L/QD	L/nm ²	écart type L/QD (%)
I	11,6	19,7	0,89	0,8
J	18,4	27,1	0,77	0,7
K	21,5	33,4	0,81	2,5
L	24,4	33,6	0,72	0,3
N	28,1	33,9	0,63	0,9
M	47,8	66,3	0,73	2,5

Protocole de Dialyse

Un protocole typique d'échange de ligands est donné pour le lot N ($h = 5,3$ nm).

Préparation de la solution d'acide oléique

La solution stock d'acide oléique marqué (1 mL) est diluée dans une solution d'acide oléique non-marqué à 0,18 M (1 mL) pour obtenir une solution d'acide oléique ayant une activité spécifique de $3,5 \cdot 10^{-3}$ Ci mmol⁻¹ (**solution 1**).

Préparation des QD

Les QD (150 µL d'une solution à 50,7 µM) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 ×g) puis resuspendus dans du toluène (1 mL).

Echange de ligand et purification

La solution de QD (250 µL) est ajoutée à la **solution 1** d'acide oléique dans le toluène (2 mL, 0,36 mmol, $3,5 \cdot 10^{-3}$ Ci mmol⁻¹). Le tout est laissé à température ambiante pendant 4 h pour que l'échange de ligands se fasse. Le mélange est ensuite transféré dans une membrane à dialyse (Spectra/Por® 7 membrane, 25 kDa cut-off). La membrane de dialyse est ensuite placée dans un b cher contenant du toluène (300 mL) et laiss e   dialyser pendant 2 h. L'opération est r p t e une seconde fois dans un b cher contenant de l'hexane (300 mL). L'hexane est ensuite remplacé et un autre cycle de dialyse est effectué durant 12 h. Ce cycle de 12 h est répété une seconde fois. La solution dans la membrane de dialyse est collect e dans une fiole jaug e de 5 mL et le volume est complété par de l'hexane. La concentration en QD de la solution est d termin e par absorbance UV-Vis à 340 nm^{157,158} et la concentration en ligands est mesur e par scintillation liquide.

Protocole d'échange pour les forces relatives des ligands

Préparation des QD encapsulés par l'acide oléique ^3H

Préparation de la solution d'acide oléique :

La solution stock d'acide oléique marqué (4 mL) est diluée dans une solution d'acide oléique non-marqué à 0,18 M (4 mL) pour obtenir une solution d'acide oléique ayant une activité spécifique de $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ Ci mmol}^{-1}$ (**solution 1**).

Préparation des QD et échange :

Les QD (166 μL d'une solution à 46,7 μM , lot M, $h = 6,9 \text{ nm}$) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, $15\,500 \times g$) puis resuspendus dans du toluène (1 mL).

La solution de QD précédente (1 mL) est ajoutée à la **solution 1** d'acide oléique dans le toluène (8 mL, 1,44 mmol, $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ Ci mmol}^{-1}$). Le tout est mis au bain à ultrasons à température ambiante pendant 15 min pour que l'échange de ligands se fasse. Le mélange est ensuite transféré dans un tube en polypropylène contenant du méthanol (20 mL) et centrifugé (5 min, $8\,000 \times g$). Le précipité est resuspendu dans du toluène (2 mL) et transféré dans un second tube en polypropylène contenant du méthanol (22 mL) pour être centrifugé (5 min, $8\,000 \times g$) une seconde fois. Le précipité est lavé au méthanol ($2 \times 2 \text{ mL}$) et repris dans du toluène (2 mL, **solution 2**).

Deuxième échange de divers type de ligands et purification

La **solution 2**, contenant les QD recouverts d'acide oléique marqué, est séparée en 4 aliquotes de 400 μL . Chaque aliquote est ajoutée à 1,5 mL de toluène contenant 0,18 mmol d'un des ligands dont la force relative est étudiée (acide stéarique, oléylamine, octadécyl amine, ...). Le tout est mis au bain à ultrasons à température ambiante pendant 15 min pour que l'échange de ligands se fasse. Chaque mélange est ensuite transféré dans un tube en polypropylène de 15 mL contenant du méthanol (10 mL) et centrifugé (5 min, $8\,000 \times g$). Le précipité est resuspendu dans du toluène (1 mL) et transféré dans un second tube en polypropylène contenant du méthanol (11 mL) pour être centrifugé (5 min, $8\,000 \times g$) une seconde fois. Le précipité est lavé au méthanol ($2 \times 2 \text{ mL}$) et repris dans de l'hexane (3 mL, **solution 3**). La concentration en QD de la **solution 3** est déterminée par absorbance UV-Vis à 340 nm^{157,158} et la concentration en ligands est mesurée par scintillation liquide.

III. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés polymérisables.

Les réactifs de départ commerciaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich ou Alfa Aesar et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

5.4 Synthèse de L-1.

Le schéma de synthèse de L-1 (Figure 95) passe par trois étapes avec deux composés intermédiaires I-1 et I-2.

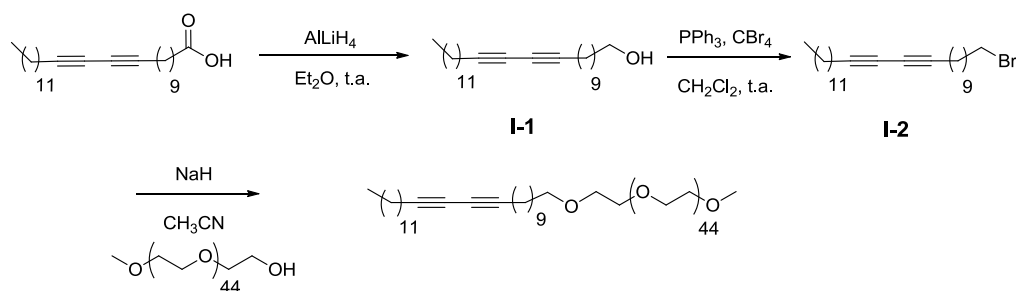


Figure 95. Schéma de synthèse de L-1.

5.5 Synthèse de L-2 et L-3.

Le schéma de synthèse de L-2 et L-3 (Figure 96) présente les deux mêmes intermédiaires de départ I-1 et I-2 que pour la synthèse de L-1.

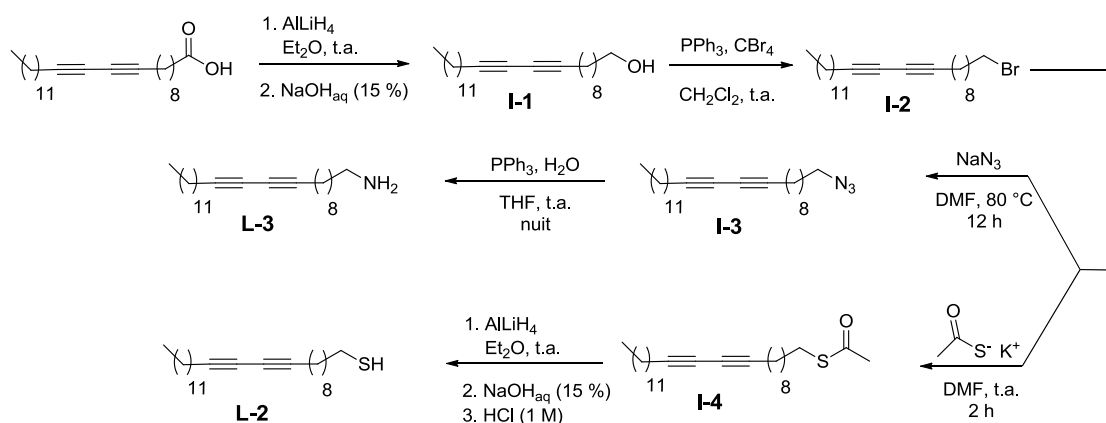
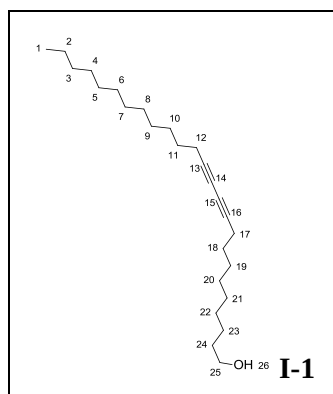


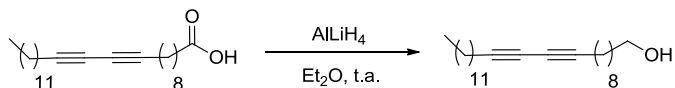
Figure 96. Schéma de synthèse de L-2 et L-3.

Composé I-1

pentacos-10,12-diyn-1-ol



I-1



➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, une solution d'acide pentacos-10,12-diynoïque (1g – 2,7 mmol – 1 éq.) dans du diéthyléther (50 mL) a été refroidi à 4°C avant d'ajouter LiAlH₄ (205 mg – 5,4 mmol – 2 éq.). Après 2 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est refroidi à 4 °C et 200 µL d'une solution de soude à 15 % sont ajoutés suivis par 600 µL d'eau. Le précipité rose est filtré sur Célite. La phase organique est lavée avec une solution d'acide chlorhydrique (2 × 20 mL) et séchée sur sulfate de magnésium avant d'être filtrée puis concentrée sous vide. Le composé **I-1** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 90 % (900 mg – 2,4 mmol)

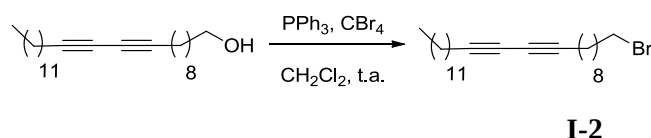
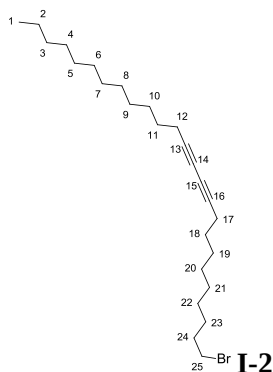
➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 77,5 (C-13 ou C-16), 77,4, (C-13 ou C-16), 65,2 (C-14 ou C-15), 65,2 (C-14 ou C-15), 63,1 (C-25), 32,7 (CH₂), 31,9 (CH₂), 29,6 (CH₂), 29,4 (CH₂), 29,3 (CH₂), 29,1 (CH₂), 29,0 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,3 (CH₂), 28,2 (CH₂), 25,7 (CH₂), 22,6 (CH₂), 19,2 (C-12 et C-17), 14,1 ppm (C-1)

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ³ J (Hz)	intégration (H)	attribution
3,64	Triplet	³ J = 6,7 Hz	2	H-25
2,24	Triplet	³ J = 6,9 Hz	4	H-12 et H-17
1,47-1,61	Massif	/	8	H-18 à H-24 et H-2 à H-11 et H-26
1,22-1,42	Massif	/	27	
0,88	Triplet	³ J = 6,6 Hz	3	H-1

Composé I-2

1-bromopentacosa-10,12-diyne



➤ **Protocole expérimental :**

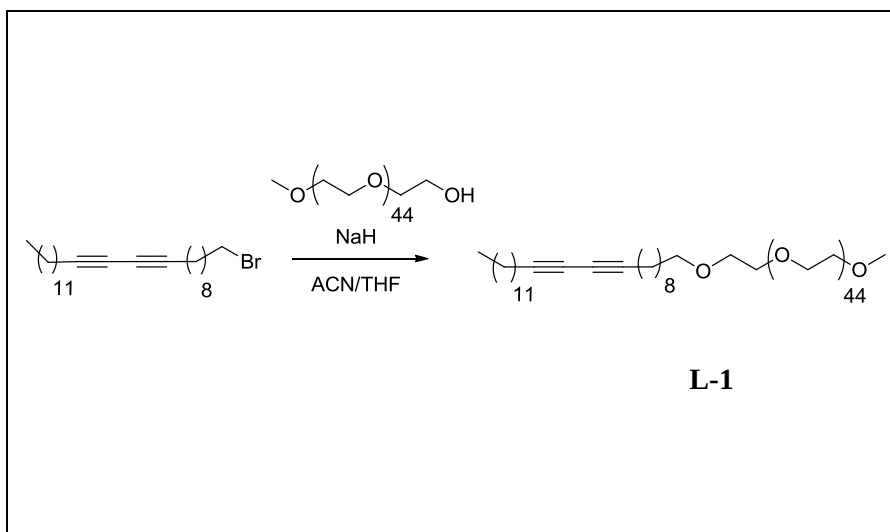
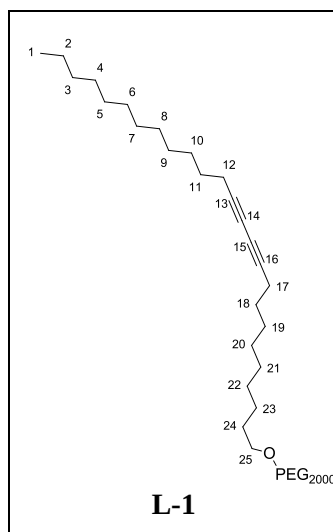
Sous atmosphère d'azote, de la triphénylphosphine (550 mg – 2,1 mmol – 1,5 éq) et **I-1** (500 mg – 1,4 mmol – 1 éq.) sont solubilisés dans du dichlorométhane (3 mL). Du tétrabromométhane (700 mg – 2,1 mmol – 1,5 éq.) est ajouté par portions à la réaction puis le tout est laissé à réagir à température ambiante pendant 15 min. Après ajout d'eau froide (2mL), la phase organique est collectée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous vide. Une purification du composé sur un cake de silice (élution avec du dichlorométhane) conduit au composé **I-2** sous forme d'une huile jaune avec un rendement quantitatif.

➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) :** δ 77,6 (C-13 ou C-16), 77,4 (C-13 ou C-16), 65,3 (C-14 ou C-15), 65,1 (C-14 ou C-15), 34,0 (C-25), 32,8 (CH₂), 31,9 (CH₂), 29,6 (CH₂), 29,4 (CH₂), 29,3 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,1 (CH₂), 28,9 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,6 (CH₂), 28,3 (CH₂), 28,2 (CH₂), 28,1 (CH₂), 22,7 (CH₂), 19,2 (C-12 et C-17), 14,1 ppm (C-1).

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :**

δ (ppm)	multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
3,41	triplet	³ J = 6,95 Hz	2	H-25
2,24	triplet	³ J = 7,0 Hz	4	H-12 et H-17
1,85	quintuplet	³ J = 7,0 Hz	2	H-24
1,47-1,56	massif	/	4	H-18 à H-23 et H-2 à H-11
1,34-1,46	massif	/	6	
1,22-1,34	massif	/	22	
0,88	triplet	³ J = 6,9 Hz	3	H-1

Composé L-1



➤ Protocole expérimental :

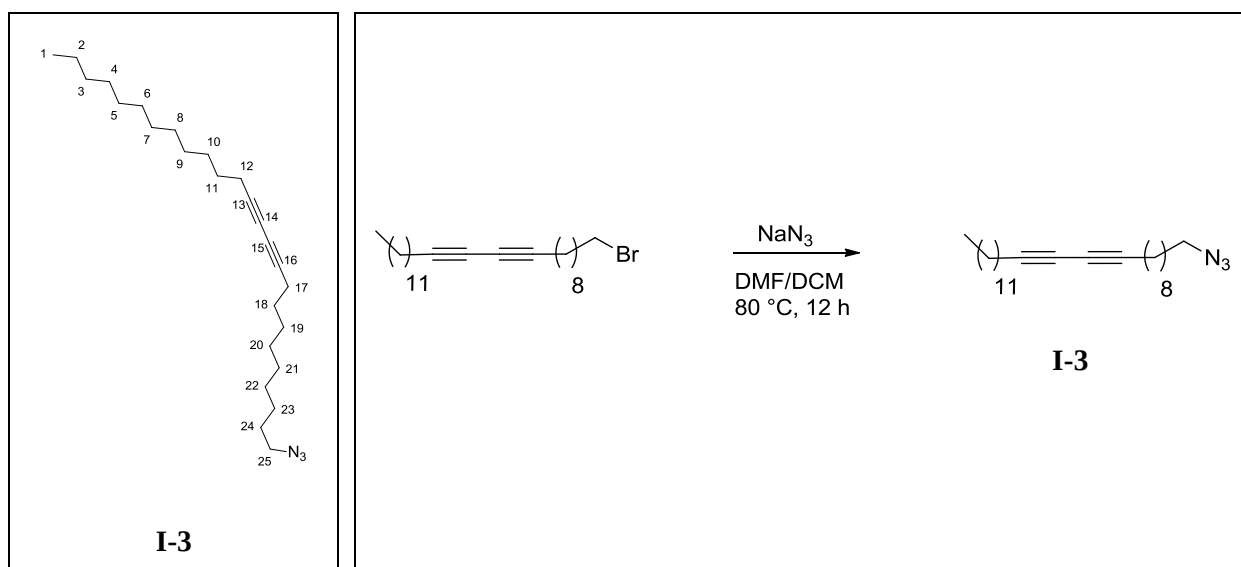
Sous atmosphère d'azote, une solution de polyéthylène glycol monométhyle éther (MW = 2000 – 1,5 g – 0,75 mmol – 1 éq.) dans de l'acétonitrile anhydre est ajouté à une suspension d'hydruure de sodium (36 mg – 0,9 mmol – 1,2 éq.) dans de l'acétonitrile anhydre (volume total 8 mL). Le mélange est chauffé à reflux durant 30 min puis laissé revenir à température ambiante. Le composé **I-2** (317 mg – 0,75 mmol – 1 éq.) est dissout dans du tétrahydrofurane (3 mL) puis ajouté lentement au milieu réactionnel puis laissé pour agitation à température ambiante durant 96 h. Après concentration sous vide, une purification sur colonne de silice (éluant dichlorométhane/méthanol 95 : 5) a permis de récupérer le composé souhaité sous forme d'un solide jaune (600 mg – 0,3 mmol – 40 % de rendement)

➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 77,4 (C-13 ou C-16), 77,3 (C-13 ou C-16), 65,3 (C-14 ou C-15), 65,2 (C-14 ou C-15), 72,4 (CH₂-O), 71,4 (CH₂-O), 70,5 (86 CH₂-O), 70,2 (CH₂-O), 69,9 (CH₂-O), 59,0 (CH₃-O), 31,8 (CH₂), 29,5 (CH₂), 29,4 (CH₂), 29,3 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,0 (CH₂), 28,9 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,2 (CH₂), 25,9 (CH₂), 22,6 (CH₂), 19,1 (CH₂), 14,0 ppm (CH₃).

