



**HAL**  
open science

**Synthèse et caractérisation de sondes bimodales à base de nanocristaux I-III-VI pour l'imagerie de fluorescence et l'IRM in vivo**  
Gary Sitbon

► **To cite this version:**

Gary Sitbon. Synthèse et caractérisation de sondes bimodales à base de nanocristaux I-III-VI pour l'imagerie de fluorescence et l'IRM in vivo. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. ⟨NNT : 2014PA066596⟩. ⟨tel-01142105⟩

**HAL Id: tel-01142105**

**<https://theses.hal.science/tel-01142105v1>**

Submitted on 14 Apr 2015

**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



## THÈSE DE DOCTORAT

présentée par

**Gary SITBON**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie**

Spécialité : Sciences des matériaux

École Doctorale 397 Physique et Chimie des Matériaux

réalisée au Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux

# **Synthèse et caractérisation de sondes bimodales à base de nanocristaux I-III-VI pour l'imagerie de fluorescence et l'IRM *in vivo***

soutenue le 30 septembre 2014

devant le jury constitué de :

|      |                        |                    |
|------|------------------------|--------------------|
| Mme. | <b>Laurence MOTTE</b>  | Rapporteur         |
| M.   | <b>Fabien DELPECH</b>  | Rapporteur         |
| Mme. | <b>Corinne CHANÉAC</b> | Examineur          |
| Mme. | <b>Souad AMMAR</b>     | Examineur          |
| M.   | <b>Peter REISS</b>     | Examineur          |
| M.   | <b>Nicolas LEQUEUX</b> | Directeur de thèse |
| M.   | <b>Thomas PONS</b>     | Encadrant de thèse |



# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction</b>  | <b>1</b>  |
| <b>I Imagerie multimodale</b>  | <b>5</b>  |
| I.1 Sondes pour l'IRM . . . . .  | 9         |
| I.1.1 Quelques rappels de RMN . . . . .  | 9         |
| I.1.2 Les agents de contraste en IRM . . . . .                                     | 9         |
| I.2 Fluorophores émettant dans le proche infrarouge . . . . .                      | 16        |
| I.2.1 Les fluorophores organiques . . . . .  | 18        |
| I.2.2 Les nanoparticules dopées aux terres rares . . . . .                         | 19        |
| I.2.3 Les quantum dots . . . . .   | 21        |
| I.3 Nanoparticules magnétiques et fluorescentes . . . . .                          | 25        |
| I.4 Techniques utilisées . . . . .   | 25        |
| I.5 Sondes bimodales basées sur des quantum dots I-III-VI . . . . .                | 28        |
| I.6 Solution proposée . . . . .  | 30        |
| <b>II Quantum dots I-III-VI et croissance de coque épaisse de zinc</b>             | <b>33</b> |
| II.1 Propriétés des QDs CuIn(S,Se) . . . . .                                       | 33        |
| II.1.1 Propriétés structurales . . . . .   | 33        |
| II.1.2 Propriétés optiques et applications . . . . .                               | 35        |
| II.2 Synthèse des cœurs I-III-VI . . . . .   | 37        |
| II.2.1 Synthèse des cœurs Zn-Cu-In-S . . . . .                                     | 38        |
| II.2.2 Synthèse des cœurs Zn-Cu-In-Se . . . . .                                    | 40        |
| II.3 Croissance d'une coque de ZnS . . . . .                                       | 41        |
| II.3.1 Les différents types d'hétérostructure . . . . .                            | 41        |
| II.3.2 Choix du matériau de la coque . . . . .                                     | 42        |
| II.3.3 Méthodes existantes pour la croissance de coques de ZnS . . . . .           | 43        |
| II.4 Méthodes employées pour la croissance de ZnS sur des cœurs I-III-VI . . . . . | 45        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| II.5       | Croissance de coques épaisses de ZnS . . . . .     | 45        |
| II.5.1     | Synthèses testées . . . . .                        | 46        |
| II.5.2     | Comparaison des précurseurs de soufre . . . . .    | 46        |
| II.5.3     | Synthèse avec éthylxanthate de zinc . . . . .      | 48        |
| <b>III</b> | <b>Croissance d'un alliage ZnMnS</b>               | <b>53</b> |
| III.1      | Choix du précurseur de manganèse . . . . .         | 53        |
| III.2      | Incorporation du Mn dans les particules . . . . .  | 56        |
| III.3      | Influence du taux d'incorporation . . . . .        | 62        |
| III.3.1    | Propriétés optiques . . . . .                      | 62        |
| III.3.2    | Propriétés magnétiques . . . . .                   | 63        |
| III.4      | Conclusion du chapitre . . . . .                   | 64        |
| <b>IV</b>  | <b>Vers l'imagerie <i>in vivo</i></b>              | <b>65</b> |
| IV.1       | Transfert et stabilité en milieu aqueux . . . . .  | 66        |
| IV.1.1     | Méthodes existantes . . . . .                      | 66        |
| IV.1.2     | L'échange de ligands par le DHLA-PEG . . . . .     | 69        |
| IV.1.3     | DLS et zétamétrie . . . . .                        | 73        |
| IV.2       | Propriétés des sondes en milieu aqueux . . . . .   | 74        |
| IV.2.1     | Propriétés optiques . . . . .                      | 74        |
| IV.2.2     | Mesures de relaxivité . . . . .                    | 76        |
| IV.2.3     | Relargage du manganèse . . . . .                   | 81        |
| IV.2.4     | Cytotoxicité . . . . .                             | 82        |
| IV.3       | Détection du ganglion lymphatique . . . . .        | 83        |
|            | <b>Conclusions &amp; Perspectives</b>              | <b>89</b> |
| <b>A</b>   | <b>Synthèses</b>                                   | <b>93</b> |
| A.1        | Synthèse des cœurs . . . . .                       | 94        |
| A.1.1      | Synthèse de cœurs Zn-Cu-In-S . . . . .             | 94        |
| A.1.2      | Synthèse des cœurs ZnCuInSe . . . . .              | 95        |
| A.2        | Synthèse des coques . . . . .                      | 97        |
| A.2.1      | Synthèse des précurseurs pour les coques . . . . . | 97        |
| A.2.2      | Synthèse des coques de $Zn_{1-x}Mn_xS$ . . . . .   | 98        |
| A.3        | Échange de ligands . . . . .                       | 100       |
| A.3.1      | Synthèse du DHLA-PEG1000 . . . . .                 | 100       |
| A.3.2      | Traitement de surface des nanoparticules . . . . . | 101       |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| A.3.3    | Méthode de l'échange . . . . .                                     | 102        |
| A.4      | Méthodes de purification de nanoparticules hydrosolubles . . . . . | 102        |
| A.4.1    | L'ultrafiltration . . . . .  | 102        |
| A.4.2    | L'ultracentrifugation . . . . .                                    | 103        |
| <b>B</b> | <b>Caractérisations</b>  | <b>105</b> |
| B.1      | Absorbance . . . . .   | 106        |
| B.1.1    | Mesure de la concentration en nanoparticules . . . . .             | 106        |
| B.1.2    | Relargage du Manganèse . . . . .                                   | 106        |
| B.1.3    | Fluorescence . . . . .   | 108        |
| B.1.4    | Rendement quantique . . . . .                                      | 111        |
| B.2      | Microscopie électronique en transmission . . . . .                 | 113        |
| B.3      | Diffraction des rayons X . . . . .                                 | 113        |
| B.3.1    | Détermination de la taille des cristaux . . . . .                  | 113        |
| B.3.2    | Détermination de la composition d'un alliage . . . . .             | 114        |
| B.4      | Analyse élémentaire . . . . .                                      | 114        |
| B.4.1    | Analyse dispersive en énergie (EDX) . . . . .                      | 114        |
| B.4.2    | Spectrométrie par torche à plasma . . . . .                        | 116        |
| B.5      | Relaxivité . . . . .   | 116        |
| B.5.1    | Principe de la mesure . . . . .                                    | 116        |
| B.5.2    | Réalisation de la mesure . . . . .                                 | 117        |
| B.6      | Résonance Paramagnétique Électronique . . . . .                    | 118        |
| B.6.1    | Principe de la RPE . . . . .                                       | 118        |
| B.6.2    | Mesure de spectre de RPE . . . . .                                 | 119        |
| B.7      | Propriétés magnétiques . . . . .                                   | 119        |
| <b>C</b> | <b>Publications</b>  | <b>121</b> |



# Introduction générale

## Contexte

Lorsque les dimensions d'un matériau sont réduites à l'échelle nanométrique, de nouvelles propriétés optiques, électroniques ou encore magnétiques vont apparaître. On peut citer par exemple :

- les propriétés magnétiques peuvent être modifiées. Les nanoparticules de magnétite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , sont constituées d'un seul domaine magnétique et deviennent superparamagnétiques (disparition du champ coercitif) ;
- les nanoparticules métalliques présentent des résonances de plasmons de surface dont l'énergie dépend de la taille et la forme de la nanoparticule ;
- pour les semi-conducteurs, les effets du confinement quantique des charges (électrons et trous) provoquent la discrétisation des niveaux d'énergie qui génère des propriétés d'absorption et d'émission particulièrement intéressantes. Là encore la longueur d'émission va dépendre de la taille et de la forme des nanoparticules.