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
3,65	multiplet	/	180	CH ₂ O
3,42	triplet	³ J = 7,0 Hz	2	CH ₂ O
2,22	triplet	³ J = 7,0 Hz	4	H-17 et H-12
1,60-1,45	massif	/	6	H-18 à H-23 et H-2 à H-11
1,35-1,20	massif	/	28	
0,88	triplet	³ J = 6,9 Hz	3	H-1

Composé I-3



➤ Protocole expérimental :

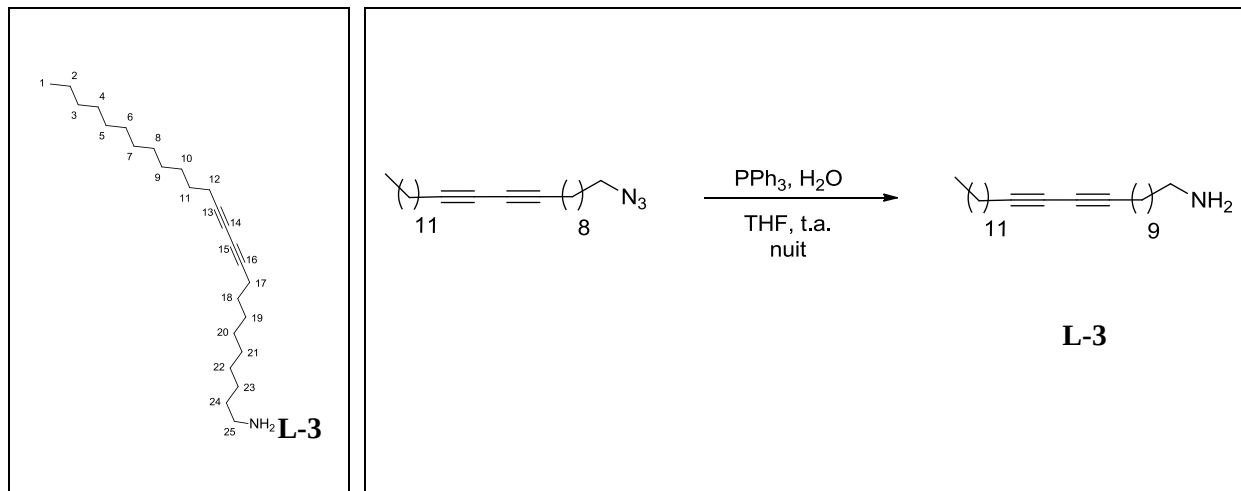
Le composé **I-2** (424 mg – 1 mmol – 1 équ.) est solubilisé dans du dichlorométhane (5 mL) puis ajouté à une solution d'azoture de sodium (405 mg – 6 mmol – 6 équ.) dans 5 mL de diméthylformamide/ dichlorométhane (1 : 1). Le mélange est chauffé à reflux à 80 °C pendant une nuit. Le mélange de solvants est évaporé sous vide avant de reprendre le composé dans du dichlorométhane (10 mL). La phase organique est lavée à 3 reprises avec 5 mL l'eau, puis lavé avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous vide, conduisant au composé **I-3** sous la forme d'une huile (289 mg – 0,75 mmol – 75 % de rendement).

➤ **IR (pastille NaCl)** : 2923 (intense, fin, élongation asymétrique C–H alcane), 2849 (moyen, fin, élongation symétrique C–H alcane), 2133 (faible, fin, C –C alcyne), 2101 (intense, fin, élongation –N₃), 1457 (moyen, fin, déformation des –CH₂), 1255 (moyen, large, élongation C–N), 908, 730.

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ³ J (Hz)	intégration (H)	attribution
3,26	triplet	³ J = 6,9 Hz	2	H-25
2,25	triplet	³ J = 7,0 Hz	4	H-12 et H-17
1,46-1,64	massif	/	6	H-18 à H-23 et H-2 à H-11
1,20-1,43	massif	/	28	
0,88	triplet	³ J = 6,8 Hz	3	H-1

Composé L-3



➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, le composé **I-3** (280 mg – 0,7 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du tétrahydrofurane anhydre (10 mL). A cela est ajoutée de la triphénylphosphine (424 mg – 1,6 mmol – 2,3 éq.). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 3 h. De l'eau (100 µL – 5,6 mmol – 8 éq.) est ajoutée et le mélange laissé à température ambiante durant une nuit. Le solvant est évaporé sous vide puis le composé est repris dans un minimum de diéthyléther avant d'être filtré sur Célite. Le filtrat est évaporé avant de réaliser une séparation par combiflash avec un système d'éluant dichlorométhane/méthanol 95 : 5. L'éluant est évaporé sous vide, conduisant à **L-3** (90 mg – 0,25 mmol – 33 % de rendement).

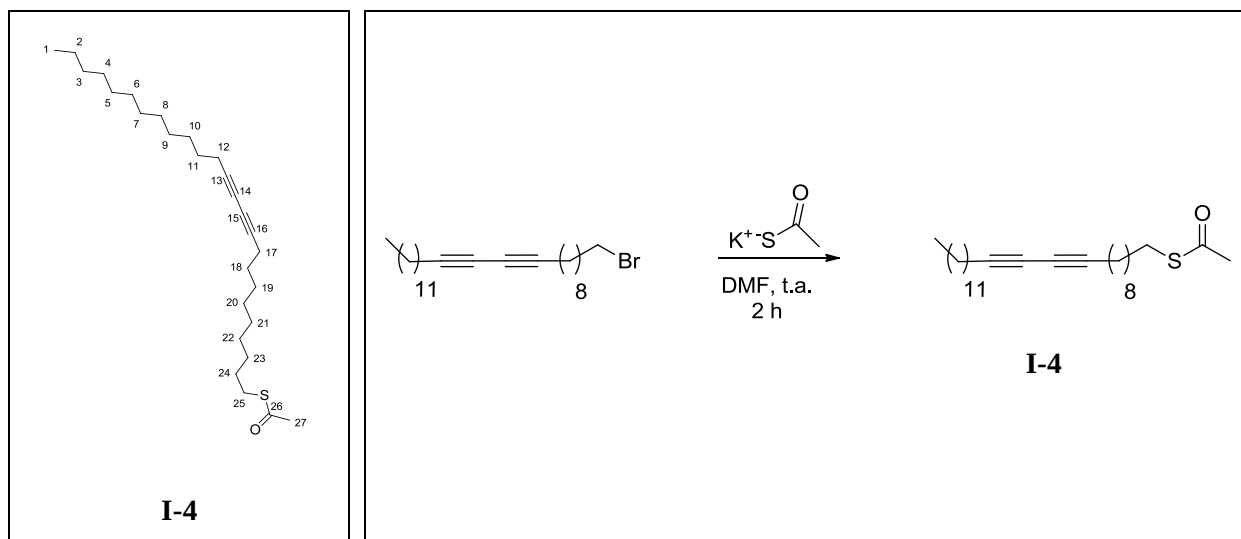
➤ Masse (MS-ESI) : m/z $[M+H]^+$ 360,8

➤ RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 77,2 (C-13 et C-16), 65,3 (C-14 ou C-15), 65,2 (C-14 ou C-15), 40,1 (C-25), 31,9 (CH_2), 29,6 (CH_2), 29,4 (CH_2), 29,3 (CH_2), 29,1 (CH_2), 29,0 (CH_2), 28,8 (CH_2), 28,7 (CH_2), 28,3 (CH_2), 28,2 (CH_2), 27,8 (CH_2), 26,5 (CH_2), 22,6 (CH_2), 19,2 (CH_2), 14,1 ppm (C-1)

➤ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
2,80	triplet	$^3J = 7,0$ Hz	2	H-25
2,24	triplet	$^3J = 7,0$ Hz	4	H-12 et H-17
1,46-1,60	massif	/	6	H-18 à H-23 et H-2 à H-11
1,21-1,42	massif	/	28	
0,88	triplet	$^3J = 6,8$ Hz	3	H-1

Composé I-4



➤ **Protocole expérimental :**

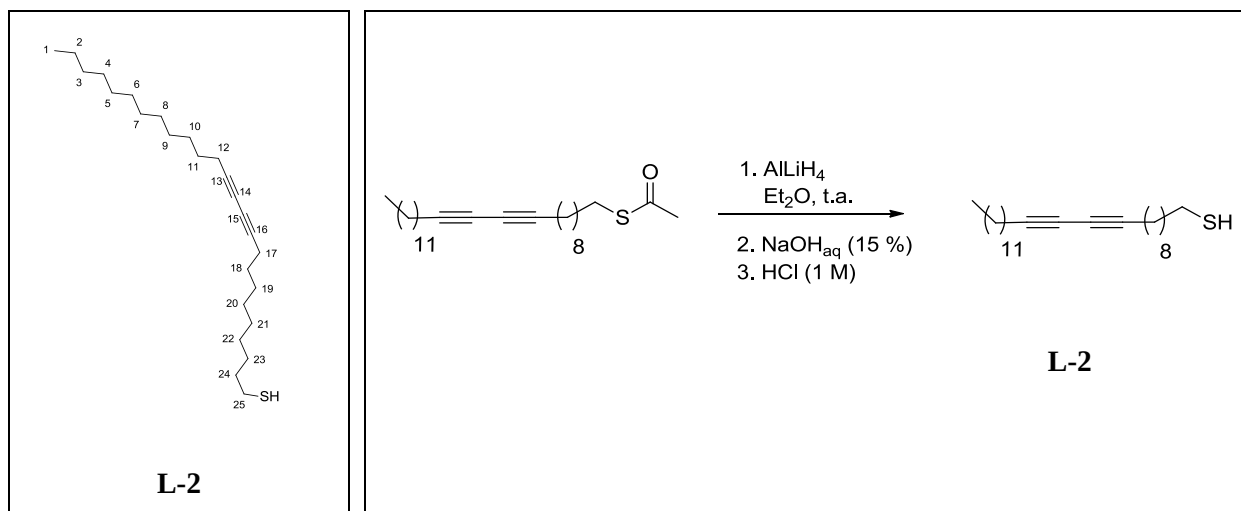
Le composé **I-2** (1,4 g – 3,3 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du dichlorométhane (5 mL) que l'on ajoute à une solution de thioacétate de potassium (760 mg – 6,6 mmol – 2 éq.) dans le diméthylformamide (5 mL). Le tout est agité à température ambiante pendant 2 h. Le mélange de solvants est évaporé sous vide. Le composé est repris dans du cyclohexane, avant d'être passé sur un cake de silice avec un système éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 95 : 5. Le filtrat est évaporé et une analyse RMN ^1H du composé indique la présence résiduelle de thioacétate de potassium. Le composé est repris dans du dichlorométhane, la phase organique est lavée avec de l'eau afin d'extraire les sels, puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide, conduisant à **I-4** (733 mg – 1,8 mmol – 53 % de rendement).

- **IR (pastille NaCl) :** 2924 (intense, fin, élongation asymétrique C–H alcane), 2849 (moyen, fin, élongation symétrique C–H alcane), 1733 (moyen, fin), 1696 (intense, fin, élongation C=O), 1445 (faible, fin, déformation des $-\text{CH}_2$), 1352 (moyen, fin), 1129 (moyen, fin), 955 (faible, fin), 744, 723 (faible), 617 (moyen, fin)

➤ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
2,86	triplet	$^3J = 7,2 \text{ Hz}$	2	H-25
2,32	singulet	/	3	H-27
2,24	triplet	$^3J = 7,0 \text{ Hz}$	4	H-12 et H-17
1,46-1,60	multiplet	/	6	H-18 à H-23 et H-2 à H-11
1,21-1,42	multiplet	/	28	
0,88	triplet	$^3J = 6,8 \text{ Hz}$	3	H-1

Composé L-2



➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, une solution de **I-4** (500 mg – 1,2 mmol – 1 éq.) dans du diéther (30mL) a été refroidie à 4 °C avant d'ajouter LiAlH₄ (122 mg – 2,4 mmol – 2 éq.). Après avoir agité pendant une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est refroidi à 4 °C et 100 µL d'eau sont ajoutés, suivis de 100 µL d'une solution de soude à 15 % et pour finir à nouveau 300 µL d'eau. Le précipité rose est filtré sur Célite. La phase organique est lavée avec une solution d'acide chlorhydrique 0,02 M (2 × 20 mL) et séchée sur sulfate de magnésium avant d'être filtrée puis concentrée sous vide. Le composé **L-2** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 44 % (199 mg – 0,5 mmol).

- **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 77,7 (C-13 ou C-16), 77,2 (C-13 ou C-16), 31,9 (C-25), 29,7 (CH₂), 29,6 (CH₂), 29,4 (CH₂), 29,3 (CH₂), 29,2 (CH₂), 29,0 (CH₂), 28,9 (CH₂), 28,8 (CH₂), 28,7 (CH₂), 28,6 (CH₂), 28,3 (CH₂), 28,27 (CH₂), 22,6 (CH₂), 19,2 (C-12 et C-17), 14,1 ppm (C-1).

➤ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
2,52	quadruplet	$^3J = 7,4$ Hz	2	H-25
2,24	triplet	$^3J = 6,9$ Hz	4	H-12 et H-17
1,61	quintuplet	$^3J = 7,3$ Hz	2	H-23
1,47-1,56	multiplet	/	4	H-18 à H-22 et H-2 à H-11
1,41-1,33	multiplet	/	4	H-18 à H-22 ou H-2 à H-11
1,33	singulet	/	1	S-H
1,31-1,22	multiplet	/	24	H-18 à H-22 ou H-2 à H-11
0,88	triplet	$^3J = 6,8$ Hz	3	H-1

Préparation et polymérisation de QD@L-2

Préparation de la solution de L-2

Le ligand **L-2** fraîchement déprotégé (75 mg – 0,2 mmol) est solubilisé dans du toluène (2 mL).

Préparation des QD

120 µL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 30 µM (3,6 nmol) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 ×g).

Le culot de QD obtenu est resuspendu dans la solution de ligands **L-2** conduisant à un excès de ligand par nanocrystal de 55 000 environ. Le mélange est laissé à température ambiante durant la nuit. La solution est ensuite ajoutée à du méthanol (10 mL) avant d'être centrifugée (5 min, 10 000 ×g). Le culot est suspendu dans du toluène (1 mL) et une seconde précipitation est réalisée. Le culot final est repris dans du chloroforme (1 mL), conduisant à une solution (**S1**) de QD@L-2.

Polymérisation

200 µL de la solution **S1** sont prélevés, le solvant évaporé sous flux d'azote, puis les QD@L-2 sont repris dans de l'hexane (3 mL). La solution de QD@L-2 dans l'hexane est ensuite placée dans un cristallisateur choisi de sorte à avoir environ 0,5 cm d'épaisseur de liquide. Le tout est placé sous une lampe UV (254 nm). Un suivi de la fluorescence est réalisé à différents temps d'irradiation.

Solubilisation dans l'eau de QD@L-2

La solution **S1** de QD@L-2 (200 µL) préparée précédemment est ajoutée à une solution de **L-1** (18,8 mg – 8 µmol dans 2 mL d'eau). Le tout est chauffé délicatement afin d'entraîner l'évaporation du chloroforme et le passage des QD@L-2 en phase aqueuse. La solution est ensuite centrifugée (5 min, 10 000 ×g) afin d'enlever les agrégats. Le tout est placé sous une lampe UV (254nm). Un suivi de la fluorescence est réalisé à différents temps d'irradiation.

Formation de QD@Poly

Polymérisation de L-1

Le composé **L-1** (35 mg – 15 μmol) est solubilisé dans de l'eau distillée (3 mL) et placé dans un cristalliseur de sorte à avoir une épaisseur inférieure à 1 cm. Le tout est placé sous une lampe UV (254 nm) pendant 5 h.

Échange de ligands et passage dans l'eau

400 μL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 36 μM ($1,4 \cdot 10^{-8}$ mol) sont précipités dans le méthanol (4 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Au culot est ajoutée une solution d'octadécane-thiol (193 mg – 0,7 mmol soit environ 49 000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans le chloroforme (3 mL). Le mélange est laissé à température ambiante durant une nuit. Les particules sont ensuite précipitées dans l'éthanol absolu (10 mL) par centrifugation (5 min, 10 000 $\times g$). Le culot est repris dans du chloroforme (1 mL) avant d'être précipité une seconde fois. Le culot final est repris dans un minimum de chloroforme puis ajouté à la solution de **L-1** polymérisé. Le tout est agité avec une sonde à ultrasons durant 10 min. Le chloroforme s'étant évaporé, il reste une solution de QD@Poly dans l'eau. Cette solution est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats. Le surnageant est collecté pour être purifié.

Purification de QD@Poly

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspinn avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés (20 min, 50 000 tr min^{-1}). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspinn (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Préparation de QD@DSPE

Échange de ligands et passage dans l'eau

400 μL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 36 μM ($1,4 \cdot 10^{-8}$ mol) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Au culot est ajoutée une solution d'octadécane-thiol (190 mg – 0,7 mmol soit environ 48 000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans le chloroforme (3 mL). Le mélange est laissé à température ambiante durant 20 h. Les particules sont ensuite précipitées dans l'éthanol absolu (10 mL) par centrifugation (5 min, 10 000 $\times g$). Le culot est repris dans une solution de DSPE (20 mg) dans le chloroforme (1 mL) puis ajouté à de l'eau distillée (3 mL). Le tout est agité avec une sonde à ultrasons durant 10 min. Le chloroforme s'étant évaporé, il reste une solution de QD@DSPE dans l'eau. Cette solution est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats. Le surnageant est collecté pour être purifié.

Purification de QD@DSPE

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspinn avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés (20 min, 50 000 tr min^{-1}). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspinn (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Préparation des solutions de QD à divers pH

Une solution de PBS salin a été préparée par dilution d'une poudre prête à l'emploi de chez Sigma Aldrich dans 1 L d'eau distillée. Cette solution est composée de 0,01 M d'ions phosphates, de 0,138 M de NaCl et 0,0027 M de KCl et ayant un pH de 7,4 à 25°C.

À partir d'une solution de PBS (phosphates 0,01 M, NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M) à pH 7,4, cinq solutions allant de pH 4 à 12 sont préparées. Les solutions à pH acides sont ajustées par ajout d'HCl concentré. Les solutions à pH basiques sont ajustées par ajout de NaOH concentré.

De chacun des lots de QD on prélève un certain volume (Tableau 12) que l'on complète à 1 mL avec de l'eau distillée afin d'avoir une valeur d'absorbance équivalente et donc une concentration équivalente.

Tableau 12. Volume prélevé de chaque lot de QD pour les études de stabilité.

Lot de QD	QD@DSPE	QD@Poly	QD@L-7	QD@L-8
Concentration (approximative)	1,2 μM	0,1 μM	4,5 μM	3,5 μM
Volume prélevé	20 μL	100 μL	40 μL	40 μL

À chacune de ces solutions de QD est ajouté 1 mL d'une solution au pH désiré. L'évolution de ces solutions est ensuite suivie sur plusieurs jours.

Polymérisation de L-1

Le composé **L-1** (29 mg – 12 μ mol) est solubilisé dans de l'eau distillée (3 mL) et placé dans un cristalliseur de sorte à avoir une épaisseur inférieure à 1 cm. Le tout est placé sous une lampe UV (254 nm) pendant 3 h.

Échange de ligands et passage dans l'eau

350 μ L d'une solution de QD de type CuInS₂/ZnS à environ 30 μ M (10,5 nmol) sont précipités dans le méthanol (1 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Au culot est ajoutée une solution d'octadécane-thiol (106 mg – 0,4 mmol soit 38 000 équivalent par rapport aux nanoparticules) dans du chloroforme (3 mL). Le mélange est laissé à température ambiante durant une nuit. Les particules sont ensuite précipitées dans l'éthanol absolu (10 mL) par centrifugation (5 min, 10 000 $\times g$). Le culot est repris dans du chloroforme (1 mL) avant d'être précipité une seconde fois.

Le culot final est repris dans un minimum de chloroforme puis ajouté à la solution de **L-1** polymérisé. Le tout est agité avec une sonde à ultrasons durant 10 min. Le chloroforme s'étant évaporé il reste une solution de QD_{NIR}@Poly dans l'eau. Cette solution est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats. Le surnageant est collecté pour être purifié.

Purification de QD_{NIR}@Poly

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspin avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μ L de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés à (20 min, 50 000 tr min⁻¹). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspin (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Protocole d'injection et de mesure de la fluorescence *in vivo*.

Protocole d'injection

Une injection par voie intraveineuse (200 μ L du lot QD_{NIR}@Poly) dans la queue d'une souris de type nude (nu/nu) est réalisée à l'aide d'une seringue à insuline de 1 mL.

Image plane de la souris

Les images sont réalisées à divers temps à l'aide d'un imageur TomoFluo3D (Figure 97).

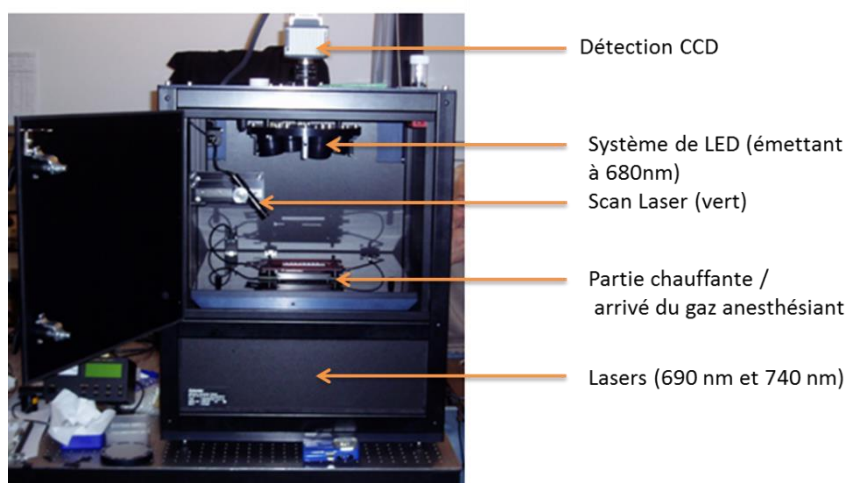


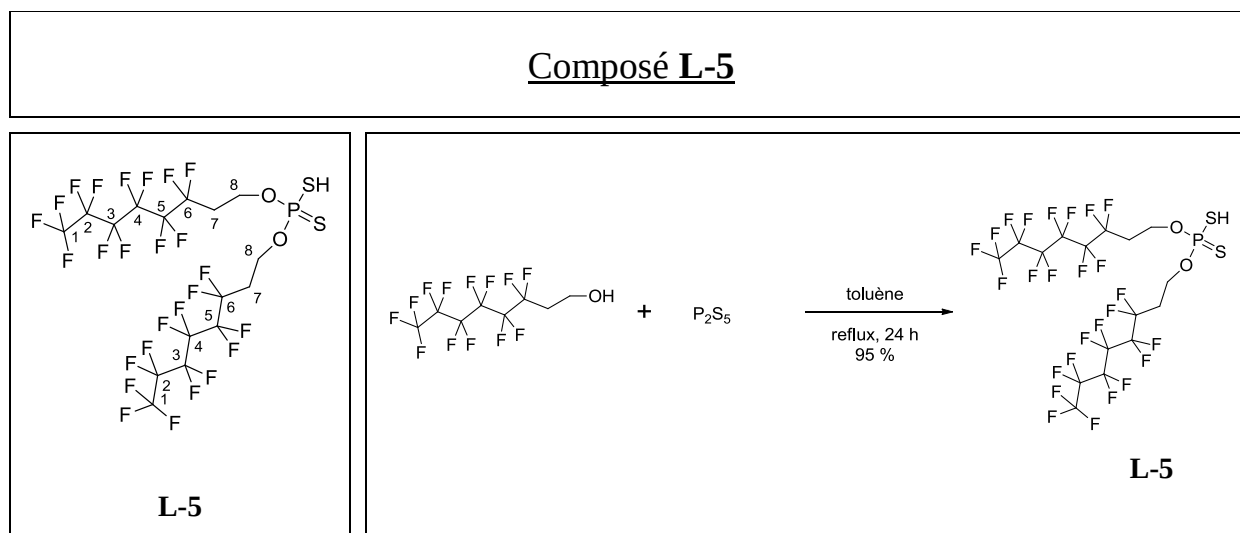
Figure 97. Imageur TomoFluo3D

IV. Stratégie d'encapsulation utilisant des composés perfluorés.

Les réactifs de départ commerciaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Alfa Aesar ou Fluka et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

5.7 Synthèse de L-5

La synthèse de **L-5** a été réalisée en une étape par substitution nucléophile de 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-perfluorooctan-1-ol commercial sur du pentasulfure de diphosphore.



➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, le 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-perfluorooctan-1-ol (7,3 g – 20 mmol – 4 éq.) est ajouté au goutte à goutte sur une période d' 1 h à une suspension de P₄S₁₀ (1,1 g – 5 mmol – 1 éq.) dans du toluène anhydre (séché sur sodium). Le milieu est laissé sous agitation au reflux durant 24 h. Durant la réaction un flux d'azote permet l'évacuation de H₂S qui passe dans un bulleur contenant une solution de NaOH, suivi d'une solution de FeCl₃.6H₂O afin de neutraliser H₂S. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté afin d'enlever le P₄S₁₀ qui n'a pas réagi. Le solvant est évaporé sous vide et le composé extrait dans du perfluoro-1,3-diméthylcyclohexane. L'évaporation du solvant perfluoré conduit au solide blanc amorphe **L-8** (7,76 g – 9,4 mmol – 94 % de rendement).

➤ **Masse (MS-ESI) :** *m/z* [M – H][–] 280,9

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :**

δ (ppm)	Multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
4,46	triplet dédoublé	³ J = 6,5 Hz ³ J _{P-H} = 10,1 Hz	4	H-8
2,59	triplet détriplé	³ J = 6,4 Hz ³ J _{F-H} = 17,9 Hz	4	H-7

- **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)** : δ [119,7 ; 118,8 ; 118,5 ; 117,2 ; 115,6 ; 114,6 ; 113,6 ; 112,8 ; 111,2 ; 110,9 ; 110,6 ; 110,1 ; 109,8 (plusieurs couplages C-F, $^1J_{\text{C-F}}$, CF_2 et CF_3) il semblerait qu'on ait notamment 117,2 (t, $^1J_{\text{C-F}} = 256$, CF_2), 115,6 (t, $^1J_{\text{C-F}} = 288$ Hz, CF_2), 110,6 (multiplet)], 60,0 à 59,7 (m, $^3J_{\text{C-F}}$ et $^2J_{\text{C-P}}$, C-8), 31,7 (triplet dédoublé, $^2J_{\text{C-F}} = 21,5$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 7,7$ Hz, C-7)

- **RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3)** :

δ (ppm)	Multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
-80,89	triplet	$^3J = 10,3$ Hz	6	F-1
-113,4 – -113,6	Massif	/	4	F-2 à F-6
-121,8 – -122,1	Massif	/	4	
-122,9 – -123,1	Massif	/	4	
-123,5 – -123,8	Massif	/	4	
-126,2 – -126,4	Massif	/	4	

- **RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3)** : δ -113,5 (quintuplet, $^3J_{\text{P-H}} = 9,9$ Hz)

Synthèse de L-6 à L-8

La synthèse de **L-6** se fait en une étape par substitution nucléophile de l'alcool perfluoré sur l'intermédiaire PEG mésyle **I-15** (Figure 98).

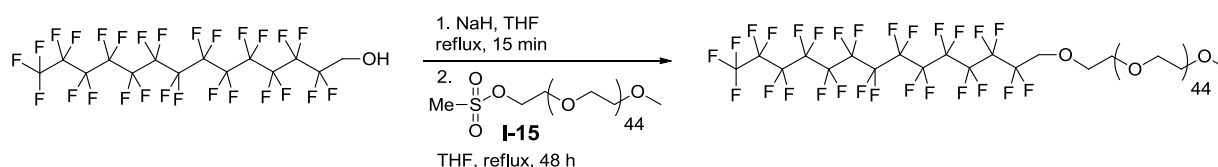


Figure 98. Schéma de synthèse de L-6.

La synthèse de **L-7** (Figure 99) et **L-8** (Figure 100) se fait par formation d'un lien amide entre un intermédiaire PEG mono amine et un ester méthylique perfluoré.

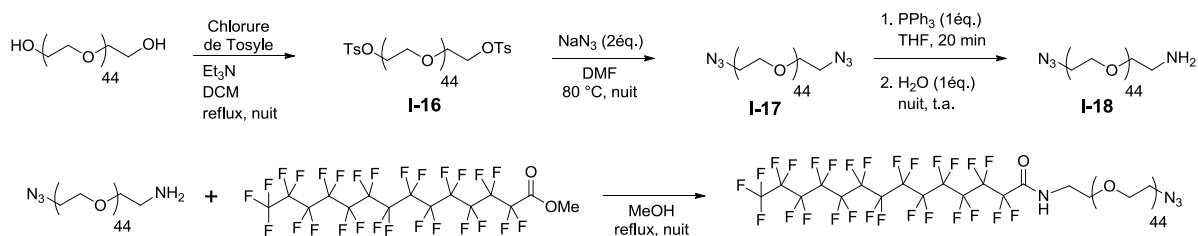


Figure 99. Schéma de synthèse de L-7.

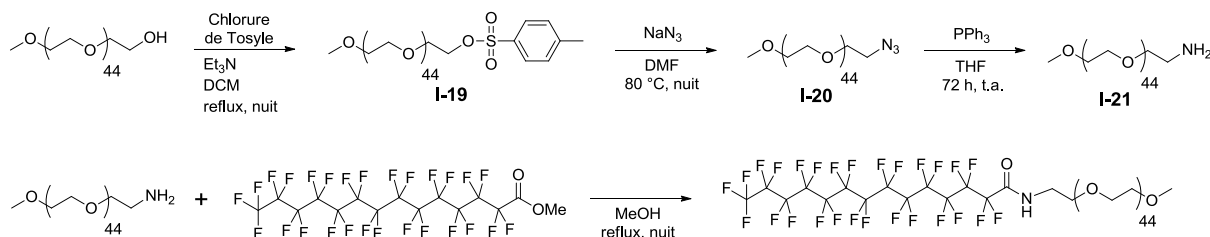
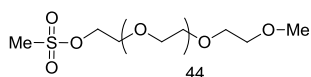


Figure 100. Schéma de synthèse de L-8

Composé I-15



I-15



I-15

➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, dans du dichlorométhane anhydre (20 mL), le PEG₂₀₀₀ monométhyl éther (2000 mg – 1 mmol – 1 éq.) est solubilisé et la triéthylamine est ajoutée (667 µL – 500 mg – 5 mmol – 5 éq.). Le chlorure de mésyle (404 µL – 600 mg – 5.3 mmol – 5 éq.) est ensuite additionné et l'ensemble est laissé à température ambiante.