Lors des trente dernières années, le développement des nanoparticules fluorescentes de semi-conducteurs a été un champ de recherche particulièrement actif. Leur spectre d'absorption continu et leur longueur d'onde d'émission modulable en fonction de la taille des nanocristaux en ont fait des matériaux de choix pour différentes applications : couche absorbante de cellules solaires et photo-détecteurs, marqueur pour l'imagerie biologique ou encore luminophore dans les diodes électro-luminescentes.

La croissance d'une coque composée d'un autre matériau semi-conducteur permet de préserver le caractère fluorescent en isolant le cœur du milieu extérieur et permet notamment de limiter l'oxydation. Le choix du matériau qui constitue la coque repose sur plusieurs critères : l'alignement des bandes qui va permettre le confinement des charges dans le cœur, la compatibilité d'un point de vue structural ou encore la biocompatibilité dans le cas d'applications pour l'imagerie.

## Projet

Cette thèse s'inscrit dans les efforts du laboratoire concernant le développement de sondes nanométriques pour l'imagerie de fluorescence. Les travaux précédents de l'équipe ont permis d'obtenir des sondes peu toxiques émettant dans le proche infra-rouge à base de matériaux I-III-VI ( $\text{CuInE}_2$ ,  $E = \text{S}$  ou  $\text{Se}$ ) qui permettent le marquage de structures *in vivo* chez la souris.[1, 2] Mon travail a consisté à développer des sondes qui puissent être utilisées non seulement pour l'imagerie de fluorescence mais également comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'IRM permet de faire des images sans limite de profondeur mais avec une sensibilité peu élevée tandis que l'imagerie de fluorescence permet d'obtenir des informations à l'échelle cellulaire avec une grande sensibilité mais avec une profondeur de pénétration restreinte. La combinaison de ces deux méthodes d'imagerie devrait nous permettre de faire de la détection multi-échelle pour l'imagerie *in vivo* chez le petit animal également. On pourrait envisager des applications chirurgicales : l'IRM permettrait la détection de structures d'intérêt sur corps entier tandis que l'imagerie de fluorescence servirait pour le suivi peropératoire.

Pour obtenir une sonde bifonctionnelle, nous avons décidé d'incorporer des ions manganèse  $\text{Mn}^{2+}$  dans la coque de nos objets. La première étape de mon travail a été de développer une synthèse permettant la croissance d'une coque épaisse de sulfure de zinc sur les nanoparticules précédemment synthétisées. Il a fallu ensuite mettre au point l'incorporation des ions paramagnétiques dans ces objets. Pour obtenir un bon contrôle de la taille et de la composition de nos nanoparticules, les synthèses sont réalisées en milieu organique et aboutissent donc à des objets solubles dans les solvants organiques, type hexane ou chloroforme. De telles particules sont donc incompatibles avec des applications d'imagerie et nous avons donc développé une méthode d'échange de ligands afin de les rendre solubles dans les milieux aqueux. Enfin, grâce à l'aide de nos collaborateurs à l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), pour la partie fluorescence, et au Centre d'Investigation Clinique Innovation Technologique du CHU de Nancy (CIC-IT Nancy), pour la partie IRM, nous avons pu montrer que ces sondes pouvaient être utilisées pour l'imagerie multimodale *in vivo* chez le petit animal.

## Plan du manuscrit

Le premier chapitre nous permettra de présenter brièvement les différentes modalités d'imagerie et de préciser l'intérêt d'un couplage IRM-imagerie de fluorescence. Nous détaillerons ensuite les différents agents de contraste pour l'IRM, les marqueurs pour

l'imagerie de fluorescence ainsi que les sondes qui permettent de combiner les deux. Enfin, nous détaillerons la stratégie et les matériaux que nous avons choisis.

Le deuxième chapitre concernera les propriétés structurales et optiques des quantum dots à base de matériaux I-III-VI et nous détaillerons les synthèses de nanoparticules. Enfin, nous expliquerons l'intérêt de la croissance d'une coque autour des nanoparticules et comment nous avons réussi à faire croître des coques de plusieurs nanomètres d'épaisseur.

Dans le troisième chapitre, nous détaillerons la méthode qui nous a permis de faire croître une coque contenant des ions paramagnétiques  $\text{Mn}^{2+}$ . Nous montrerons comment nous avons mis en évidence l'incorporation dans la matrice de ZnS, et non juste l'adsorption à la surface, de ces ions et nous présenterons les propriétés optiques et magnétiques des objets ainsi obtenus.

Le quatrième chapitre nous permettra de présenter le traitement de surface des objets précédemment synthétisés afin d'obtenir des sondes solubles dans l'eau. Après avoir présenté l'évaluation de ces sondes *in vitro*, nous montrerons comment elles nous ont permis la colocalisation multi-échelle, en IRM et en imagerie de fluorescence, d'un ganglion lymphatique *in vivo* chez la souris.



# Chapitre I

## Imagerie multimodale

Différentes méthodes d'imagerie sont utilisées pour le diagnostic médical : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomодensitométrie ou tomographie axiale calculée par ordinateur (CT pour *Computed Tomography* en anglais), la tomographie par émission de positons (TEP ou PET pour *Positron Emission Tomography* en anglais) ou encore la tomographie d'émission monophotonique (TEMP ou SPECT pour *Single Photon Emission Computed Tomography* en anglais).

L'IRM repose sur la résonance magnétique nucléaire des protons présents en quantité dans le corps composé à 70 % d'eau. La mesure des temps de relaxation des protons en fonction de leur environnement permet de remonter à la nature des différents tissus et fluides vitaux en présence. L'IRM est par exemple utilisée pour visualiser l'activité cérébrale[3] ou pour la détection de lésions aux niveaux des cartilages.[4, 5]

La tomодensitométrie repose sur la mesure de l'absorption par les différents tissus de rayons X et sur la reconstruction d'image par tomographie en 2D ou 3D. La tomодensitométrie permet de détecter des fractures,[6] la présence de nodules dans les poumons[7] ou d'hémorragies.[8, 9]

La tomographie par émission de positon et la tomographie d'émission monophotonique sont des méthodes scintigraphiques : on va détecter les rayonnements d'un traceur radioactif qui va aller la cible à examiner. Dans le cas de la TEP, le marqueur va émettre des positons dont l'annihilation va produire deux photons  $\gamma$  de haute énergie émis dans deux directions opposées. La mesure de l'écart temporel entre ces deux photons par deux caméras mobiles situées face-à-face permet de remonter à la position et à la concentration du traceur. Le marqueur le plus utilisé est le  $^{18}\text{F}$ -fluorodésoxyglucose (en abrégé  $^{18}\text{F}$ -FDG) qui est un analogue du glucose et va donc permettre de mesurer le métabolisme des tissus. La TEMP est une technique proche de la TEP mais qui repose sur des mar-

queurs émettant directement des photons  $\gamma$  de faible énergie, le plus souvent basés sur du technétium métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ). La détection est opérée par une seule caméra couplée à un collimateur de façon à pouvoir remonter à la localisation du traceur. Les tomographies d'émission (TEP et TEMP) mesurent l'activité métabolique et permettent de détecter des tissus avec un métabolisme élevé, notamment les tumeurs.[10]

Plus récemment, l'utilisation de l'imagerie de fluorescence s'est développée en raison du faible coût des équipements et de sa praticité pour la détection per-opératoire. Elle repose simplement sur la collection de photons (visible ou proche infrarouge) émis par des fluorophores après une excitation par une source lumineuse : elle ne nécessite donc qu'une source lumineuse (laser ou lampe) pour l'excitation et une caméra pour la détection.

Chaque modalité d'imagerie possède ses propres avantages et limitations qui sont résumées dans le tableau I.1. Pour s'affranchir des limitations liées à chaque modalité (profondeur de pénétration, résolution, sensibilité), il est possible de combiner plusieurs d'entre elles. Par exemple, le développement d'appareils couplant le TEP ou le TEMP avec la tomodensitométrie permet de réaliser simultanément une analyse fonctionnelle réalisée par tomographie (TEP ou TEMP) à une analyse anatomique par tomodensitométrie.[11–14] De la même façon et pour limiter l'exposition des patients aux rayons X, nécessaires à la tomodensitométrie, des appareils couplant IRM et TEP ont été développés et sont actuellement utilisés pour le diagnostic clinique.[15–17]

L'utilisation combinée de plusieurs modalités permet également d'étudier des événements à plusieurs échelles. L'imagerie de fluorescence, qui permet de faire des études à l'échelle cellulaire mais souffre d'une faible profondeur de pénétration, peut être couplée à d'autres techniques pour une étude à plus grande échelle. Par exemple, il est possible d'évaluer quantitativement la biodistribution de nanoparticules fluorescentes par PET en les couplant à des complexes de  $^{64}\text{Cu}$ [18] ou des peptides contenant du  $^{18}\text{F}$ . [19, 20]

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés au couplage entre l'IRM et l'imagerie de fluorescence. L'IRM qui ne possède pas de profondeur de pénétration limitée permet de faire de la détection sur corps entier tout en limitant l'exposition aux rayonnements ionisants présents pour les autres techniques permettant la détection en profondeur (X pour la tomodensitométrie ou  $\gamma$  pour la TEP et la TEMP). Néanmoins, cette technique est limitée par le temps nécessaire à l'acquisition des images et pour certaines applications, l'impossibilité de faire un suivi peropératoire. D'un autre côté, l'imagerie de fluorescence permet d'atteindre l'échelle cellulaire voire moléculaire mais seulement sur des profondeurs inférieures au millimètre dans la gamme spectrale du visible. Ces deux techniques sont donc complémentaires pour la détection multiéchelle spatiale comme temporelle. Par exemple, Modo *et al.* ont étudié la migration de cellules souches transplantées dans

le cerveau d'une souris.[21] L'utilisation d'une sonde bifonctionnelle a permis d'obtenir des informations à plusieurs échelles : l'IRM assurait le suivi de l'implantation des cellules transplantées à l'échelle du cerveau entier tandis que l'imagerie de fluorescence permettait de voir à l'échelle tissulaire la répartition des cellules transplantées. Dans notre cas, nous souhaitons développer une sonde qui permette la détection préopératoire à grande échelle de structure d'intérêt grâce à l'IRM et le guidage peropératoire de l'acte chirurgical grâce à la fluorescence.