Après 48 h de réaction le mélange est lavé 3 fois à l'acide chlorhydrique 1 M et une fois à la saumure. La phase organique est ensuite concentrée sous vide et le résidu est repris dans un minimum de dichlorométhane. De l'éther est ajouté jusqu'à précipitation du produit souhaité sous la forme d'un solide blanc (1605 mg – 0.77 mmol – 77 %) qui est récupéré par filtration et séché sous vide. Le produit est utilisé tel quel pour la réaction suivante.

Le composé I-15 a été synthétisé et caractérisé préalablement dans la littérature.^{159,160}

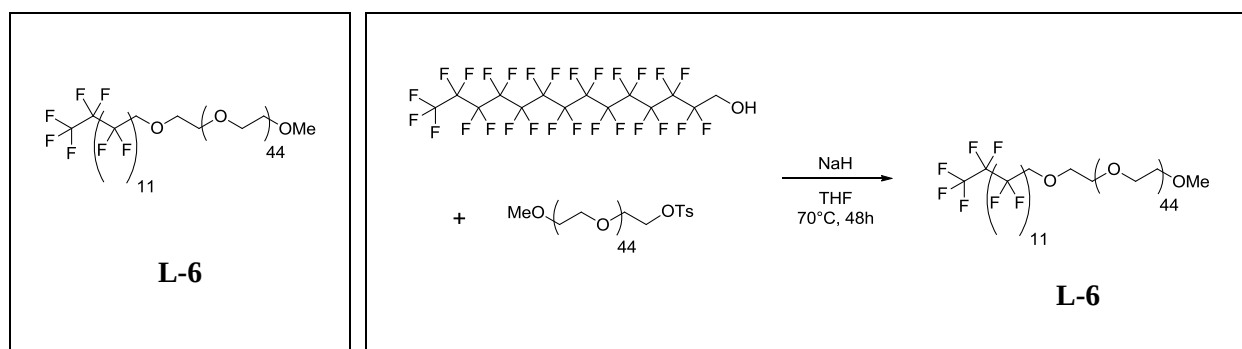
➤ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm)	Multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
4,38	Multiplet	/	2	CH ₂ OS(O ₂)Me
3,86-3,43	Massif	/	190	CH ₂ O
3,37	Singulet	/	4	CH ₃ O

¹⁵⁹D.J. Gravert, K.D. Janda *Chem. Rev.* **1997**, 97, 489.

¹⁶⁰X. Zhao, K.D. Janda *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5437.

Composé L-6



➤ **Protocole expérimental :**

Sous atmosphère d'azote, l'alcool perfluoré (1 g – 1,4 mmol – 1 éq.) et le NaH (60 mg du produit à 60 % qui est lavé au pentane – soit 35 mg de produit pur – 1,5 mmol – 1,1 éq.) sont solubilisés dans du THF anhydre (10 mL) en chauffant légèrement. Le produit **I-15** (700 mg – 0,3 mmol – 4,7 éq.) en solution dans un minimum de THF est ajouté et le tout est agité à 70 °C pendant 48 h. La réaction est ensuite arrêtée par addition d'eau (3-4 gouttes). La phase organique est ensuite concentrée sous vide et le résidu est repris dans du DCM et filtré sur coton puis le filtrat est concentré et repris dans du chloroforme et passé sur un cake de silice (CHCl₃/MeOH 9:1). Le filtrat est concentré sous vide et le résidu est repris dans un minimum de chloroforme. La solution est ajoutée goutte à goutte à de l'éther froid (50 mL) et le précipité blanc formé est récupéré par filtration (600 mg – 0,22 mmol – 67 %).

➤ **Masse (MS-ESI) :** m/z [M-HF+H]⁺ 2455,3 (massif de plusieurs pics à ± 44)

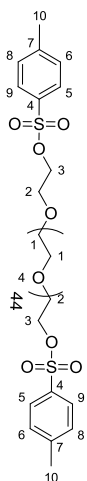
➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :**

δ (ppm)	multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
4,04	Triplet	³ J _{H-F} = 14,0 Hz	2	CH ₂ CF ₂
3,64	multiplet	/	160	CH ₂ O
3,37	Singulet	/	3	CH ₃ O

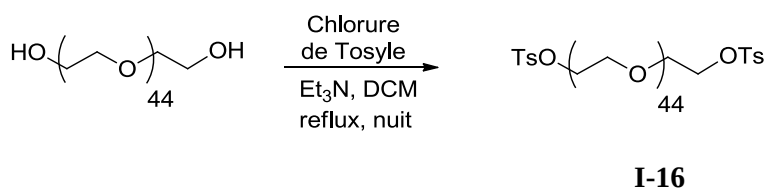
➤ RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
-80,7	triplet	$^3J = 10,3 \text{ Hz}$	3	CF_3
-119,6	Triplet	$^3J = 12,6 \text{ Hz}$	2	F-13
-122,1 – -121,5	Massif	/	16	F-2 à F-12
-122,8 – -122,5	Massif	/	2	
-123,6 – -123,3	Massif	/	2	
-126,2 – -126,0	Massif	/	2	

Composé I-16



I-16



➤ **Protocole expérimental :**

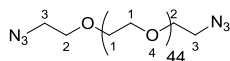
Sous atmosphère d'azote, du polyéthylène glycol (MW = 2000 – 10 g – 5 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du dichlorométhane anhydre (100 mL) suivi de chlorure de tosyle (14,4 g – 75 mmol – 15 éq.). Pour finir de la triéthylamine (9,8 mL – 73 mmol – 14,6 éq.) est ajoutée au goutte à goutte avant de chauffer à reflux durant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé pour éliminer la triéthylamine et le dichlorométhane. Une extraction dichlorométhane / eau est réalisée sur le résidu pour enlever les sels de triéthylamine. La phase organique est évaporée puis passée sur un cake de silice. L'éluant est dans un premier temps de l'acétate d'éthyle pur pour enlever le chlorure de tosyle résiduel, puis un second système d'éluant composé de dichlorométhane / méthanol 9 : 1 est utilisé pour récupérer le composé désiré. Le solvant est évaporé sous vide conduisant au composé **I-16** (8,12 g – 3,5 mmol – 70 % de rendement).

➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) :** δ 129,7 (C-aromatique), 128,7 (C-aromatique), 127,9 (C-aromatique), 125,8 (C-aromatique), 71,3 (CH₂-O), 71,1 (CH₂-O), 70,6 (CH₂-O), 70,4 (CH₂-O), 69,2 (CH₂-O), 68,6 (CH₂-O), 46,2 (trace de triéthylamine), 21,6 (C-10), 21,3 (C-10), 8,6 (trace de triéthylamine)

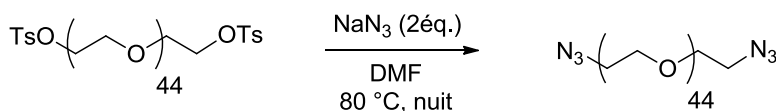
➤ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
7,80	doublet	$^3J = 8,5 \text{ Hz}$	4	H-5 et H-9
7,34	doublet	$^3J = 8,5 \text{ Hz}$	4	H-6 et H-8
4,16	triplet	$^3J = 4,8 \text{ Hz}$	4	H-3
3,72 – 3,60	massif	/	180	H-1 et H-2
2,45	singulet	/	6	H-10

Composé I-17



I-17



I-17

➤ **Protocole expérimental :**

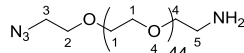
Le composé **I-16** (8 g – 3,5 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du diméthylformamide (50 mL) suivi d'azoture de sodium (863 mg – 13,3 mmol – 3,8 éq.) avant de chauffer à 80 °C à reflux durant une nuit. Le solvant est ensuite évaporé sous vide avant de réaliser une extraction liquide-liquide dichlorométhane / eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous vide, conduisant au composé **I-17** (6,47 g – 3,2 mmol – 91 % de rendement).

➤ **IR (pastille NaCl) :** 3400-3500 (moyen, très large, trace de DMF), 2925 (intense, fin, élongation C–H alcane), 2865 (intense, fin, élongation C–H alcane), 2104 (intense, fin, élongation –N₃), 1655 (trace de DMF), 1464 (moyen, fin, déformation des –CH₂), 1349 (moyen, fin), 1280 (moyen, fin), 1245 (moyen, fin), 1101 (intense, large, C–O), 945 (moyen, fin), 845 (moyen, fin), 722 (moyen, fin)

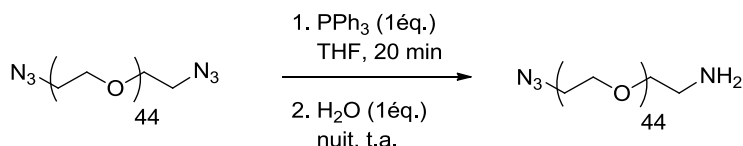
➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :**

δ (ppm)	multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	Attribution
3,74 – 3,55	massif	/	180	H-1 et H-2
3,38	triplet	³ J = 5,1 Hz	4	H-3

Composé I-18



I-18



I-18

➤ Protocole expérimental :

Sous atmosphère d'azote, le composé **I-17** (6.4 g – 3,2 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du tétrahydrofurane anhydre (25 mL) suivi de triphénylphosphine (880 mg – 3,3 mmol – 1,03 éq.). Le milieu est laissé sous agitation à température ambiante durant 20 min, puis 50 µL d'eau sont ajoutés avant de laisser agiter à température ambiante durant une nuit. Le solvant est évaporé et une extraction acétate d'éthyle / eau (+ quelques mL de HCl 0,01 M) est réalisée. La phase aqueuse est collectée et le pH ajusté à 10 avec une solution de NaOH avant d'extraire le composé dans du dichlorométhane. La phase organique est collectée et séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis le solvant évaporé sous vide, conduisant à **I-18** (5,53 g – 2,7 mmol – 70 % de rendement).

➤ **Masse (MS-ESI) :** m/z $[M+Na]^+$ 2134,3 (massif de plusieurs pics à ± 44)

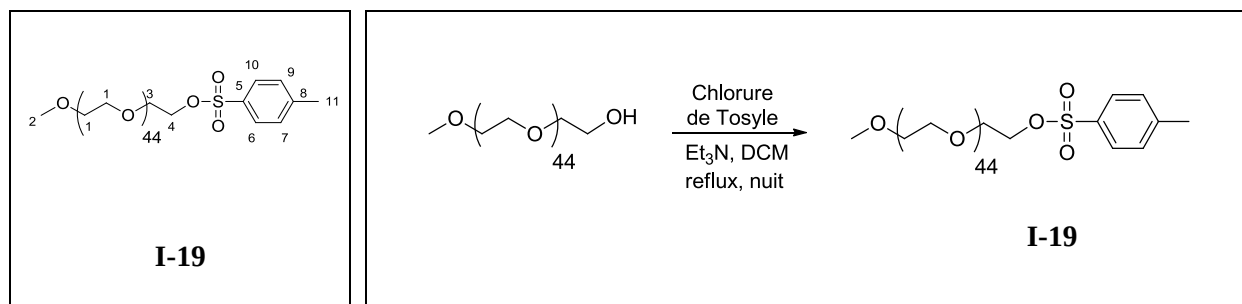
➤ **IR (pastille NaCl) :** 3400-3500 (intense, très large, N–H), 2923 (intense, fin, elongation C–H alcane), 2865 (intense, fin, elongation C–H alcane), 2104 (intense, fin, elongation $-N_3$), 1655 (trace de DMF), 1465 (moyen, fin, déformation des $-CH_2$), 1349 (moyen, fin), 1280 (moyen, fin), 1245 (moyen, fin), 1101 (intense, large, C–O), 945 (moyen, fin), 844 (moyen, fin), 724 (moyen, fin)

➤ **RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) :** δ 73,2 (C-3), 70,6 (OCH_2), 70,4 (OCH_2), 70,2 (OCH_2), 69,9 (OCH_2), 41,7 (C-5)

➤ **RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) :**

δ (ppm)	Multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	Attribution
3,76 – 3,50	Massif	/	180	H-1 et H-2 et H-4
3,38	Triplet	$^3J = 5,1$ Hz	2	H-3
2,90	Triplet	$^3J = 5,1$ Hz	2	H-5

Composé I-19



➤ Protocole expérimental :

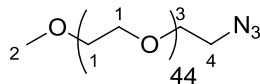
Sous atmosphère d'azote, du polyéthylène glycol mono méthoxy (MW = 2000 – 20 g – 10 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du dichlorométhane anhydre (100mL) suivi de chlorure de tosylo (17,5 g – 92 mmol – 9,2 éq.). Pour finir de la triéthylamine (15 mL – 110 mmol – 11 éq.) est ajoutée au goutte à goutte avant de chauffer à reflux durant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé pour éliminer la triéthylamine et le dichlorométhane. Une extraction dichlorométhane / eau est réalisée sur le résidu pour enlever les sels de triéthylamine. La phase organique est évaporée puis passée sur un cake de silice. L'éluant est dans un premier temps de l'acétate d'éthyle pur pour enlever le chlorure de tosylo résiduel, puis un second système d'éluant composé de dichlorométhane / méthanol 9 : 1 est utilisé pour récupérer le composé désiré. Le solvant est évaporé sous vide conduisant à 13,3 g (6,2 mmol – 62 % de rendement) du composé **I-19**.

➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** : δ 144,7 (C-5), 132,9 (C-8), 129,7 (C-6 et C-10 ou C-7 et C-9), 127,9 (C-6 et C-10 ou C-7 et C-9), 72,5 (CH₂-O), 71,8 (CH₂-O), 70,6 (CH₂-O), 70,5 (CH₂-O), 69,2 (CH₂-O), 68,6 (CH₂-O), 58,9 (C-2), 21,6 (C-11)

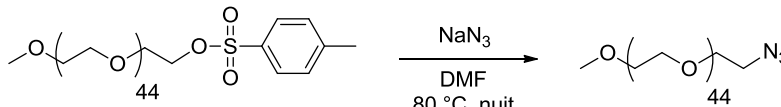
➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** :

δ (ppm)	Multiplicité	couplage ³ J (Hz)	intégration (H)	attribution
7,80	Doublet	³ J = 8,2 Hz	2	H-6 et H-10
7,34	Doublet	³ J = 8,2 Hz	2	H-7 et H-9
4,16	Triplet	³ J = 4,9 Hz	2	H-4
3,84 – 3,43	Massif	/	180	H-1 et H-3
3,38	Singulet	/	3	H-2
2,45	Singulet	/	3	H-11

Composé I-20



I-20



I-20

➤ **Protocole expérimental :**

Le composé **I-19** (10 g – 4,6 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du diméthylformamide (40 mL) suivi d'azoture de sodium (815 mg – 12,5 mmol – 2,7 éq.) avant de chauffer à 80 °C à reflux durant une nuit. Le solvant est ensuite évaporé sous vide avant de réaliser une extraction liquide-liquide dichlorométhane / eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous vide, conduisant au composé **I-20** (7,9 g – 4,0 mmol – 87 % de rendement).

➤ **Masse (MS-ESI) :** m/z $[M+Na]^+$ 2151,4 (massif de plusieurs pics à ± 44)

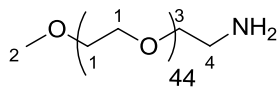
➤ **IR (pastille NaCl) :** 3432 (moyen, large, trace de DMF), 2924 (intense, fin, élongation asymétrique C–H alcane), 2878 (moyen, fin, élongation symétrique C–H alcane), 2110 (faible, fin, élongation $-N_3$), 1746 et 1642 (faible, fin, trace de DMF), 1456 (faible, fin, déformation des $-CH_2$), 1349 (faible, fin), 1290 (faible, fin), 1248 (faible, fin), 1098 (intense, large, élongation C–O), 949 (faible, fin), 841 (faible, fin)

➤ **RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) :**

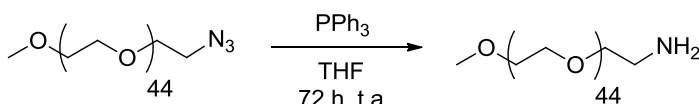
δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
3,84 – 3,44	massif	/	180	H-1 et H-3
3,39	triplet	$^3J = 5,1$ Hz	2*	H-4
3,38	singulet	/	3*	H-2

* cette valeur est une estimation car les deux signaux se superposent.

Composé I-21



I-21



I-21

➤ **Protocole expérimental :**

Sous atmosphère d'azote, le composé **I-20** (7,8 g – 3,9 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du tétrahydrofurane anhydre (50 mL) suivi de triphénylphosphine (1,2 g – 4,6 mmol – 1,2 éq.). Le milieu est laissé sous agitation à température ambiante durant 20 min, puis 100 µL d'eau sont ajoutés avant de laisser agiter à température ambiante durant 72 h. Le solvant est évaporé et une extraction acétate d'éthyle / eau (+ quelques mL de HCl 0,01 M) est réalisée, la phase aqueuse est collectée et le pH ajusté à 10 avec une solution de NaOH avant d'extraire le composé dans du dichlorométhane. La phase organique est collectée et séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis le solvant évaporé sous vide, conduisant à **I-21** (7,4 g – 3,7 mmol – 95 % de rendement).