TABLE I.1 – Récapitulatif des caractéristiques des différentes modalités d'imagerie.[22–24]

| Modalité d'imagerie      | Photons utilisés             | Résolution latérale | Profondeur     | Résolution temporelle <sup>a</sup>     | Sensibilité     | Type de sondes   | Principaux usages  | Avantages  | Limitations  | Coût <sup>b</sup> |
|--------------------------|------------------------------|---------------------|----------------|--|-----------------|--|--|--|--|-------------------|
| PET                      | $\gamma$ haute énergie       | 1 mm                | Corps entier   | Dizaine de secondes à quelques minutes | 1 à 10 pM       | Radionucléide  | Mesure du métabolisme, détection de tumeurs, reconstruction 3D d'organes | Grande spécificité, du degré de tumeur sans biopsie  | Besoin de cyclotron pour la synthèse des radionucléides, résolution spatiale relativement limitée, radiations    | €€€€              |
| SPECT                    | $\gamma$ basse énergie       | 10 mm               | Corps entier   | Minutes                                | 10-100 pM       | Radionucléide  | Mesure du métabolisme, reconstruction 3D d'organes                       | Choix et sélectivité des sondes, multiplexage possible   | Résolution spatiale relativement limitée, radiations, besoin d'un collimateur, sensibilité                       | €€€               |
| CT                       | Rayons X                     | 100 $\mu$ m         | Corps entier   | Dizaine de minutes                     |                 | Composés iodés (éventuellement)  | Étude morphologique  | Image anatomique de tumeurs  | Faible contraste pour les tissus mous, rayons X  | €€                |
| IRM                      | Radio-fréquence              | 25-100 $\mu$ m      | Corps entier   | Dizaine de minutes                     | 10 $\mu$ M-1 mM | Complexes Gd <sup>3+</sup> ou Mn <sup>2+</sup> , NP Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | Étude morphologique et/ou fonctionnelle                                  | Combinaison morphologique/structure, spatiale, pas de rayons ionisants                               | Sensibilité faible, temps d'acquisition et de traitement   | €€€€              |
| Imagerie de fluorescence | Visible ou proche-infrarouge | 1 $\mu$ m-1 mm      | 1-2 cm maximum | Seconde                                | 1-10 pM         | Fluorophores organiques, NPs, protéines  | Suivi de cellules, marquage de structure                                 | Sensibilité, détection dans les cellules vivantes comme mortes, facilité d'utilisation, multiplexage | Profondeur de pénétration, élimination des NPs, faibles rendements quantiques pour les fluorophores et protéines | €                 |

<sup>a</sup>. On entend résolution temporelle comme le temps nécessaire pour l'acquisition et le traitement des images permettant d'obtenir les informations.

<sup>b</sup>. Cela prend en compte le coût de l'équipement et par analyse.

## I.1 Sondes pour l'IRM

L'IRM permet d'obtenir des images tridimensionnelles des différents tissus présents dans le corps. Elle repose sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) des atomes d'hydrogène,  $^1\text{H}$ , qui sont abondamment présents dans le corps, composé à 70 % d'eau.

### I.1.1 Quelques rappels de RMN

Tout noyau doté d'un spin nucléaire possède également un moment magnétique nucléaire  $\mu$  qui est colinéaire au moment cinétique de spin. En présence d'un champ magnétique  $B_0$ , les moments magnétiques de chaque atome vont s'aligner avec  $B_0$  de manière parallèle (même sens) ou antiparallèle (sens opposé). Les spins nucléaires obéissant à une distribution de Boltzmann, la probabilité pour que les moments magnétiques s'orientent parallèlement à  $B_0$  est légèrement plus grande qu'antiparallèlement car l'orientation parallèle est l'état de moindre énergie. Il en résulte une aimantation nucléaire macroscopique  $M$  qui est la grandeur mesurable en RMN. On appelle  $M_0$  la valeur à l'équilibre de cette aimantation.

Lorsqu'on applique un champ perturbatif  $B_1$  (perpendiculaire à  $B_0$ ) généralement sous la forme d'impulsion de quelques microsecondes, l'aimantation bascule autour de  $B_1$  d'un angle  $\theta_{imp}$  proportionnel à la durée de l'impulsion. Lorsque la perturbation est supprimée, l'aimantation relaxe vers sa position d'équilibre. On distingue alors deux temps de relaxation :

- $T_1$ , le temps de relaxation longitudinale (ou spin-réseau) qui correspond au retour à l'équilibre de la composante longitudinale de l'aimantation  $M_z$  ;
- $T_2$ , le temps de relaxation transverse (ou spin-spin) qui correspond au retour à l'équilibre des composantes  $M_x$  et  $M_y$ .

Ces temps de relaxation vont dépendre de l'environnement des spins considérés. Les temps de relaxation des protons de l'eau dans le corps humain dépendra de l'environnement des molécules d'eau : présence de liquide (sang, lymphe, liquide céphalo-rachidien), de tissus durs (notamment les os) ou encore de graisse. En appliquant des champs non uniformes et des séquences d'impulsion qui ne seront pas détaillés dans cette thèse, il est possible de faire une cartographie des temps de relaxation dans les différents compartiments étudiés et donc de révéler la nature du tissu (FIG. I.1).

### I.1.2 Les agents de contraste en IRM

Si l'IRM possède une résolution élevée et l'avantage de pouvoir combiner étude anatomique et fonctionnelle, elle souffre malgré tout d'une faible sensibilité. Pour fournir



FIGURE I.1 – Image d’une coupe sagittale de cerveau humain obtenue en IRM anatomique ©CNRS Photothèque, DURAND, Emmanuel

des images fonctionnelles, au-delà de l’aspect morphologique, il est possible d’utiliser des agents de contraste. Les agents de contraste sont des substances qui permettent de révéler des structures qui sont difficilement distinguables des tissus environnants. En IRM, les agents de contraste, qui possèdent des propriétés magnétiques particulières, permettent de raccourcir les temps de relaxation des particules d’eau à proximité et donc d’augmenter le contraste.

### Mécanismes d’action des agents de contraste

En IRM, il est possible de faire une cartographie des différents temps de relaxation qui dépendent de l’environnement. Comme il existe deux temps de relaxation mesurables, il existe deux types d’agent de contraste : un pour le temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) et un pour le temps de relaxation transverse ( $T_2$ ). Dans les deux cas, ces agents de contraste vont augmenter les taux de relaxation<sup>1</sup> des protons de l’eau présente dans leur voisinage. On peut utiliser ces agents de contraste pour cibler et repérer des structures qui pouvaient être difficilement discernables sans agents de contraste. Par exemple, la figure I.2 présente des images obtenues par IRM pondérée en  $T_1$  du cerveau d’une souris portant une tumeur. Avant injection de l’agent de contraste, la tumeur n’est pas distinguable tandis qu’elle apparaît clairement par la suite.

Les taux de relaxation ( $1/T_i$   $i=1$  ou  $2$ ) des protons de l’eau peuvent s’écrire comme la somme de deux termes (équation (I.1)) : une contribution diamagnétique  $(1/T_i)_d$ , qui correspond à la relaxation en l’absence d’agent de contraste et une contribution

---

1. Le taux de relaxation (noté  $R_i$   $i = 1$  ou  $2$ ) est défini comme l’inverse du temps de relaxation, soit  $R_i = 1/T_i$ .

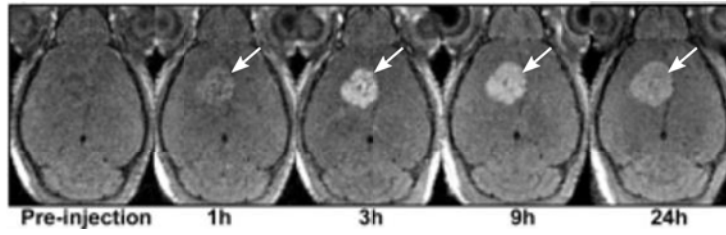


FIGURE I.2 – Série d'image pondérée en  $T_1$  du cerveau d'une souris avant (pré-injection) et après injection d'un agent de contraste. On voit apparaître la tumeur sur les images post-injection (flèche blanche). Image reproduite d'après REF. [25].

paramagnétique  $(1/T_i)_p$ , qui représente l'augmentation du taux de relaxation due à la présence d'agent de contraste.

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_d + \left(\frac{1}{T_i}\right)_p \quad i = 1, 2 \quad (I.1)$$

Si la concentration n'est pas trop élevée, ce qui correspond à l'absence d'interaction entre entités paramagnétiques, la contribution paramagnétique dépend linéairement de la concentration en agent de contraste,  $[AC]$  (equation (I.2)). La relaxivité  $r_i$  qui s'exprime généralement en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  traduit donc la faculté de l'agent de contraste à agir sur les taux de relaxation : plus elle sera élevée, plus l'agent de contraste sera efficace.

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_p = r_i[AC] \quad i = 1, 2 \quad (I.2)$$

Il y a trois types d'interactions à prendre en compte pour expliquer l'action des agents de contraste (FIG. I.3). Dans le cas A, les molécules interagissent directement avec les ions magnétiques et s'échangent avec l'eau « libre » (éloignée de la particule). Dans le cas B, les molécules d'eau interagissent avec le métal via la première sphère de solvation. Dans ces deux cas, l'augmentation du taux de relaxation se fait via une interaction dipôle-dipôle qui décroît très rapidement avec la distance (voir ci-dessous l'équation (I.5)). Dans le cas C, le champ magnétique local créé par l'agent de contraste agit sur les particules d'eau qui diffusent à proximité et interagissent avec les spins de l'hydrogène.

En réalité, il n'existe pas d'agent de contraste purement  $T_1$  ou purement  $T_2$ , chaque agent de contraste va présenter les trois mécanismes d'interaction. Pour les agents de contraste en  $T_1$ , les mécanismes A et B prédominent tandis que le mécanisme C sera

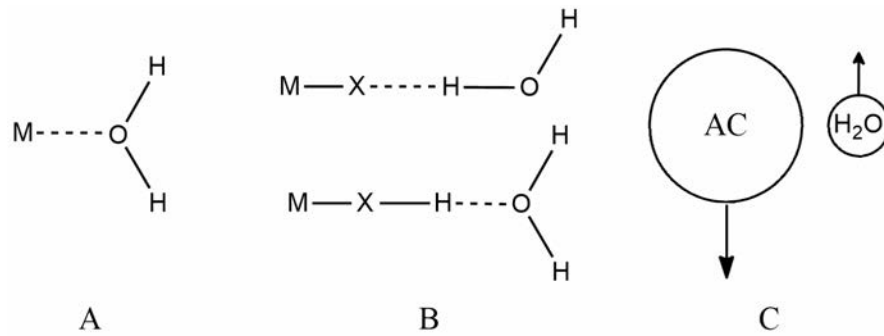
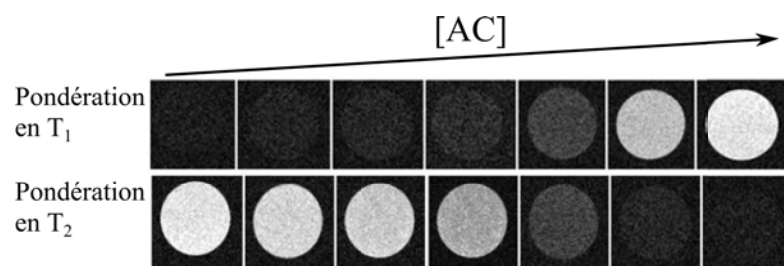


FIGURE I.3 – Mécanismes d'action des agents de contraste

prédominant pour les agents de contraste en  $T_2$ . C'est pourquoi les agents de contraste en  $T_1$  reposent majoritairement sur des entités paramagnétiques qui possèdent un grand moment magnétique très localisé [26–28] alors que les agents de contraste  $T_2$  sont à base de nanoparticules superparamagnétiques qui possèdent des champs de saturation élevés obtenus même sous relativement faibles champs. [29, 30]

Il est à noter que les agents de contraste  $T_1$  présentent l'avantage d'être des agents de contraste dits « positifs », c'est-à-dire que les zones où la concentration d'agent de contraste est grande va présenter une plus grande brillance (FIG. I.4). À l'inverse les agents de contraste  $T_2$  vont présenter un contraste « négatif » : les zones de plus grandes concentrations seront des zones « éteintes » sur l'image. Pour cette raison, nous avons choisi de développer une sonde multimodale qui agira comme une sonde en  $T_1$  pour l'IRM.

FIGURE I.4 – Comparaison des images obtenus avec des agents de contraste  $T_1$  et  $T_2$  pour des concentrations croissantes dans des tubes contenant de l'eau. Image adaptée de la REF. [31].

## Les agents de contraste $T_1$

Dans le cas d'agents de contraste  $T_1$ , la relaxivité est essentiellement donnée par les équations de Bloembergen-Solomon-Morgan :[32]

$$r_1 = C \frac{1}{d_{CAT-H}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2}, \quad (I.3)$$

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}}, \quad (I.4)$$

avec  $C$  une constante de proportionnalité dépendant notamment du moment magnétique de l'ion paramagnétique considéré,  $d_{CAT-H}$  la distance entre le cation paramagnétique et les protons de l'eau,  $\omega_H$  la fréquence de Larmor des protons,  $\tau_R$  le temps de réorientation par rotation de l'agent de contraste,  $\tau_m$  le temps de résidence de l'eau liée à proximité de l'agent de contraste et  $T_{1e}$  le temps de relaxation des spins électroniques du cation paramagnétique considéré, qui dépend du champ appliqué.

Dans le cas de champs magnétiques « faibles » (en-dessous de 3 Teslas) qui correspondent aux champs utilisés pour des applications cliniques, on a en général  $1 \gg \omega_H^2 \tau_c^2$ . [33] Dans ce cas, la relaxivité est donnée par :

$$r_1 = C' \frac{\tau_c}{d_{CAT-H}^6}. \quad (I.5)$$

Ainsi, l'augmentation du temps de réorientation par rotation qui correspond à un ralentissement de la rotation des ions permet d'augmenter la relaxivité de ces agents de contraste.[28, 34] De la même façon l'augmentation du temps de résidence de l'eau au voisinage des ions paramagnétiques va conduire à une augmentation de la relaxivité de notre agent de contraste.

Pour obtenir une sonde  $T_1$  pour l'IRM, il faut donc incorporer des ions paramagnétiques dans nos objets,[27] c'est-à-dire possédant un maximum d'électrons non appariés. Pour cette raison, deux ions sont majoritairement utilisés comme base pour les agents de contraste  $T_1$  : le gadolinium et le manganèse.

**Les complexes de gadolinium** L'ion le plus utilisé est le gadolinium ( $Gd^{3+}$ )[35] qui possède 7 électrons non appariés.<sup>1</sup> Malheureusement, l'ion  $Gd^{3+}$  est extrêmement

1. Il possède la une configuration électronique  $[Xe]6s^0 4f^7$ .

toxique sous sa forme libre : chez la souris, la dose létale médiane ( $DL_{50}$ )<sup>1</sup> est de 100-200  $\text{mg.kg}^{-1}$  (soit environ  $0,4 \text{ mmol(Gd).kg}^{-1}$ ) pour le chlorure de gadolinium hexahydrate ( $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) injecté par voie intraveineuse.[35] Pour diminuer la toxicité, il est nécessaire de chélater les ions gadolinium[28, 36, 37]. La figure I.5 donne quelques exemples de ligands développés et utilisés cliniquement.

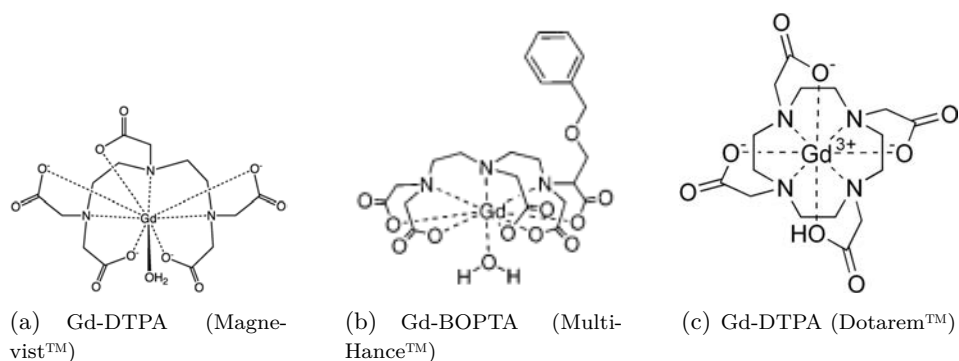


FIGURE I.5 – Exemples de complexes de gadolinium utilisés comme agent de contraste

Cependant, même complexé, le gadolinium reste toxique (le Gd-DOTA possède une  $DL_{50}$  de l'ordre de  $10 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ), notamment à cause de la transmétallation. Depuis quelques années, un certain nombre de rapports ont montré un lien entre l'apparition de fibrose néphrogénique systémique et l'injection intraveineuse de complexes de gadolinium.[38–40]

**Les complexes de manganèse** Afin de remplacer les agents de contraste à base de gadolinium, plusieurs groupes se sont intéressés à un autre ion possédant un grand nombre d'électrons non appariés :  $\text{Mn}^{2+}$ , qui possède une configuration électronique  $[\text{Ar}]4s^03d^5$  et donc 5 électrons non appariés. Même si le manganèse présente aussi des risques de toxicité, sa toxicité reste limitée : la  $DL_{50}$  pour le chlorure de manganèse tétrahydrate ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) est de  $7,5 \pm 0,6 \text{ mmole/kg}$ . Là encore pour limiter encore les problèmes de toxicité, un certain nombre de ligands chélateurs ont été développés et l'un d'entre eux, le dipyridoxyl-diphosphate de manganèse (la structure est donnée dans la figure I.6), est actuellement utilisé cliniquement pour la détection de lésions hépatiques.