➤ **Masse (MS-ESI) :** m/z $[M+H]^+$ 2058,2 (massif de plusieurs pics à ± 44)

➤ **IR (pastille NaCl) :** 3400-3550 (intense, très large, N–H + trace de DMF), 2876 (intense, large, élongation C–H alcane), 1639 (trace de DMF), 1452 (moyen, fin, déformation des –CH₂), 1352 (moyen, fin), 1322 (faible, fin), 1295 (moyen, fin), 1251 (moyen, fin), 1100 (intense, large, C–O), 1035 (moyen, large, C–O), 905 (moyen, fin), 846 (moyen, fin), 727 (moyen, fin)

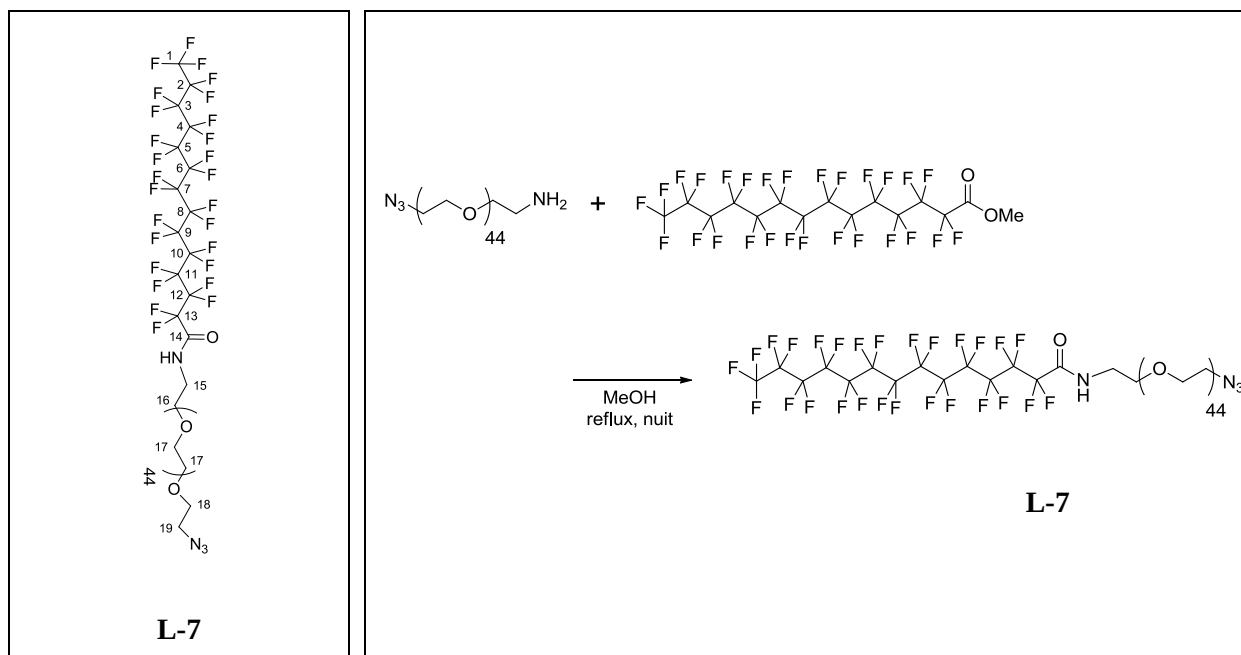
➤ **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) :** δ 73,3 (CH₂–O), 71,8 (CH₂–O), 70,5 (CH₂–O), 70,2 (CH₂–O), 59,0 (C-2), 41,7 (C-4)

➤ **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) :** *

δ (ppm)	multiplicité	couplage ⁿ J (Hz)	intégration (H)	attribution
3,84 – 3,44	massif	/	180	H-1 et H-3
3,38	singulet	/	3	H-2
2,88	triplet	³ J = 5,0 Hz	2	H-4

* trace de DMF dans le spectre RMN

Composé L-7



➤ Protocole expérimental :

Le composé **I-18** (1,07 g – 0,5 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du méthanol (30 mL) suivi de perfluorotetradécanoate de méthyle (352 mg – 0,48 mmol – 0,96 éq.). Le milieu est laissé sous agitation au reflux du méthanol durant une nuit. Le solvant est évaporé et le composé purifié sur colonne de silice de type combiflash avec un gradient dichlorométhane/méthanol 9 : 1. Les fractions contenant **L-7** sont collectées et le solvant évaporé, conduisant à un solide jaune pâle amorphe **L-7** (400 mg – 0,15 mmol – 30 % de rendement).

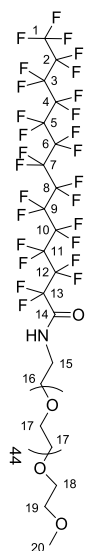
- **Masse (MS-ESI) :** m/z $[M+2H]^{2+}$ 1223,7 (centre du massif de plusieurs pics à ± 22)
- **IR (pastille NaCl) :** 3660-3132 (intense, très large, élongation NH), 2113 (moyen, élongation $-N_3$), 1639 (intense, large, élongation C=O), 1459 (moyen, fin, déformation $-CH_2$), 1352 -1000 (moyen, très large, C–O–C et C–F)
- **RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) :**

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
7,38	singulet	/	0,87	-NH-CO-
3,84 – 3,44	multiplet	/	180	H-16, H-17 et H-18
3,39	triplet	$^3J = 5,0$ Hz	2	H-19

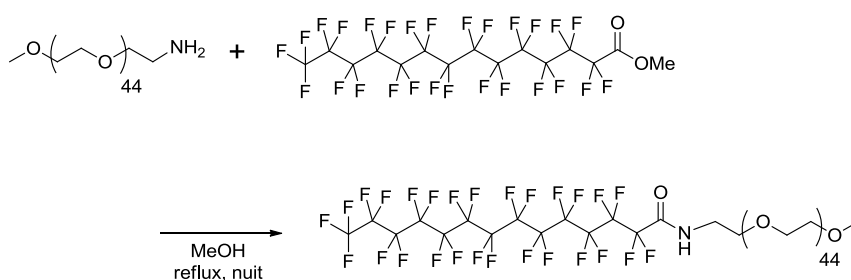
➤ RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
-80,7	triplet	$^3J = 10,3$ Hz	3	F-1
-119,6	triplet	$^3J = 11,5$ Hz	2	F-13
-121,4 – -121,9	multiplet	/	16	F-2 à F-12
-122,4 – -122,6	multiplet	/	4	
-122,6 – -122,7	multiplet	/		
-126,0 – -126,1	multiplet	/	2	

Composé L-8



L-8



L-8

➤ Protocole expérimental :

Le composé **I-21** (5,23 g – 2,6 mmol – 1 éq.) est solubilisé dans du méthanol (40 mL) suivi de perfluorotetradécanoate de méthyle (1,83 g – 2,6 mmol – 1 éq.). Le milieu est laissé sous agitation au reflux du méthanol durant une nuit. Le solvant est évaporé et le composé purifié sur colonne de silice de type combiflash avec un gradient dichlorométhane/méthanol 9 : 1. Les fractions contenant L-8 sont collectées et le solvant évaporé, conduisant à un solide blanc amorphe **L-8** (650 mg – 0,24 mmol – 10 % de rendement).

- **Masse (MS-ESI) :** m/z $[M+2H]^{2+}$ 1355,2 (centre du massif de plusieurs pics à ± 22)
- **IR (pastille NaCl) :** 3519 (intense, large, élongation NH), 2879 (intense, fin, élongation $-\text{CH}_2$), 1710 (intense, fin, élongation CO), 1641 et 1546 (moyen, fin, déformation NH), 1467 et 1456 (moyen, fin, déformation $-\text{CH}_2$), 1340-1000 (intense, large, C–O–C et C–F)
- **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) :**

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
7,47	singulet	/	0,89 (1)	-NH-CO-
3,84 – 3,44	multiplet	/	180	H-15 à H-19
3,38	singulet	/	2	H-20

RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm)	multiplicité	couplage ^nJ (Hz)	intégration (H)	attribution
-80,7	triplet	$^3J = 10,3$ Hz	3	F-1
-119,5	triplet	$^3J = 11,5$ Hz	2	F-13
-121,4 – -122,0	multiplet	/	16	F-2 à F-12
-122,4 – -122,6	multiplet	/	4	
-122,6 – -122,7	multiplet	/		
-126,0 – -126,1	multiplet	/	2	

Préparation de QD@L-6

Échange de ligands et passage dans l'eau

500 μL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 36 μM ($1,8 \cdot 10^{-8}$ mol) sont précipités dans l'éthanol (2 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Le culot est resuspendu dans 3 mL de chloroforme. À cela est ajoutée une solution de **L-5** (122 mg – 0,15 mmol soit 8 000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans l'héxane perfluoré (3 mL). Le mélange est laissé sous vive agitation à température ambiante durant la nuit. La phase organique (CHCl_3) est enlevée et la phase perfluorée est lavée à 3 reprises avec du trifluoroéthanol (3 mL). L'hexane perfluoré est évaporé sous flux d'azote afin de concentrer la solution jusqu'à une centaine de microlitres. Cette solution concentrée est ensuite ajoutée à une solution de **L-6** (31 mg – 11 μmol) dans l'eau (3 mL). Le tout est agité avec une sonde à ultrasons, conduisant à l'évaporation du solvant perfluoré et au passage des particules dans l'eau. La solution aqueuse est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats.

Purification de QD@L-6

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspin avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés (30 min, 50000 tr min^{-1}). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est enlevé par centrifugation sur vivaspin (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Préparation de QD@L-7

Échange de ligands et passage dans l'eau

250 μL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 36 μM ($0,9 \cdot 10^{-8}$ mol) sont précipités dans l'éthanol (2 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Le culot est resuspendu dans 3 mL de chloroforme. À cela est ajoutée une solution de L-5 (51 mg – 0,06 mmol soit environ 7000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans l'hexane perfluoré (3 mL). Le mélange est laissé sous vive agitation durant 15 min à température ambiante, conduisant au transfert de phase des QD. La phase organique (CHCl_3) est enlevée et la phase perfluorée est lavée à 3 reprises avec du trifluoroéthanol (3 mL). L'hexane perfluoré est évaporé sous flux d'azote afin de concentrer la solution jusqu'à une centaine de microlitres. Cette solution concentrée est ensuite ajoutée à 3 mL d'une solution aqueuse de L-7 (16 mg – 6 μmol). Le tout est agité avec une sonde à ultrasons, conduisant à l'évaporation du solvant perfluoré et au passage des particules dans l'eau. La solution aqueuse est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats.

Purification de QD@L-7

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspinn avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés (30 min, 50000 tr min^{-1}). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspinn (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Préparation de QD@L-8

Échange de ligands et passage dans l'eau

250 μL d'une solution de QD de type CdSe/CdS/ZnS à 36 μM ($0,9 \cdot 10^{-8}$ mol) sont précipités dans l'éthanol (2 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 $\times g$). Le culot est resuspendu dans 3 mL de chloroforme. À cela est ajoutée une solution de **L-5** (51 mg – 0,06 mmol soit environ 7000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans l'hexane perfluoré (3 mL). Le mélange est laissé sous vive agitation durant 15 min à température ambiante, conduisant au transfert de phase des QD. La phase organique (CHCl_3) est enlevée et la phase perfluorée est lavée à 3 reprises avec du trifluoroéthanol (3 mL). L'hexane perfluoré est évaporé sous flux d'azote afin de concentrer la solution jusqu'à une centaine de microlitres. Cette solution concentrée est ensuite ajoutée à 3 mL d'une solution aqueuse de **L-8** (32 mg – 12 μmol). Le tout est agité avec une sonde à ultrasons, conduisant à l'évaporation du solvant perfluoré et au passage des particules dans l'eau. La solution aqueuse est centrifugée (5 min, 10 000 $\times g$) afin d'enlever les agrégats.

Purification de QD@L-8

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 $\times g$ sur vivaspinn avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés (30 min, 50000 tr min^{-1}). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspinn (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Échange de ligands et passage dans l'eau

2 mL d'une solution de QD de type CuInS₂/ZnS à environ 30 μM (60 nmol) sont précipités dans le méthanol (8 mL) par centrifugation (5 min, 15 500 ×g). Le culot est repris dans du chloroforme (2 mL). À cela est ajoutée une solution de **L-5** (220 mg – 0,25 mmol soit environ 4000 équivalents par rapport aux nanoparticules) dans l'hexane perfluoré (3 mL). Le mélange est laissé sous vive agitation durant la nuit à température ambiante, conduisant au transfert de phase des QD. La phase organique (CHCl₃) est enlevée et la phase perfluorée est lavée à 3 reprises avec du trifluoroéthanol (3 mL). L'hexane perfluoré est évaporé sous flux d'azote afin de concentrer la solution jusqu'à une centaine de microlitres. Cette solution concentrée est ensuite ajoutée à 3 mL d'une solution aqueuse de **L-6** (60,6 mg – 22 μmol). Le tout est agité avec une sonde à ultrasons, conduisant à l'évaporation du solvant perfluoré et au passage des particules dans l'eau. La solution aqueuse est centrifugée (5 min, 10 000 ×g) afin d'enlever les agrégats.

Purification de QD_{NIR}@L-6

La surnageant collecté est concentré par centrifugation à 10 000 ×g sur vivaspinn avec un cut-off de 50 kDa. Les 200 μL de solution concentrée sont ensuite placés sur un gradient de sucrose allant de 40 % à 10 % puis ultracentrifugés à (20 min, 50 000 tr min⁻¹). La bande correspondant aux QD est collectée puis le sucrose est éliminé par centrifugation sur vivaspinn (plusieurs rinçages à l'eau distillée) avec un cut-off de 50 kDa.

Annexe 1

ANNEXE 1 : Notions de radioactivité et de la technique de comptage par scintillation liquide.

1 Brève introduction à la physique nucléaire.

1.1 Graphique des nucléides en physique nucléaire.

Dans le tableau périodique des éléments de Mendeleïev la classification se fait selon le nombre de protons des noyaux. Tous les éléments ayant un même nombre de protons, aussi appelés *isotopes*, sont regroupés dans une même case. On dénombre ainsi 90 éléments naturels et 13 éléments artificiels. Cependant cette classification ne convient pas pour la physique nucléaire où les isotopes doivent être différenciés, il est donc primordial de classer les éléments en fonction de leur nombre de protons mais également de neutrons. Ce classement se fait sur un graphique ayant pour abscisse le nombre de protons du noyau (allant de 1 à 104) et pour ordonnée le nombre de neutrons (allant de 0 à 160). Ainsi chaque noyau, aussi appelé *nucléide*, occupe une case précise dans ce tableau où les isotopes sont différenciés mais occupent une même colonne (nombre de protons constant). Ce graphique est appelé *tableau ou graphique des nucléides* et est représenté en Figure 101.

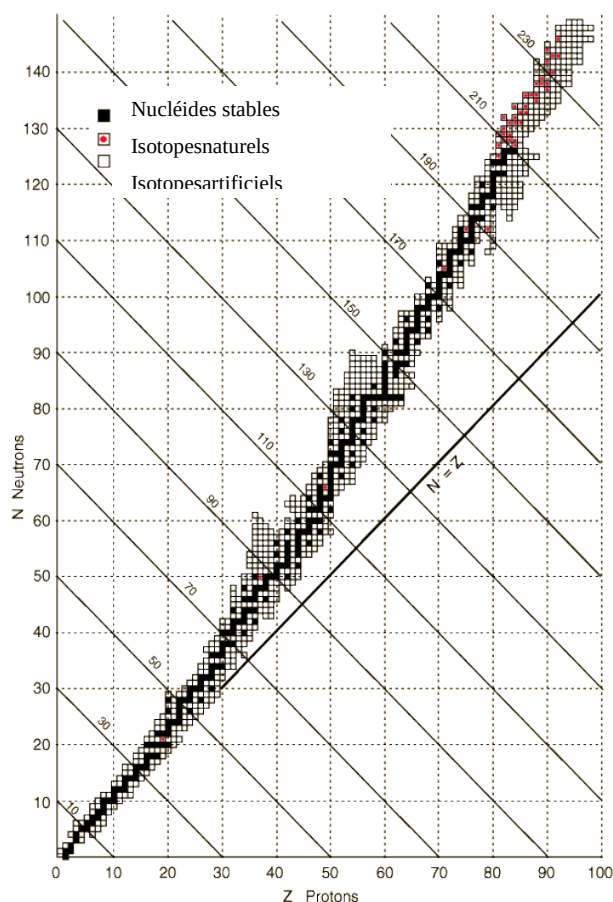


Figure 101. Graphique des nucléides.