**Nanoparticules utilisées comme agent de contraste  $T_1$**  Pour obtenir des relaxivités plus élevées et éviter le relargage d'ions, des nanoparticules contenant soit

1. c'est la dose à administrer pour causer la mort de 50 % d'une population testée

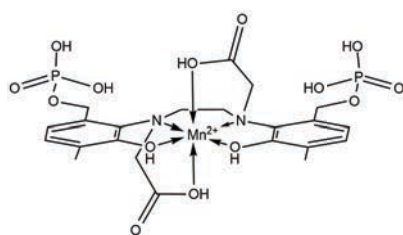


FIGURE I.6 – Structure chimique du dipyridoxyl-diphosphate de manganèse commercialisé sous le nom Teslascan™ (GE Healthcare)

du gadolinium soit du manganèse ont été développée comme agent de contraste. En effet, l'incorporation de ces ions paramagnétiques dans des nanoparticules devrait permettre notamment le ralentissement de leur rotation et donc augmenter la relaxivité (voir équation (I.5)). Ainsi, Gaceur *et al.* ont montré que l'incorporation de manganèse dans des nanoparticules de sulfure de zinc permet d'obtenir des relaxivités par manganèse trois à dix fois plus élevée que pour des complexes de manganèse.[41] De la même façon, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de manganèse, MnO, permet également d'obtenir des relaxivités plus élevées que pour les complexes de manganèse.[25, 42–44] D'autres nanoparticules un peu plus à base de manganèse ont été développées comme agent de contraste pour l'IRM. On peut citer par exemple les travaux de Liu *et al.* portant sur la fabrication et l'utilisation de nanoparticules de  $\text{KMnF}_3$  pour imager le cerveau d'une souris[45] ou encore ceux de Paul *et al.* qui ont fabriqué des nanoparticules de  $\text{K}_{4y-3+x}\text{Mn}_x\text{In}_{1-x}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_y$ . [46]

De même, la synthèse de nanoparticules d'oxydes de gadolinium,  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ , permet d'obtenir des relaxivités jusqu'à dix fois plus élevées que pour un complexe chélateur (FIG. I.7).[47] La comparaison des relaxivités de nanoparticules de tailles semblables (autour de 2 nm) mais avec des ligands différents montre le rôle non négligeable de ces derniers. Ceci peut venir du fait que les différents types de ligands vont modifier les temps de résidence  $\tau_m$  de l'eau au voisinage de la surface des nanoparticules et donc modifier la relaxivité (voir equation (I.4)).

**Le cas particulier des nanoparticules d'oxydes de fer** Un dernier de type de nanoparticules pouvant être utilisée comme agent de contraste en  $T_1$  : les nanoparticules d'oxyde de fer de taille inférieure à 3 nm. Les nanoparticules d'oxyde de fer et leurs dérivés du type  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  ( $\text{M} = \text{Fe}, \text{Ni}, \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Co}$ ) sont principalement utilisées comme agent de contraste en  $T_2$ [48–56] car elles présentent un caractère superpara-magnétique. Lorsque les particules sont « suffisamment » petites, elles ne présentent

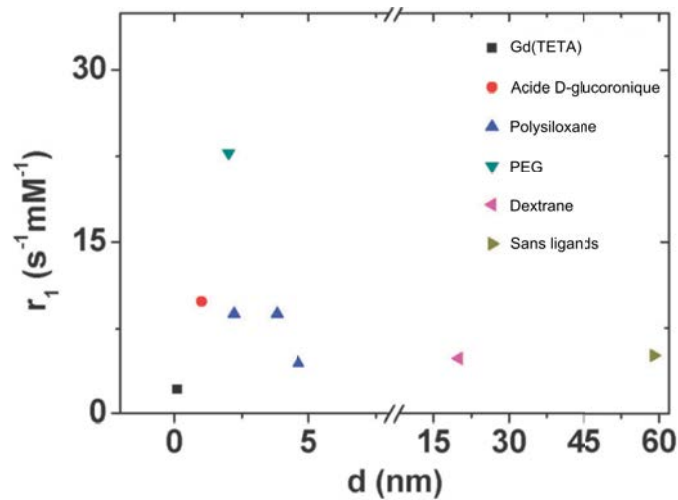


FIGURE I.7 – Comparaison des relaxivités pour un complexe de gadolinium (■) et pour des nanoparticules de  $Gd_2O_3$  avec différents ligands en surface : acide D-glucuronique (●), polysiloxane (▲), polyéthylène glycol (▼), dextrane (◄) et sans ligand (►). Image adaptée de la REF. [47]

qu'un domaine magnétique et on peut considérer que la nanoparticule possède un moment magnétique global. En réalité, les spins sont alignés à l'intérieur de la nanoparticules mais sont orientés aléatoirement en surface : c'est ce qu'on appelle le « spin canting effect » (FIG. I.8). Lorsque la taille de la nanoparticule diminue la proportion de spin en surface augmente et le moment magnétique global diminue, ce qui entraîne une diminution de la relaxivité transversale des nanoparticules et augmente l'effet sur la relaxivité longitudinale.[31, 57, 58]

## I.2 Fluorophores émettant dans le proche infrarouge

Comme nous l'avons vu au début du chapitre, l'imagerie de fluorescence est une technique qui est limitée par la faible profondeur de pénétration principalement à cause de l'absorption et de la diffusion par les tissus. Les coefficients d'absorption des principaux constituants des tissus sont présentés sur la figure I.9. On peut observer que l'absorption des différents constituants est minimale pour une gamme spectrale comprise entre 700 et 1000 nm : c'est ce qu'on appelle la « première fenêtre thérapeutique ». De plus, la diffusion qui évolue comme  $1/\lambda^n$  (n variant selon les tissus rencontrés) est également plus faible dans le proche infrarouge que dans le visible. Dans cette gamme de longueur d'onde, la profondeur de pénétration peut atteindre quelques centimètres.

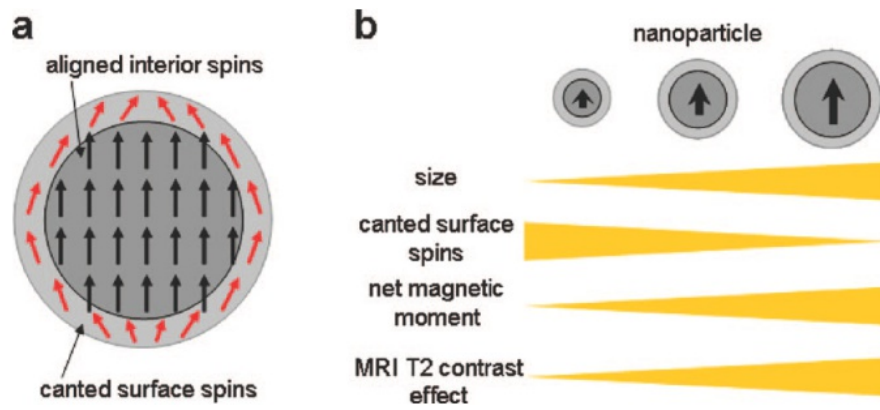


FIGURE I.8 – Schéma de principe du « spin canting effect » (a) et influence de la taille de la nanoparticule sur les propriétés magnétiques (b). Image tirée de la REF. [59].

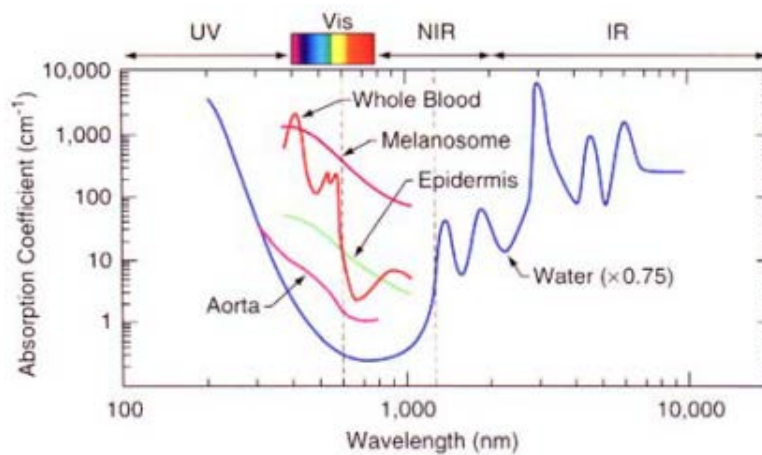


FIGURE I.9 – Coefficients d'absorption des principaux constituants des tissus. Image tirée de la REF. [60].