On dénombre dans ce classement 1525 isotopes dont seulement 325 sont d'origine naturelle. La stabilité des noyaux est directement liée au rapport du nombre de neutrons sur le nombre de protons. On peut ainsi définir quatre zones sur le graphique, délimitées par la ligne formée par les isotopes stables (cases noires du graphique). Cette ligne est la zone dite *de stabilité* dans laquelle le rapport neutrons sur protons permet la stabilité du noyau.

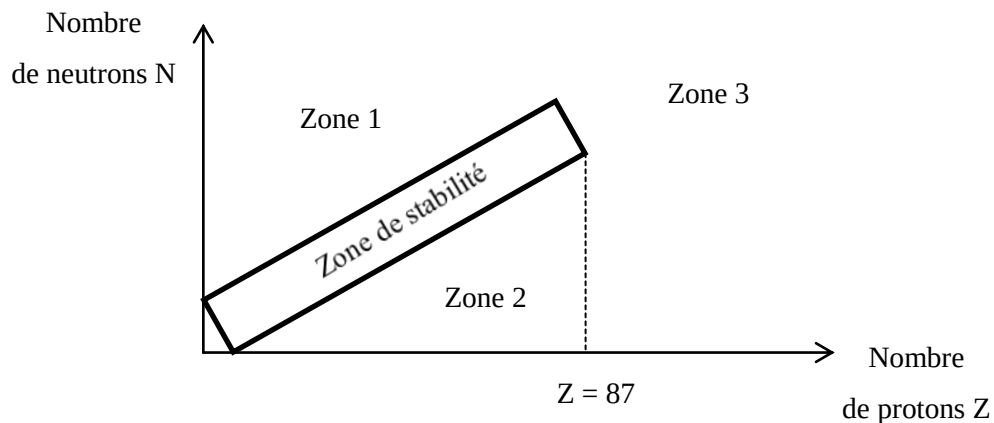
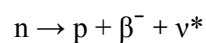


Figure 102. Schéma des quatre zones dans le graphique des nucléides.

Lorsque les noyaux sont situés dans la zone 1 (Figure 102), ils possèdent trop de neutrons par rapport aux protons pour être stables. Dans la zone 2 les noyaux possèdent trop de protons par rapport aux neutrons et au-delà de 87 protons les noyaux sont trop gros pour être stables (zone 3).

1.2 La Désintégration radioactive β^- .

Il existe divers types de désintégrations radioactives en fonction de la zone d'instabilité à laquelle appartient le nucléide. Ces désintégrations auront pour effet de ramener le nucléide instable dans la zone de stabilité. Lorsque le noyau possède un trop grand nombre de neutrons par rapport aux protons (nucléide situé dans la zone 1) il va y avoir transformation d'un neutron en proton selon l'équation :

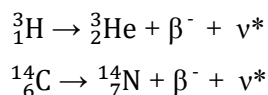


Où β^- est une particule constituée d'un e^- , émis par le noyau ;

ν^* est un anti-neutrino, particule sans charge électrique de masse très faible, environ 1/10 000 de l'électron.

Cette transformation aura pour conséquence d'augmenter le nombre de protons du noyau d'une unité tout en laissant le nombre de masse constant. Autrement dit, il va y avoir un changement de case dans le tableau périodique. On appelle cela une transmutation.

Le phénomène que l'on appelle *désintégration radioactive* est la combinaison de l'émission β^- et de la transmutation. Le tritium ainsi que le carbone 14 font partie des émetteurs β^- et vont donner lieu aux transformations suivantes :



Les particules β^- et les anti-neutrinos vont être émis avec une énergie cinétique déterminée. La somme de ces deux énergies cinétiques est liée à la différence de masse entre l'atome de départ et celui d'arrivée selon l'équation d'Einstein : $E = mc^2$

La répartition de l'énergie entre la particule beta et l'anti-neutrino n'est pas constante d'une désintégration à l'autre. Si l'on observe la distribution énergétique des β^- on remarque qu'elle est comprise entre deux valeurs extrêmes allant de 0 à une valeur maximale $E_{\max}$. Cela s'explique par le fait que dans un cas l'anti-neutrino a emmené toute l'énergie et donc que la particule β^- est émise avec une énergie égale à 0 et dans l'autre cas toute l'énergie est portée par la particule β^- . Cette valeur d'énergie maximale ($E_{\max}$) est propre à chaque radioisotope.

Pour finir, on peut classer les émetteurs β^- en deux catégories. Il y a les émetteurs β^- dits purs et les autres. Cette notion différencie les noyaux qui vont émettre uniquement des rayonnements β^- et former un isotope stable, des noyaux qui vont engendrer après rayonnement β^- des isotopes instables qui vont se désexciter par émission d'un rayonnement γ et/ou par conversion interne. La majorité des radioisotopes, qu'ils soient émetteurs β^- , β^+ ou α , émettent également un rayonnement γ . Cependant les radioisotopes les plus utilisés pour le marquage isotopique en chimie et en biologie (${}^3\text{H}$, ${}^{14}\text{C}$, ${}^{35}\text{S}$, ${}^{32}\text{P}$, ${}^{45}\text{Ca}$) sont des émetteurs β^- purs. L'avantage de travailler avec des émetteurs β^- purs se situe au niveau de la radioprotection. Il est en effet plus facile de se protéger d'un rayonnement β que d'un rayonnement γ . En revanche, il est plus facile de détecter un rayonnement γ que β , surtout lorsque le niveau d'énergie β est faible.

1.3 Interaction des particules β^- avec la matière.

Lorsqu'un rayonnement, comme par exemple des particules β^- , traverse la matière, il va se produire des transferts d'énergie ou des modifications de trajectoires qu'on appelle interactions. Ces interactions se produisent entre les particules qui traversent le milieu et le nuage électronique, le noyau ou les atomes constitutifs de ce milieu.

1.3.1 Interaction avec le nuage électronique.

Lorsqu'il y a interaction avec le nuage électronique on aura soit une ionisation par perte d'un électron périphérique soit excitation par migration d'un électron périphérique vers une orbitale de plus haute énergie.

1.3.2 Interaction avec le noyau.

Si l'interaction se produit avec le champ électrique du noyau, la trajectoire et/ou la vitesse de l'électron β^- seront modifiées ce qui entraînera, d'après les équations de Maxwell, l'émission de photons de haute énergie (rayon X). Ce phénomène est appelé rayonnement de freinage ou Bremsstrahlung. La perte d'énergie due à ce phénomène est proportionnelle à l'énergie de la particule β^- et au numéro atomique de l'élément constitutif du milieu traversé. Ainsi le pourcentage d'énergie perdu par rayonnement de freinage d'une particule β^- sera plus élevé dans du plomb que dans du plexiglas. Ceci explique pourquoi on n'utilise pas d'écran de plomb pour se protéger des rayonnements β^- .

1.3.3 Interaction avec les atomes.

L'interaction la plus connue est l'effet Tcherenkov qui se produit lorsqu'une particule chargée se déplace plus vite que la lumière dans un matériau. Il se crée alors une onde de choc, comparable au passage du mur du son pour les avions, qui va produire un rayonnement électromagnétique le long de la trajectoire de la particule. Il faut une énergie minimale pour que l'effet Tcherenkov puisse avoir lieu. Ce niveau d'énergie dépend de la masse de la particule ainsi que de l'indice de réfraction du milieu. Pour un rayonnement β^- dans l'eau, ce seuil est de 0,26 MeV. L'effet Tcherenkov est notamment utilisé pour mesurer l'activité du phosphore 32.

En résumé, les diverses interactions entre les particules β^- et la matière vont permettre de détecter le rayonnement provenant d'émetteurs β^- en détectant l'ionisation d'un atome (compteur à gaz), l'excitation du nuage électronique d'un atome (compteur à scintillation) ou grâce à l'effet Tcherenkov auquel cas le milieu détecteur est l'eau.

1.3.4 Trajectoire des particules β^- dans la matière.

Nous avons décrit précédemment les diverses interactions possibles entre les particules β^- avec les éléments constitutifs du matériau traversé. En plus d'occasionner une perte d'énergie, chacune de ces interactions va entraîner une modification de la direction de la particule, ainsi la trajectoire ne sera pas linéaire mais plus ou moins sinueuse selon son niveau d'énergie. Plus l'énergie de la particule sera faible et plus le nombre d'interactions sera grand. Une particule de faible énergie aura donc une trajectoire plus sinueuse (plus d'interactions) qu'une particule de forte énergie. Par exemple, prenons deux particules β^- ayant respectivement une énergie de 10^3 keV et 10 keV, la première va perdre 0,25 keV par μm parcouru dans l'eau, alors que la seconde perdra 2,5 keV. La particule de plus faible énergie aura eu plus d'interactions et donc perdu plus d'énergie que la particule de haute énergie. Ces modifications de trajectoire vont faire que deux particules de même énergie n'auront pas forcément le même parcours et donc pas la même profondeur de pénétration dans un matériau donné. Il est possible dans le cas des particules β^- de calculer la distance maximale qu'une particule d'énergie donnée pourra parcourir dans un matériau. On appelle cela le *parcours maximum*. Ce parcours maximum dépendra du niveau d'énergie de la particule mais aussi de la densité du matériau traversé. Il peut s'exprimer en unité de longueur, ainsi pour une énergie de particule β donnée, on aura une valeur de parcours maximum exprimée en unité de longueur pour chaque matériau. Par exemple pour une particule β^- de 1 MeV la distance parcourue dans l'air sera de 3,37 m, dans les tissus biologiques 4 mm ou encore 0,5 mm dans le fer. On peut aussi exprimer le parcours en masse superficielle, on aura alors une unique valeur par énergie. La masse superficielle s'exprime généralement en g.cm^{-2} . Pour passer d'un parcours en masse superficielle à un parcours linéique on utilise la relation :

$$P_{cm} = \frac{P_{\text{g.cm}^{-2}}}{\rho}$$

Où P est la valeur des parcours.

ρ est la masse volumique du matériau traversé en g.cm^{-3} .

Sachant qu'une particule de 1 MeV a un parcours en masse superficielle de $0,4\text{g.cm}^{-2}$ son parcours linéique dans l'eau ($\rho = 1$) ou le plomb ($\rho = 11,4$) sera de :

eau :
$$P_{cm} = \frac{0,4}{1} = 0,4 \text{ cm}$$

plomb :
$$P_{cm} = \frac{0,4}{11,4} = 0,035 \text{ cm}$$

Il existe des formules et des abaques pour la détermination du parcours maximal en fonction de l'énergie de la particule.

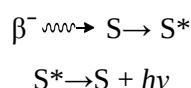
Dans le cas particulier du tritium qui est un émetteur β^- pur, son E_{max} est de 18,6 keV, le parcours en masse superficielle vaut alors $0,1 \text{ mg.cm}^{-2}$ ce qui donne un parcours maximum dans l'eau d'environ $1 \mu\text{m}$. Le fait que le parcours soit si faible empêche toute exposition externe. Cependant, l'inconvénient est que sa détection est très difficile pour la même raison.

2 Principe du comptage par scintillation liquide.

Comme nous venons de le voir, certains émetteurs β^- (notamment le tritium) émettent un rayonnement β ayant un très faible parcours. Leur détection va pouvoir se faire en introduisant l'échantillon radioactif directement dans le détecteur qui se présente sous forme liquide et qui possède des propriétés de fluorescence ; on l'appelle le *liquide scintillant*.

2.1 Le liquide scintillant.

Les interactions entre le rayonnement β^- et la matière peuvent se présenter sous la forme d'une excitation du nuage électronique. Dans le cas d'une molécule fluorescente cela se traduira par une excitation suivie d'un retour à l'équilibre par émission d'un photon. Selon le schéma suivant :



Où S est une molécule de scintillateur à l'état fondamental

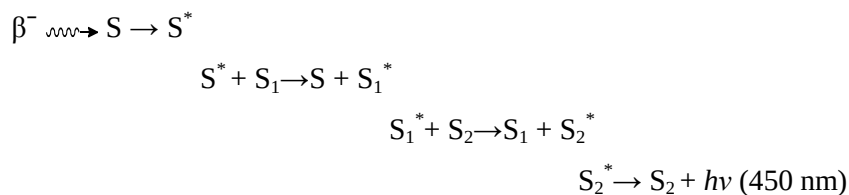
S^* est une molécule de scintillateur à l'état excité

$h\nu$ correspond aux photons de fluorescence

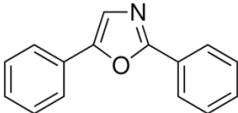
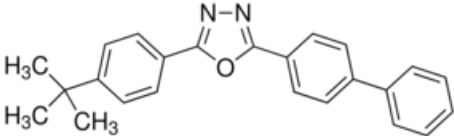
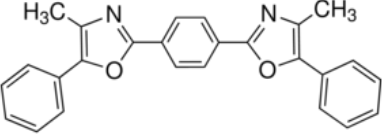
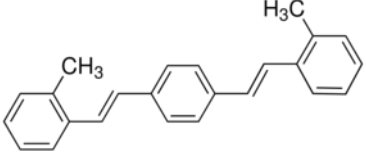
Dans le cas de la scintillation liquide, ce fluorophore doit être liquide pour pouvoir y dissoudre l'échantillon. Les scintillateurs les plus couramment utilisés sont des composés aromatiques dérivés du benzène. Le benzène n'étant pas utilisé car il est carcinogène, on utilisera plutôt le toluène, le xylène ou le cumène. La longueur d'onde de fluorescence de ces composés se situe dans l'ultra-violet vers 270 nm. Ceci pose problème car cette longueur d'onde ne traverse pas le verre ou la matière plastique qui constituent les fioles utilisées pour le comptage. C'est pourquoi, il a fallu utiliser des liquides

scintillants plus complexes qui sont composés d'un solvant (toluène, xylène,...) dans lequel on ajoute des fluorophores dont le rôle va être de déplacer la bande de fluorescence de 270 nm vers 450 nm. En général, il n'y a pas qu'un fluorophore mais plutôt deux, qui sont appelés « soluté primaire » (S_1) et « soluté secondaire » (S_2). Il est nécessaire d'avoir le soluté S_1 car le transfert d'énergie entre le solvant et S_2 ne peut pas se faire directement car il n'y a pas recouvrement entre la bande d'émission de fluorescence du solvant et la bande d'absorption du soluté S_2 .

Les transferts d'énergies sont schématisés ci-dessous :



Au fil des années, de nombreux liquides scintillants ont été mis au point. Il en existe aujourd'hui toute une gamme qui permet de mesurer des échantillons basiques, acides et même des solutions aqueuses. Ceci a été rendu possible grâce au développement de nouveaux fluorophores (S_1 et S_2) et à l'utilisation de surfactants. Les scintillateurs historiquement et classiquement utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Solutés primaires (S_1)	 2,5-diphényloxazole PPO	 2-(4- <i>tert</i> -butylphényl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole Butyl-PBD
Solutés secondaires (S_2)	 1,4-bis-2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène Diméthyl-POPOP	 <i>p</i> -bis(O-méthylstyryl)-benzène Bis-MSB

2.2 Mesure et traitement du signal.

Une particule β^- émise va interagir avec le liquide scintillant, de la manière décrite précédemment, et produire plusieurs photons lumineux. Cette émission est appelée scintillation. Le nombre de scintillations est proportionnel au nombre de particules β^- émises dans le milieu scintillant. De plus, l'intensité lumineuse sera proportionnelle à l'énergie de la particule β absorbée.