Un autre problème qui limite l'utilisation de l'imagerie de fluorescence est ce qu'on appelle l'autofluorescence des tissus. Lorsqu'ils sont soumis à une excitation, les tissus et les organes émettent de la lumière qui va augmenter le bruit de la mesure (FIG. I.10). Là encore c'est dans la gamme du proche infra-rouge que l'autofluorescence est la plus limitée. Ces deux observations font de la gamme du proche infra-rouge une gamme spectrale particulièrement intéressante.

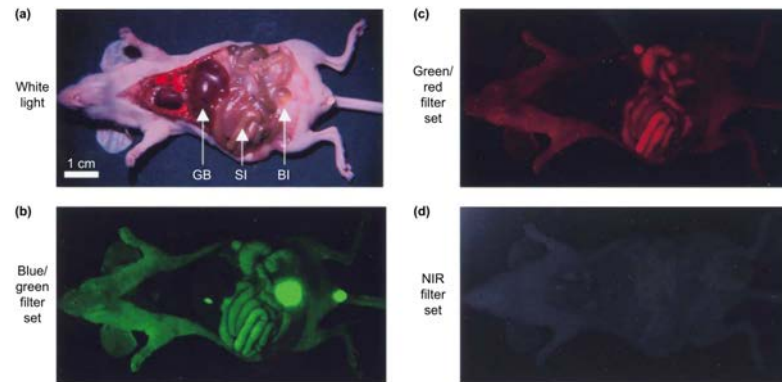


FIGURE I.10 – Démonstration de l'autofluorescence d'organes et des fluides corporels. (a) Image d'une souris sacrifiée et indications de vésicule biliaire (GB), petit intestin (SI) et vessie (BI). L'autofluorescence a ensuite été visualisée dans trois gammes spectrales en utilisant des filtres passe-bandes à l'excitation/visualisation : (b) bleu (460-500 nm)/vert (505-560 nm) ; (c) vert (525-555 nm)/rouge (590-650 nm) ; et rouge (725-775 nm)/proche infra-rouge (790-830 nm). Image tirée de la REF. [61].

Il existe essentiellement trois classes de fluorophores couvrant la gamme spectrale qui nous intéresse (700-1000 nm) : les fluorophores organiques, les nanoparticules dopées avec des terres rares et les quantum dots. Chacune de ces classes possède des avantages et des inconvénients qu'il convient de prendre en compte lors du choix de la sonde.

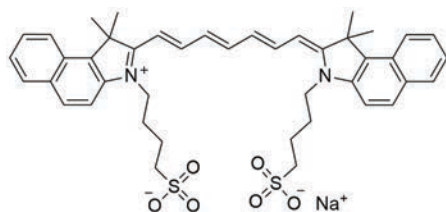
### I.2.1 Les fluorophores organiques

Les fluorophores (ou colorants) organiques sont des molécules possédant un système  $\pi$  conjugué important. Ces molécules présentent l'avantage de présenter une faible toxicité et une élimination rapide. Malheureusement, elles présentent une longueur d'émission fixe et souvent des rendements quantiques faibles dans le proche infra-rouge (de l'ordre de quelques pourcents dans l'eau) ainsi qu'un photoblanchiment<sup>1</sup> rapide. De plus, les faibles de temps de circulation (de l'ordre de la dizaine de minutes) et la difficulté de fonctionnaliser ces sondes peuvent également poser problème pour les applications nécessitant

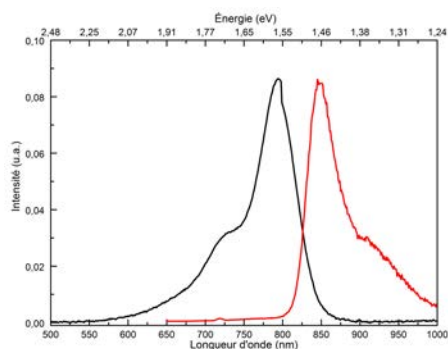
1. Le photoblanchiment est la perte de fluorescence d'un fluorophore lorsqu'il est illuminé.

un suivi dans le temps ou le ciblage. Les colorants organiques qui émettent dans le proche infra-rouge sont principalement des cyanines,[62–64] mais il existe également des phtalocyanines,[65] des porphyrines[66] ou des composés plus exotiques comme les aza-difluoroboradiaza-*s*-indacene.[67]

Parmi celles-ci, le vert d'indocyanine (ICG, FIG. I.11(a)) et le bleu de méthylène sont, à ma connaissance, les seuls fluorophores organiques approuvés par l'Agence européenne des médicaments (EMA pour *European Medicines Agency* en anglais) pour un usage humain. Cependant, le bleu de méthylène présente un rendement quantique trop faible et n'est pas utilisé en fluorescence. L'ICG est notamment utilisé en ophtalmologie pour réaliser des angiographies.[68, 69] La figure I.11(b) présente les courbes d'émission et d'absorption de l'ICG dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). On observe un pic d'émission autour de 870 nm et une absorbance non nulle sur la gamme 650-850 nm. Si dans le DMSO le rendement quantique de ce composé atteint environ 13 %,[62] il est de l'ordre de 0,3 % dans l'eau et de l'ordre de 1,2 % dans le sang.[70]



(a) Structure moléculaire de l'ICG



(b) Spectre d'absorbance (noir) et d'émission (rouge) de l'ICG

## I.2.2 Les nanoparticules dopées aux terres rares

Une première classe de nanoparticules permet d'obtenir des sondes fluorescentes : les nanoparticules dopées aux terres rares. Les ions lanthanides sont inclus dans des matrices d'oxydes (LaPO<sub>4</sub>, YVO<sub>4</sub>, CePO<sub>4</sub>) ou de fluorures (NaYF<sub>4</sub>, LaF<sub>3</sub>, GdOF).[71–73] Les longueurs d'onde d'excitation sont déterminées par les ions incorporés et la matrice dans laquelle ils sont incorporés, puisque la fluorescence provient de transitions entre niveaux 4*f* des ions lanthanides.[74]

## Principe de fonctionnement

Ces nanoparticules sont intéressantes car le mécanisme de fluorescence repose sur l'« *upconversion* » : à partir de deux photons ou plus de basse énergie, on récupère un photon de plus haute énergie (FIG. I.11). Ceci permet d'avoir des sources d'excitation dans le proche infrarouge et qui permet d'augmenter la profondeur de pénétration [72] de l'excitation mais pour des ions dopants  $\text{Eu}^{3+}$  [75]  $\text{Er}^{3+}$  [76, 77] ou encore  $\text{Tb}^{3+}$  [78, 79] l'émission se fait dans le visible, ce qui limite la profondeur de travail. [71] Récemment, le développement de nanoparticules codopées par des ions  $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$  a permis d'obtenir une émission autour de 800 nm à partir de deux photons incidents à 980 nm. [80–83]

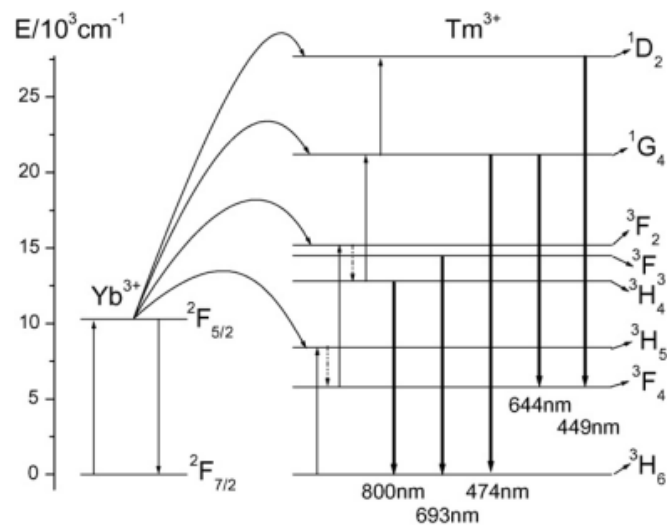


FIGURE I.11 – Schéma du diagramme d'énergie du système  $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ . Image tirée de la REF. [84]

Cette classe de composés souffre de deux problèmes qui limitent quelque peu leur utilisation : une faible section efficace d'absorption et des rendements quantiques faibles (entre 5 et 15 %). [85] La section efficace d'absorption de ces nanoparticules est faible car c'est en fait celle des ions lanthanides (de l'ordre de  $10^{-20} \text{ cm}^2$ ). [85] Afin d'augmenter le coefficient d'absorption de ces nanoparticules, il est possible de tirer partie de transferts d'énergie depuis des espèces sensibilisantes vers les ions lanthanides. Par exemple, l'ion  $\text{Yb}^{3+}$  possède une section efficace d'absorption plus élevée que les autres lanthanides. [71] De plus, la seule transition possible, qui correspond à une absorption autour de 980 nm, est résonante avec des transitions entre niveaux 4f d'autres ions lanthanides (entre autre

1. À titre de comparaison, on a des sections efficaces d'absorption de l'ordre de  $(5.10^{-16})r^3 \text{ cm}^2$  pour des quantum dots CdSe ( $r$  étant le rayon en nm).