Les scintillations émises de la fiole contenant le liquide scintillant et de l'échantillon radioactif vont être mesurées à l'aide d'une photocathode. Cette dernière va convertir le signal lumineux en impulsion électrique. Le signal électrique au niveau de la photocathode étant très faible, il va falloir l'amplifier avec un photomultiplicateur. Cette technique de mesure présente cependant un inconvénient majeur : la photocathode et le photomultiplicateur libèrent spontanément sous l'effet de l'agitation thermique des électrons qui vont former un signal parasite. Ce phénomène s'appelle *mouvement propre*. Les impulsions du mouvement propre et celles provenant réellement de l'échantillon ne peuvent malheureusement pas être triées d'un point de vue de l'amplitude. Il a donc fallu mettre au point une méthode pour s'affranchir du mouvement propre en employant deux photocathodes diamétralement opposées qui vont mesurer simultanément l'échantillon. Une particule β^- , en excitant le liquide scintillant, va produire la formation de photons qui vont diffuser dans toutes les directions de l'espace, ainsi ces photons pourront être détectés simultanément par les deux photocathodes. Le mouvement propre par contre est différent d'une photocathode à l'autre, ainsi, en utilisant un circuit électronique de coïncidence qui ne conservera que les signaux provenant des deux photocathodes avec un décalage inférieur à 15 ns environ, il est possible de s'affranchir presque totalement du mouvement propre. La probabilité pour qu'il y ait une coïncidence dans les impulsions des mouvements propres des deux photocathodes est de 1 à 2 impulsions par minute alors qu'à l'origine le mouvement propre représente 10^5 impulsions par minute.

Au final, les signaux en coïncidence sont amplifiés et traités par un logiciel et le signal final exprimé en impulsions par minute pourra être relié au nombre de désintégrations par minute grâce à la relation suivante :

$$E = \frac{\text{impulsions par minute}}{\text{désintégrations par minute}}$$

Où E est l'efficacité de comptage qui pourra être déterminée grâce à des échantillons standards.

2.3 Effets de « quenching »

La cascade de réactions à l'origine du signal lumineux mesuré en scintillation (cf. 2.1.) se fait parfaitement lorsqu'il n'y a aucun composé autre que le liquide scintillant. Cependant les composés apportés par l'échantillon peuvent interagir avec les composants du scintillant et altérer les divers transferts d'énergie. On appelle ce phénomène le « quenching ». Il existe deux types de quenching :

- (i) le quenching chimique : lorsque des composés agissent sur le transfert d'énergie entre le solvant et les chromophores ou entre le premier chromophore et le second chromophore. Ils vont absorber l'énergie et la convertir de façon interne par une voie non-radiative.
- (ii) le quenching couleur : lorsque des composés absorbent dans le bleu et vont empêcher les photons issus de la scintillation d'atteindre le capteur.

Annexe 2

ANNEXE 2 : Notions de concentration micellaire critique (CMC) et de paramètre d'empilement critique (CPP)

1 Les composés amphiphiles

Les molécules amphiphiles (du grec *amphi* qui signifie les deux) sont aussi connues sous le nom de surfactants, tensioactifs ou détergents. La particularité de ces composés est leur dualité intrinsèque. En effet, ils se composent d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Ils peuvent être classés en 4 catégories selon la nature de la partie hydrophile (Figure 103). Cette dualité fait qu'ils possèdent des propriétés de solubilisation dans l'eau hors du commun. Ils ont notamment la faculté de former des auto-assemblages que l'on nomme *micelles*. Cependant, la formation de ces micelles est soumise à plusieurs paramètres, dont la concentration en amphiphiles et le rapport de taille entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile. Pour comprendre la formation des micelles, il nous faut tout d'abord comprendre comment ces objets sont solubilisés dans l'eau et ce qu'il se passe en augmentant leur concentration.

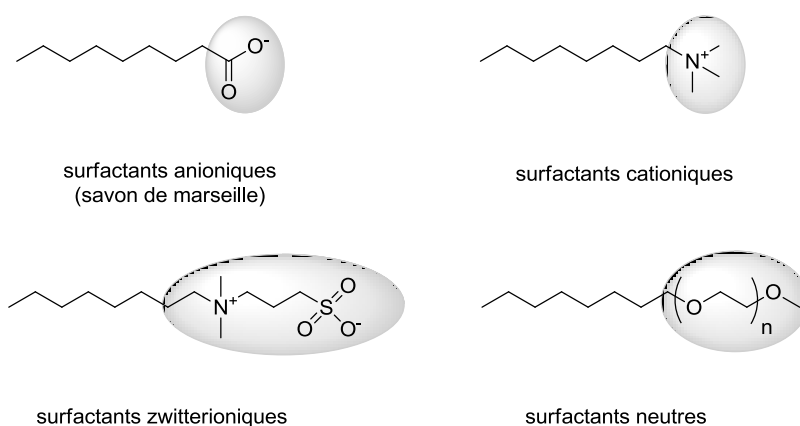


Figure 103. Catégories de surfactants

1.1 Solubilisation des amphiphiles dans l'eau

Lorsque l'on solubilise des surfactants dans l'eau, en augmentant petit à petit leur concentration, on distingue trois grandes phases (Figure 104) :

- (i) accumulation de surfactants à l'interface air-eau.
- (ii) saturation de l'interface air-eau.
- (iii) formation de micelles.

Dans un premier temps les molécules d'amphiphiles vont être solubles dans l'eau, puis en augmentant la concentration elles vont se placer à l'interface air-eau (i), la partie hydrophobe (souvent une chaîne carbonée) va s'orienter du côté de la phase gazeuse. Au fur et à mesure que la concentration en amphiphile augmente, la densité de molécules à l'interface augmente, diminuant la tension de surface de l'eau, d'où le nom de tensioactif. À partir d'une certaine concentration, l'interface air-eau va être saturée (ii), plus aucune molécule ne pourra se placer à l'interface et la tension de surface aura été abaissée à son minimum et demeurera à peu près constante. À ce stade, la concentration micellaire critique (CMC) est atteinte. Si l'on va au-delà de cette concentration (iii), un phénomène de séparation de phases et de dispersion moléculaire en solution apparaît, engendrant des microphases dans lesquelles les surfactants s'auto-organisent. Dans ces phases, les chaînes lipophiles interagissent entre elles, formant un domaine hydrophobe au cœur de la micelle. Les parties hydrophiles vont, quant à elles, s'orienter du côté de la phase aqueuse. Les chaînes de carbone dans ce type d'assemblage sont généralement désordonnées et le cœur de la micelle se comporte comme un petit volume liquide de chaînes carbonées¹⁶¹.

¹⁶¹Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes, *John Wiley and Sons* **1991**, chapitre 6.

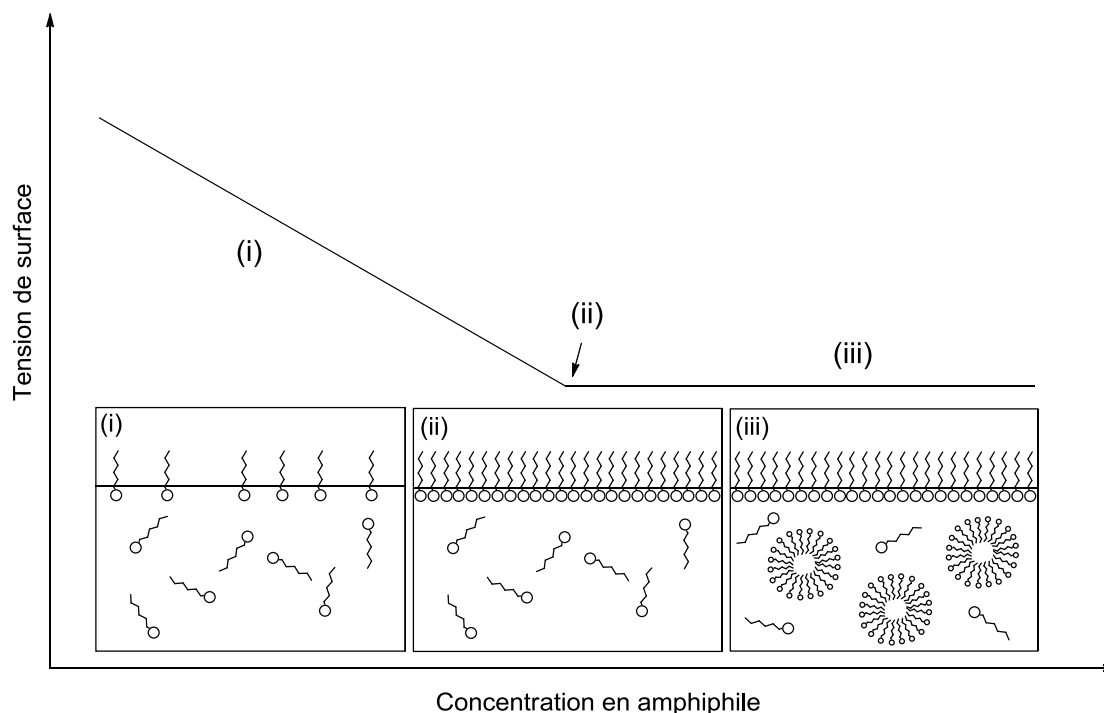


Figure 104. Schéma de l'évolution de la structure des amphiphiles en solution en fonction de leur concentration.

Le terme *micelle* n'est pas uniquement réservé à des agrégats sphériques, il peut désigner toutes formes d'agrégats solubles formés spontanément et de manière réversible. Ces agrégats pouvant avoir une forme sphérique, cylindrique ou former des liposomes voir des bicouches planes.¹⁶²

1.2 Détermination et utilité du paramètre d'empilement critique

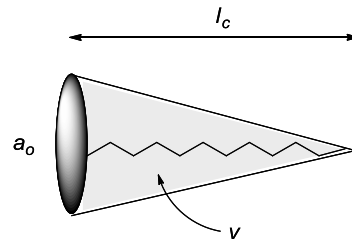
Des travaux ont été menés, notamment par Israelachvili¹⁶², afin de prédire la structure d'une micelle à partir des caractéristiques de l'amphiphile. Les travaux d'Israelachvili conduisirent à l'élaboration d'un paramètre nommé *paramètre d'empilement critique* ou, en anglais, *critical packing parameter* (*CPP*) permettant de prédire la taille et la forme des micelles. Cependant, cette prédiction n'est exploitable que lorsque les chaînes lipophiles du cœur hydrophobe de la micelle se comportent comme un fluide. Dans le cas d'une structure cristalline il sera beaucoup plus compliqué de prédire la forme de la micelle¹⁶³.

¹⁶²Israelachvili, J. N. Book: Intermolecular and surface forces, **1991** publisher Academic Press ISBN 0-12-375181-0.

¹⁶³Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.***2005**, 105, 1401.

Le CPP prend en compte trois variables :

- la longueur de la chaîne carbonée, l_c
- le volume de la chaîne carbonée, v
- l'aire de la tête polaire, hydrophile, a_0



Le paramètre (sans unité) *CPP* peut ainsi être calculé de la manière suivante :

$$CPP = \frac{v}{a_0 \times l_c}$$

Le volume de la chaîne carbonée v étant donné en nm^3 , la longueur de la chaîne carbonée l_c en nm et l'aire de la tête polaire a_0 en nm^2 . Le terme v peut être déterminé par la relation suivante :

$$v = 0,027 \times (n_c + n_{Me})$$

Où n_c est le nombre total de carbone

n_{Me} est le nombre de groupes méthyles (deux fois plus grands qu'un CH_2).

Le coefficient 0,027 correspond au volume d'un méthylène en nm^3 . Le terme l_c correspond à la longueur de la chaîne carbonée et peut être déterminé avec la relation suivante :

$$l_c = 0,15 + 0,127 \times n_c$$

Où n_c est le nombre total de carbones

0,15 correspond au rayon du méthyle terminal (en nm)

0,127 correspond à la longueur de la liaison carbone-carbone (en nm) de la chaîne hydrocarbonée projetée dans la direction de la chaîne en configuration *trans*.

En connaissant ces coefficients et en calculant le paramètre d'empilement critique on peut prédire la forme de la micelle suivant la valeur de *CPP* comme l'indique la Figure 105^{163 163}.

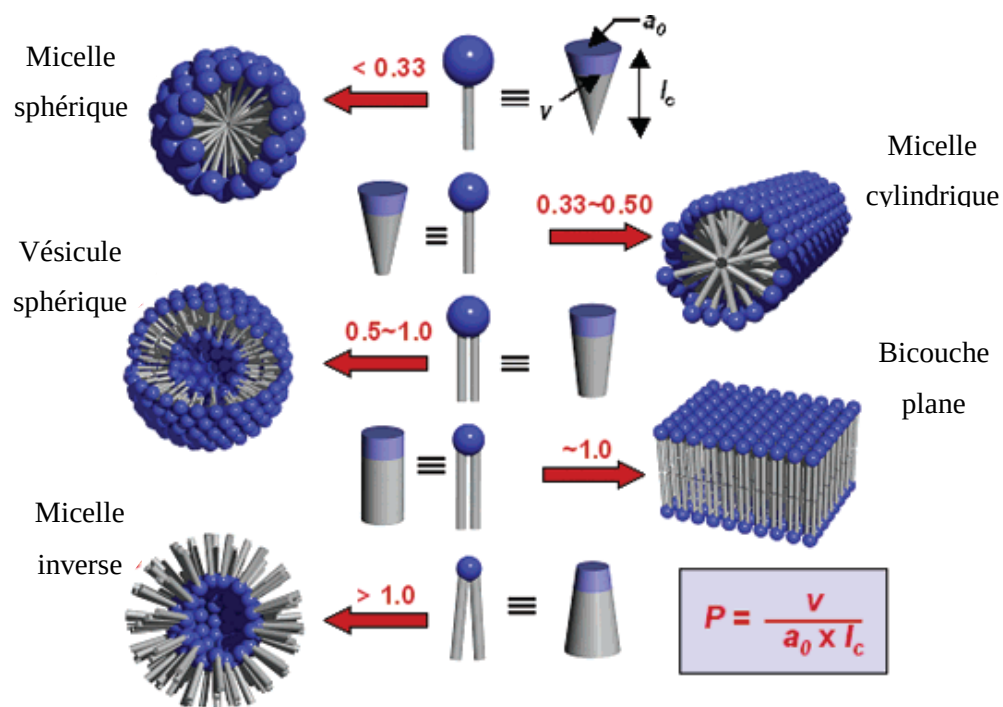


Figure 105. Forme de la micelle en fonction du paramètre d'empilement critique¹⁶³.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ¹ Ekimov, A. I.; Onushchenko, A. A. *JETP Lett.* **1981**, *34*, 345.
- ² Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
- ³ Wood, V.; Bulovic, V. *Nano Rev.* **2010**, *1*, 5202.
- ⁴ Lohse, S. E.; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15607.
- ⁵ Kamat, P. V. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1906.
- ⁶ Rosenthal, S. J.; Chang, J. C.; Kovtun, O.; McBride, J. R.; Tomlinson, I. D. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 10.
- ⁷ Manuscrit de Thèse de Joshua James Angell, *California Polytechnic State University San Luis Obispo*, **2011**.
- ⁸ Li, S.; Yang, G. W. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 15054.
- ⁹ Liu, L.; Zhuang, Z.; Xie, T.; Wang, Y.-G.; Li, J.; Peng, Q.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16423.
- ¹⁰ Daboussi, B. O. et al. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- ¹¹ Clefs CEA-N°52- été 2005.
- ¹² Smith, A. M.; Duan, H. W.; Mohs, A. M.; Nie, S. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1226.
- ¹³ Dahan, M.; Levi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A. *Science* **2003**, *302*, 442.
- ¹⁴ Hughes, B. K.; Luther, J. M.; Beard, M. C. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4573.
- ¹⁵ Yin, Y. ; Alivastos, P. *Nature* **2005**, *437*, 664.
- ¹⁶ Kwon, S. G.; Hyeon, T. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1696.
- ¹⁷ Joo, J.; Na, H. B.; Yu, T.; Yu, J. H.; Kim, Y. W.; Wu, F.; Zhang, J. Z.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11100.
- ¹⁸ Krylova, G.; Giovanetti, L. J.; Requejo, F. G.; Dimitrijevic, N. M.; Prakapenka, A.; Shevchenko, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4384.
- ¹⁹ Ruddy, D. A.; Johnson, J. C.; Smith, E. R.; Neale, N. R. *ACS Nano* **2010**, *4*, 7459.
- ²⁰ Donegá, C. d. M.; Liljeroth, P.; Vanmaekelbergh, D. *Small* **2005**, *1*, 1152.
- ²¹ Yang, Y. A.; Wu, H.; Williams, K. R.; Cao, Y. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6712.
- ²² Cumberland, S. L.; Hanif, K. M.; Javier, A.; Khitrov, G. A.; Strouse, G. F.; Woessner, S. M.; Yun, C. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1576.
- ²³ Pradhan, N.; Efrima, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2050.
- ²⁴ Reiss, P.; Protière, M.; Li, L. *Small* **2009**, *5*, 154.
- ²⁵ Grabolle, M.; Ziegler, J.; Merkulov, A.; Nann, T.; Reschgenger, U. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 235.
- ²⁶ Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi M. G. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- ²⁷ Mahler, B.; Spinicelli, P.; Buil, S.; Quelin, X.; Hermier, J.-P.; Dubertret, B. *Nature Mater.* **2008**, *7*, 659.
- ²⁸ Chaudhuri, R. G.; Paria, S. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2373.
- ²⁹ Manuscrit de thèse de Benoit Mahler, *Université Pierre et Marie Curie*, **2009**.
- ³⁰ Li, J. J.; Wang, Y. A.; Guo, W. Z.; Keay, J. C.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12567.
- ³¹ Xie, R. G.; Kolb, U.; Li, J. X.; Basche, T.; Mews, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7480.
- ³² Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870.
- ³³ Gravel, E.; Tanguy, C.; Cassette, E.; Pons, T.; Knittel, F.; Bernards, N.; Garofalakis, A.; Ducongé, F.; Dubertret, B.; Doris, E. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 411.