$\text{Er}^{3+}$  et  $\text{Tm}^{3+}$ ), ce qui facilite le transfert d'énergie depuis les ions  $\text{Yb}^{3+}$  vers les ions émetteurs.

### Applications pour l'imagerie

L'utilisation de nanoparticules de  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb,Er}$  a permis à Wang *et al.* d'obtenir des images à une profondeur de 8 mm.[86] Liu *et al.* ont montré qu'il est possible de détecter *in vivo* des groupes de 50 cellules marquées avec des nanoparticules  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ . [87] Le marquage de tumeur a pu être réalisé chez la souris en utilisant des nanoparticules  $\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Tm}$ , la détection pouvant se faire en fluorescence et en tomographie.[88] En effet, les lanthanides dont fait partie le lutétium, sont riches en électrons et sont donc susceptibles d'absorber les rayons X. Des nanoparticules dopées à la fois avec des lanthanides ( $\text{Eu}^{2+}/\text{Dy}^{3+}$ ) et manganèse ont été développées par Le Masne de Chermont *et al.*[89] Dans ces nanoparticules, les ions lanthanides servent d'accepteurs primaires et l'énergie est transmise sous forme thermique au manganèse qui émet autour de 700 nm. Comme l'émission de fluorescence dure plusieurs dizaines de minutes, il est possible d'« allumer » les sondes avant de les injecter dans la souris (FIG. I.12A). On peut alors obtenir des images plusieurs minutes après injection (FIG. I.12B).

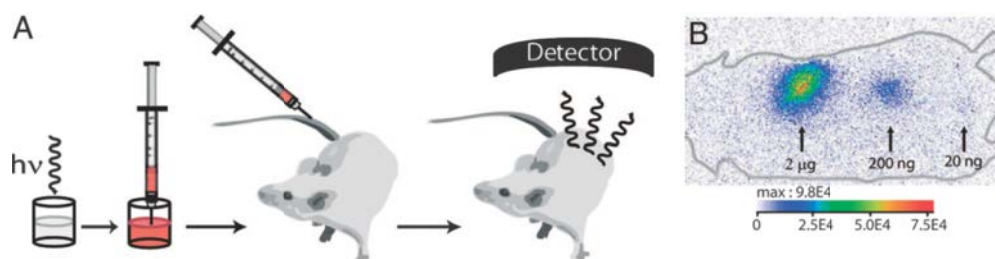


FIGURE I.12 – Principe de l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistente (A) et image obtenue 2 minutes après injection sous-cutanée chez la souris de 3 doses différentes de nanoparticules (B). Image tirée de la REF. [89]

#### I.2.3 Les quantum dots

Les boîtes quantiques, ou quantum dots en anglais (QDs), sont des nanocristaux fluorescents de semi-conducteurs purs (Si) ou composés : de type II-VI ( $\text{CdSe}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{ZnSe}$ )[90–93], III-V ( $\text{InP}$ ,  $\text{InAs}$ ,  $\text{GaAs}$ )[94–98], IV-VI ( $\text{PbSe}$ ,  $\text{PbS}$ )[99–102] ou encore de type I-III-VI<sub>2</sub> ( $\text{CuInS}_2$ ,  $\text{CuInSe}_2$ )[1, 2, 103]. Ces nanocristaux sont recouverts d'une couche de ligands organiques (carboxylates, amines, phosphines...) qui ont pour but

d'assurer la dispersion colloïdale de ces objets et de passiver la surface du quantum dot. Leur taille, inférieure à la dizaine de nanomètres en général, implique une grande importance des effets de surface. Leur longueur d'émission dépend de la composition et de la taille des cristaux.[104–106] Ils présentent une grande section efficace d'absorption (à un comme à deux photons),[107] des rendements quantiques élevés ainsi qu'une grande résistance au photoblanchiment.[108]

### Principe de fonctionnement

Dans un semi-conducteur massif, il existe un quasi-continuum dans les bandes de valence et de conduction. Lorsque la taille des nanocristaux devient comparable ou inférieure à la dimension caractéristique des charges (les électrons et les trous), les effets du confinement quantique apparaissent. Cela revient à considérer que les charges sont confinées dans un puit de potentiel dont la largeur dépend de la taille de la nanoparticule. Dans ce cas, le quasi-continuum de la charge confinée disparaît et laisse place à des niveaux discrets d'énergie (FIG. I.13(a)) : l'écartement des niveaux et donc la longueur d'onde d'émission dépendent directement de la taille du nanocristal. Par exemple, il est possible de synthétiser des nanocristaux de CdSe ( $E_g = 1,74$  eV, soit 712 nm pour la structure wurtzite) de différentes tailles et couvrir toute la gamme du visible (FIG. I.13(b)).

L'absorption d'un photon avec une énergie plus grande que la bande interdite conduit à la formation d'une paire électron-trou qui thermalise vers les bords de la bande interdite. L'émission de fluorescence se fait alors par la recombinaison radiative de la paire électron-trou.

### Applications des QDs en imagerie

Les rendements quantiques élevés et la grande photostabilité des QDs en font des sondes particulièrement intéressantes pour l'imagerie *in vitro* comme *in vivo*. Les quantum dots peuvent ainsi être utilisés pour le marquage de structures ou de molécules dans des cellules. Bruchez *et al.* ont ainsi montré en 1998 que deux populations de quantum dots pouvaient servir de marqueurs pour différentes structures cellulaires.[109] Ainsi, des quantum dots émettant dans le vert et fonctionnalisés avec des silanes anioniques ont été utilisés pour visualiser le noyau de fibroblastes de souris tandis que d'autres, émettant dans le rouge et couplés à des biotine ont permis de marquer simultanément des filaments d'actine. En 2003, Wu *et al.* incubent des quantum dots CdSe/ZnS fonctionnalisés avec des immunoglobulines G (IgG) en présence de cellules de cancer du sein.[108] Ils ont

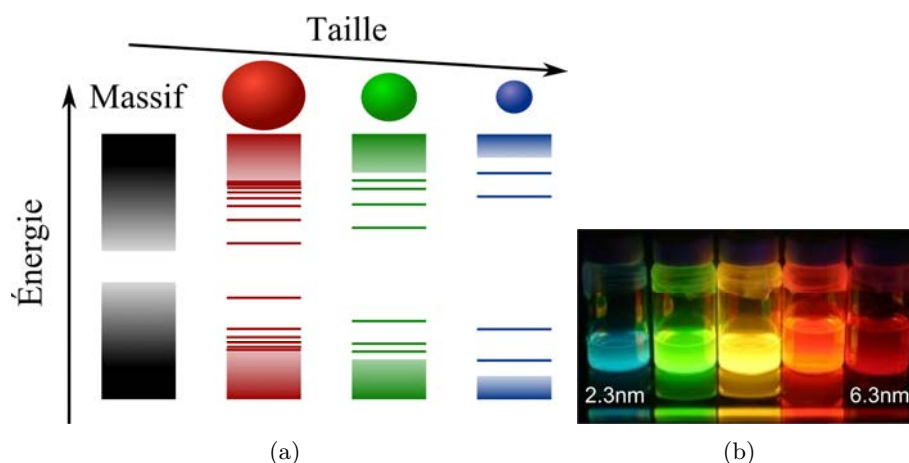


FIGURE I.13 – Schéma des structures de bandes pour les matériaux massifs et des quantum dots de différentes tailles (a) ; photo de solution de QDs de CdSe avec des tailles comprises entre 2 et 6 nm (b)

ainsi réussi à marquer et mettre en évidence la présence de marqueur Her2 à la surface des cellules cancéreuses.

Les quantum dots ont également été utilisés pour faire des images *in vivo*. Dubertret *et al.* injectent des quantum dots fonctionnalisés avec des micelles phospholipidiques dans une cellule d'embryon de *Xenopus*. Lors de l'embryogénèse, seules les cellules issues de la première cellule marquée contiennent des quantum dots.[110] Les quantum dots permettent donc d'effectuer un lignage cellulaire sans altérer le développement de l'embryon.

**Détection de ganglions lymphatiques** Une des applications *in vivo* les plus étudiées est le marquage de ganglions lymphatiques. Kobayashi *et al.* ont ainsi utilisé cinq populations de quantum dots différents pour marquer des ganglions dans différentes régions dans une souris.[111] Plusieurs équipes se sont intéressées à la détection d'un ganglion lymphatique particulier : le ganglion lymphatique sentinelle (GLS) chez les patients présentant une tumeur. Le ganglion sentinelle est le ganglion le plus proche de la tumeur et sa résection est une étape importante pour le diagnostic. En effet, si la tumeur est cancéreuse, on retrouvera des cellules cancéreuses dans le ganglion et l'analyse de ce ganglion permet donc de déterminer le traitement idoine à appliquer.