- ³⁴ Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science* **2002**, 298, 1759.
- ³⁵ Carion, O.; Mahler, B.; Pons, T.; Dubertret, B. *Nature Protocols* **2007**, 2, 2383.
- ³⁶ Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera_Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. *Small* **2011**, 7, 3113.
- ³⁷ Gussin, H. A.; Tomlinson, I. D.; Littel, D. M.; Warnement, M. R.; Qian, H.; Rosenthal, S. J.; Pepperberg, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15701.
- ³⁸ Bakalova, R.; Zhelev, Z.; Ohba, H.; Baba, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9328.
- ³⁹ Erathodiyil, N.; Ying, J. Y.; *Acc. Chem. Res.* **2011**, 10, 925.
- ⁴⁰ Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. Biotech.* **2004**, 22, 969.
- ⁴¹ Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. *Nat. Biotech.* **2002**, 21, 41.
- ⁴² Tada, H.; Higuchi, H.; Wanatabe, T. M.; Ohuchi, N. *Cancer Res.* **2007**, 67, 1138.
- ⁴³ Tomlinson, I. D.; Mason, J. N.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Methods Mol. Biol.* **2005**, 303, 51.
- ⁴⁴ Orndorff, R. L.; Rosenthal, S. J. *Nano Lett.* **2009**, 9, 2589.
- ⁴⁵ Smith, B. R.; Cheng, Z.; De, A.; Koh, A. L.; Sinclair, R.; Gambhir, S. S. *Nano Lett.* **2008**, 8, 2599.
- ⁴⁶ Tomlinson, I. D.; Mason, J. N.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4664.
- ⁴⁷ Tomlinson, I. D.; Warnerment, M. R.; Mason, J. N.; Vergne, M. J.; Hercules, D. M.; Blakely, R. D.; Rosenthal, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5656.
- ⁴⁸ Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. nanotechnol.* **2007**, 2, 751.
- ⁴⁹ Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. biotechnol.* **2004**, 22, 969.
- ⁵⁰ Morris-Cohen, A. J.; Malicki, M.; Peterson, M. D.; Slavin, J. W. J.; Weiss, E. A. *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1155.
- ⁵¹ Kuno, M.; Lee, J. K.; Dabbousi, B. O.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Chem. Phys.* **1997**, 106, 9869.
- ⁵² Gomes, R.; Hassinen, A.; Szczygiel, A.; Zhao, Q.; Vantomme, A.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 145.
- ⁵³ Kopping, J. T.; Patten, T. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5689.
- ⁵⁴ Hens, Z.; Moreels, I.; Martins, J. C. *ChemPhysChem* **2005**, 6, 2578.
- ⁵⁵ Katari, J. E. B.; Colvin, V. L.; Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 4109.
- ⁵⁶ Sharma, H.; Sharma, S. N.; Singh, S.; Kishore, R.; Singh, G.; Shivaprasad, S. M. *Applied Surface Science* **2007**, 253, 5325.
- ⁵⁷ Morris-Cohen, A. J.; Donakowski, M. D.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 897.
- ⁵⁸ Morris-Cohen, A. J.; Frederick, M. T.; Lilly, G. D.; McArthur, E. A.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 1078.
- ⁵⁹ Jasieniak, J.; Mulvaney, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2841.
- ⁶⁰ Moreels, I.; Martins, J. C.; Hens, Z. *ChemPhysChem* **2006**, 7, 1028.
- ⁶¹ Fritzinger, B.; Moreels, I.; Lommens, P.; Koole, R.; Hens, Z.; Martins, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3024.
- ⁶² Morris-Cohen, A. J.; Vasilenko, V.; Amin, V. A.; Reuter, M. G.; Weiss, E. A. *ACS Nano* **2012**, 6, 557.
- ⁶³ Fritzinger, B.; Capek, R. K.; Lambert, K.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10195.
- ⁶⁴ Kim, W.; Lim, S. J.; Jung, S.; Shin, S. K. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 1539.
- ⁶⁵ Webber, H. D.; Brutchey, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 1085.
- ⁶⁶ Malicki, M.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4400.
- ⁶⁷ Morris-Cohen, A. J.; Donakowski, M. D.; Knowles, K. E.; Weiss, E. A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 897.
- ⁶⁸ Hassinen, A.; Moreels, I.; De Nolf, K.; Smet, P. F.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20705.

- ⁶⁹ Jasieniak, J.; Bullen, C.; Van Embden, J.; Mulvaney, P. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20665.
- ⁷⁰ Tao, K.; Zhou, H.; Dou, H.; Xing, B.; Li, W.; Sun, K. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 8762.
- ⁷¹ Harrell, S. M.; McBride, J. R.; Rosenthal, S. J. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1199.
- ⁷² Hens, Z.; Martins, J. C.; *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1211.
- ⁷³ William, W.; Peng, Yu.; Peng, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2368.
- ⁷⁴ Immunoassay: a practical guide de Brian Law, Edition Tailor&Francis 1996.
- ⁷⁵ Moreels, I.; Fritzinger, B.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15081.
- ⁷⁶ Jasieniak, J.; Smith, L.; van Embden, J.; Mulvaney, P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19468.
- ⁷⁷ Čapek, R. K.; Moreels, I.; Lambert, K.; De Muynck, D.; Zhao, Q.; Van Tomme, A.; Vanhaecke, F.; Hens, Z. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 6371.
- ⁷⁸ Fritzinger, B.; Čapek, R. K.; Lambert, K.; Martins, J. C.; Hens, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10195.
- ⁷⁹ Webber, H. D.; Brutchey, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1085.
- ⁸⁰ Yildiz, I.; Deniz, E.; McCaughan, B.; Cruickshank, S. F.; Callan, J. F.; Raymo, F. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 11503.
- ⁸¹ Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804.
- ⁸² Giovanelli, E.; Muro, E.; Sitbon, G.; Hanafi, M.; Pons, T.; Dubertret, B.; Lequeux, N. *Langmuir* **2012**, *28*, 15177.
- ⁸³ Nann, T.; Mulvaney, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5393.
- ⁸⁴ Kim, S.-W.; Kim, S.; Tracy, J. B.; Jasanoff, A.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4556.
- ⁸⁵ Guo, W.; Li, J. J.; Wang, Y. A.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3901.
- ⁸⁶ Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969.
- ⁸⁷ Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano. Lett.* **2004**, *4*, 703.
- ⁸⁸ Travert-Branger, N.; Dubois, F.; Carion, O.; Carrot, G.; Mahler, B.; Dubertret, B.; Doris, E.; Mioskowski, C. *Langmuir*, **2008**, *24*, 3016.
- ⁸⁹ Travert-Branger, N.; Dubois, F.; Renault, J.-P.; Pin, S.; Mahler, B.; Gravel, E.; Dubertret, B.; Doris, E. *Langmuir* **2011**, *27*, 4358.
- ⁹⁰ Wegner, G. *Z. Naturforsch.* **1969**, *24b*, 824.
- ⁹¹ Wegner, G. *Pure & Appl. Chem.* **1977**, *49*, 443.
- ⁹² Kollmar, C. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 2710.
- ⁹³ Itoh, C.; Kondoh, T.; Tanimura, K. *J. Phys. Soc. Jpn.* **1999**, *68*, 1711.
- ⁹⁴ Baughman, R. H.; Chance, R. R.; *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1976**, *14*, 2037.
- ⁹⁵ Chance, R. R.; Baughman, R. H.; Müller, H.; Eckhardt, C. J. *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 3616.
- ⁹⁶ Nava, A. D.; Thakur, M.; Tonelli, A. E. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3055.
- ⁹⁷ Tomioka, Y.; Tanaka, N.; Imazeki, S. *Thin Solid Films* **1989**, *179*, 27.
- ⁹⁸ Charych, D. H.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Bednarski, M. D. *Science* **1993**, *261*, 585.
- ⁹⁹ Ryu, S.; Yoo, I.; Song, S.; Yoon, B.; Kim, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3800.
- ¹⁰⁰ Jose, D. A.; Stadlbauer, S.; König, B. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7404.
- ¹⁰¹ Demikhovskiy, Y.; Kolusheva, S.; Geyzer, M.; Jelinek, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 428.
- ¹⁰² Yoon, B.; Lee, S.; Kim, J.-M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1958.
- ¹⁰³ Bartczak, D.; Kanaras, A. G. *Langmuir* **2010**, *26*, 7072.
- ¹⁰⁴ Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.

- ¹⁰⁵ Manuscrit de thèse d'Aurélia Perino, Docteur en Science de l'université de Strasbourg, **2010**.
- ¹⁰⁶ Dubois, F.; Mahler, B.; Dubertret, B.; Doris, E.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 482.
- ¹⁰⁷ Ogier, J.; Arnauld, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J.-M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3902.
- ¹⁰⁸ Mackiewicz, N.; Gravel, E. Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Ducongé, F. *Small* **2011**, *7*, 2786.
- ¹⁰⁹ Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science* **2002**, *298*, 1759.
- ¹¹⁰ Delalande, O.; Desvaux, H.; Godat, E.; Valleix, A.; Junot, C.; Labarre, J.; Boulard, Y. *FEBS J.* **2010**, *277*, 5086.
- ¹¹¹ Shaik, I. H.; Mehvar, R. *Anal Bioanal Chem.* **2006**, *285*, 105.
- ¹¹² Antunes, F.; Cadenas, E. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, *30*, 1008.
- ¹¹³ Faure, A. C.; Dufort, S.; Josserand, V.; Perriat, P.; Coll, J. L.; Roux, S.; Tillement, O. *Small* **2009**, *5*, 2565.
- ¹¹⁴ Banks, R. E.; Tatlow, J. C. *J. Fluorine Chem.* **1986**, *33*, 71.
- ¹¹⁵ Borodin, A. *Compt. Rend.* **1862**, *55*, 553.
- ¹¹⁶ Flahault, J.; Viel, C. *J. Fluorine Chem.* **1986**, *33*, 27.
- ¹¹⁷ Okazoe, T.; *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2009**, *85*, 276.
- ¹¹⁸ Goldwhite, H. *J. Fluorine Chem.* **1986**, *33*, 109.
- ¹¹⁹ Fowler, R. D. et al. *Ind. Eng. Chem.* **1947**, *39*, 292.
- ¹²⁰ Simons, J. H. *J. Electrochem. Soc.* **1949**, *95*, 47.
- ¹²¹ Studer, A.; Hadida, S.; Ferritto, R.; Kim, S.-Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science* **1997**, *275*, 823.
- ¹²² Curran, D. P. *Synlett* **2001**, *09*, 1488.
- ¹²³ Schutt, E. G.; Klein, D. H.; Mattrey, R. M.; Riess, J. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3218.
- ¹²⁴ Rapoport, N. patent US2010/0178305 A1.
- ¹²⁵ Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Papolla, M. A.; Böker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2812.
- ¹²⁶ Leach, C. L.; Greenspan, J. S.; Rubenstein, S. D.; Shafeer, T. H.; Wolfson, M. R.; Jackson, J. C.; DeLemos, R.; Fuhrman, B. P. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 761.
- ¹²⁷ Shinoda, K.; Hato, M.; Hayashi, T. *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 909.
- ¹²⁸ Ravey, J. C.; Stébé, M. *J. Colloids Surf. A* **1994**, *84*, 11.
- ¹²⁹ Jacquemain, D.; Wolf, S. G.; Leveiller, F.; Frolow, F.; Eisenstein, M.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9983.
- ¹³⁰ Shin, S.; Collazo, N.; Rice, S. A. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1352.
- ¹³¹ Wang, K.; Karlsson, G.; Almgren, M.; Asakawa, T. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9237.
- ¹³² Hoffmann, H.; Kalus, J.; Thurn, H. *Colloid Polym. Sci.* **1983**, *261*, 1043.
- ¹³³ Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Papolla, M. A.; Böker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2812.
- ¹³⁴ Durand, G.; Polidori, A.; Ouari, O.; Tordo, P.; Geromel, V.; Rustin, P.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5230.
- ¹³⁵ Park, K.-H.; Berrier, C.; Lebaupain, F.; Pucci, B.; Popot, J.-L.; Ghazi, A.; Zito, F. *Biochem. J.* **2007**, *403*, 183.
- ¹³⁶ Chung, E. K.; Lee, E.; Lim, Y.-B.; Lee, M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5305.
- ¹³⁷ McFarland, E.; Koutcher, J. A.; Rosen, B. R.; Teicher, B.; Brady, T. J. *Comput.-Assisted Tomogr.* **1985**, *9*, 8.
- ¹³⁸ Zhao, D.; Constantinescu, A.; Jiang, L.; Hahn, E. W.; Mason, R. P. *Am. J. Clin. Oncol.* **2001**, *24*, 462.
- ¹³⁹ Mehta, V. D.; Kulkarni, P. V.; Mason, R. P.; Constantinescu, A.; Antich, P. P. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 257.

- ¹⁴⁰ P. Bachert *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, 33, 1.
- ¹⁴¹ Peng, H.; Blakey, I.; Dargaville, B.; Rasoul, F.; Rose, S.; Whittaker A. K. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 374.
- ¹⁴² Pandey, M. K.; Tyagi, R.; Yang, K.; Fisher, R. J.; Colton C. K.; Kumar, J.; Parmar, V. S.; Aiazian, E.; Watterson, A. C. *Polymer* **2011**, 52, 4727.
- ¹⁴³ Iijimata, H.; Koyama, S.; Fujio, K.; Uzu, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, 72, 171.
- ¹⁴⁴ Gentilini, C.; Evangelista, F.; Rudolf, P.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Pasquato, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15678.
- ¹⁴⁵ Lim, Y. T.; Cho, M. Y.; Kang, J.-H.; Noh, Y.-W.; Cho, J.-H.; Hong, K. S.; Chung, J. W.; Chung, B. H. *Biomaterials* **2010**, 31, 4964.
- ¹⁴⁶ Gorelikov, I.; Martin, A. L.; Seo, M.; Matsuura, N. *Langmuir* **2011**, 27, 15024.
- ¹⁴⁷ Voggu, R.; Biswas, K.; Govindaraj, A.; Rao, C. N. R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 20752.
- ¹⁴⁸ Posocco, P.; Gentilini, C.; Bidoggia, S.; Pace, A.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Pasquato, L. *ACS Nano* **2012**, 6, 7243.
- ¹⁴⁹ Stähler, K.; Selb, J.; Candau, F. *Langmuir* **1999**, 15, 7565.
- ¹⁵⁰ Stähler, K.; Selb, J.; Barthelemy, P.; Pucci, B.; Candau, F. *Langmuir*, **1998**, 14, 4765.
- ¹⁵¹ Huc, I.; Oda, R. *Chem. Commun.* **1999**, 2025.
- ¹⁵² Kunleda, H.; Shinoda, K. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, 2468.
- ¹⁵³ Lee, S. F.; Osborne, M. A. *ChemPhysChem* **2009**, 10, 2174.
- ¹⁵⁴ Antunes, F.; Cadenas, E. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 30, 1008.
- ¹⁵⁵ Yang, Y. A.; Wu, H. M.; Williams, K. R.; Cao, Y. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6712.
- ¹⁵⁶ Mahler, B.; Lequeux, N.; Dubertret, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 953.
- ¹⁵⁷ Jasieniak, J.; Mulvaney, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2841
- ¹⁵⁸ Leatherdale, C. A.; Woo, W.-K.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 7619.
- ¹⁵⁹ D.J. Gravert, K.D. Janda *Chem. Rev.* **1997**, 97, 489.
- ¹⁶⁰ X. Zhao, K.D. Janda *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5437.
- ¹⁶¹ Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes, *John Wiley and Sons* **1991**, chapitre 6.
- ¹⁶² Israelachvili, J. N. Book: Intermolecular and surface forces, **1991** publisher *Academic Press* ISBN 0-12-375181-0.
- ¹⁶³ Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1401.