## Les QDs émettant dans le proche infra-rouge

Plusieurs matériaux peuvent être utilisés pour obtenir des QDs émettant dans le proche infra-rouge : CdTe, PbSe, PbTe, InAs, InP ou encore Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub> (FIG. I.14).[112, 113] Une des causes de toxicité des nanoparticules *in vivo* est le relargage des ions constitutifs. Parmi les premiers matériaux utilisés, seul InP ne contenait pas d'éléments fortement toxiques. Malheureusement, il est extrêmement difficile d'obtenir des nanoparticules d'InP suffisamment grosses pour obtenir une émission dans le proche-infrarouge et il a donc fallu trouver de nouveaux matériaux moins toxiques.

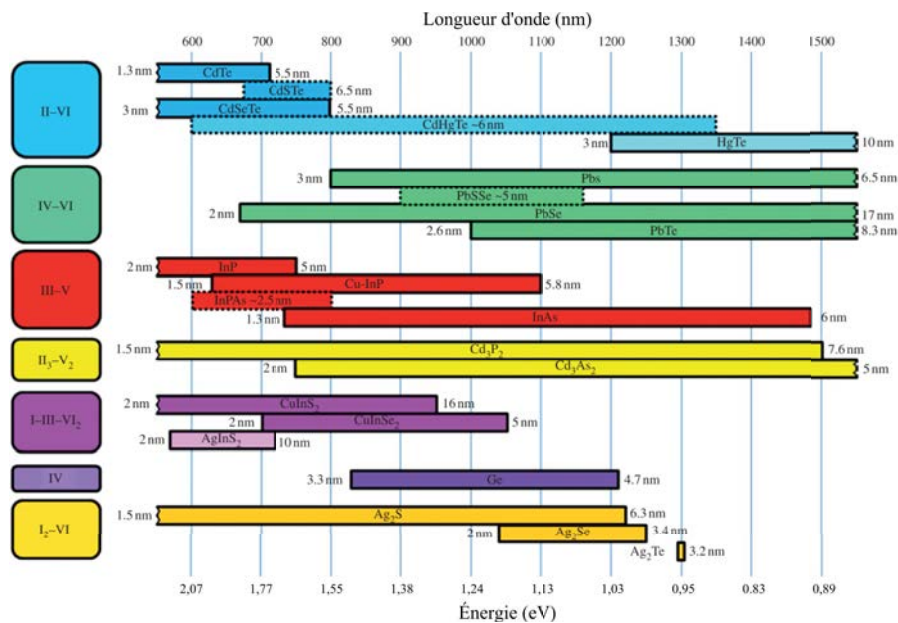


FIGURE I.14 – Récapitulatif des différents matériaux permettant des quantum dots émettant dans la « fenêtre thérapeutique ». Les matériaux pour lesquels la longueur d'onde d'émission ne dépend que de la composition sont entourés de points. Image tirée de la REF. [113]

Pour ces raisons, des quantum dots à base de chalcogénures de cuivre et d'indium (CuInE<sub>2</sub> avec E=S ou Se) ont été développés.[103, 114–118] Ces matériaux possèdent des largeurs de bande interdite compatibles avec des nanoparticules émettant dans le proche-infrarouge : 1.53 eV pour le CuInS<sub>2</sub> massif et 1,04 eV pour le CuInSe<sub>2</sub> massif en structure chalcopyrite.[119] En 2009, l'équipe de Peter Reiss est la première à montrer que des nanoparticules de CuInS<sub>2</sub> pouvaient être détectées dans après injection dans une souris.[120] Notre équipe, en collaboration avec une équipe de l'Institut de Cancérologie de Lorraine à Nancy, a également montré que des particules de CuInS<sub>2</sub> ou CuInSe<sub>2</sub>

pouvaient être utilisés pour la détection du ganglion sentinelle dans le cas du cancer du sein chez la souris avec une toxicité bien plus faible qu'avec des quantum dots à base de CdTe.[1, 2] Plus récemment, Guo *et al.* ont montré que des quantum dots à base de CuInS<sub>2</sub> permettaient le marquage de tumeur chez la souris.[121]

### I.3 Les nanoparticules magnétiques et fluorescentes dans la littérature

Pour coupler l'imagerie de fluorescence et l'IRM, il est nécessaire de coupler une entité magnétique et une entité fluorescente dans une seule et même sonde afin de permettre la colocalisation des cibles d'intérêt.

### I.4 Techniques utilisées

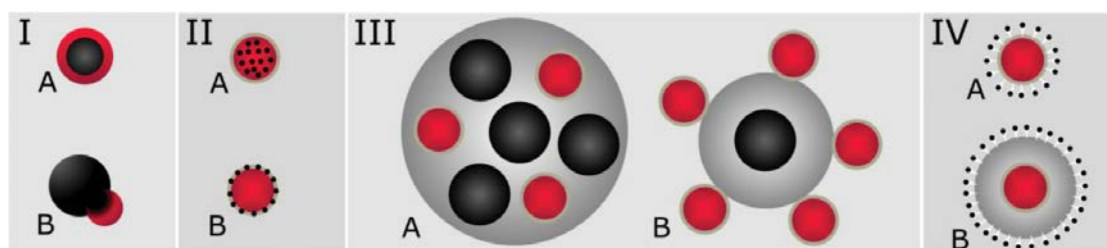


FIGURE I.15 – Schéma des principales stratégies adoptées pour la fabrication de sondes bimodales pour l'IRM et l'imagerie de fluorescence. En rouge, l'entité fluorescente. En noir, l'entité magnétique. Image tirée de la REF. [122].

Plusieurs méthodes couplant une sonde fluorescente et une magnétique, de façon chimique ou physique, ont été développées.[59, 122, 123] La figure I.15 présente les différentes stratégies adoptées. Dans le cas I, on dépose une entité fluorescente sur une nanoparticule magnétique soit sous la forme d'une coque, soit en formant une hétérostructure. Kim *et al.* ont obtenu de tels objets en faisant croître une coque de CdSe (fluorescente) sur des cœurs magnétiques de cobalt (FIG. I.16a).[124] Dans d'autres systèmes, FePt/CdS,[125] Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CdS,[126] ou encore Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CdSe,[127] la croissance du chalcogénure ne se fait pas sous forme de coque mais plutôt sous forme d'hétérostructure (FIG. I.16b). Cette méthode permet d'obtenir des objets stables chimiquement mais leur synthèse qui repose sur la compétition entre nucléation homogène et hétérogène des quantum dots reste difficile. De plus, les rendements quantiques atteints restent faibles

(de l'ordre de 5 %), ce qui est principalement dû à l'impossibilité de faire croître une coque permettant de passiver les défauts à la surface des quantum dots.

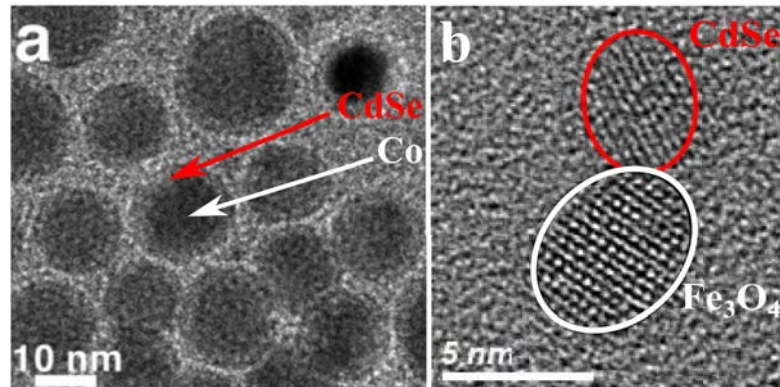


FIGURE I.16 – Image de microscopie électronique de nanoparticule (a) Co/CdSe (Image tirée de la REF. [124]) (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CdSe}$  (nanoparticules synthétisées au laboratoire).

Dans le cas II, l'inclusion d'ions paramagnétiques dans le cœur (a) ou la coque (b) d'une nanoparticule fluorescente permet d'obtenir une sonde bifonctionnelle. Ainsi la croissance de coques de sulfure de zinc dopées avec des ions  $\text{Mn}^{2+}$  sur des quantum dots de CdSe a permis à Wang *et al.* d'obtenir des sondes fluorescentes et magnétiques.[128] L'inclusion d'ions magnétiques  $\text{Fe}^{3+}$ [129] ou  $\text{Ni}^{2+}$ [130] dans des quantum dots à base de tellure de cadmium permet d'obtenir des nanoparticules superparamagnétiques qui émettent dans le proche infra-rouge. Cette méthode a également été appliquée pour d'autres quantum dots : InP:Mn[131], Si:Mn[132, 133] ou encore PbS:Mn.[134] L'utilisation de ces nanoparticules est limitée par le faible nombre d'ions incorporés dans les différents types de quantum dots qui ne permet pas d'obtenir des relaxivités suffisamment élevées. Cette stratégie a également été utilisée pour obtenir des sondes bimodales utilisant la fluorescence des terres rares. Le développement de matrices contenant des ions  $\text{Gd}^{3+}$  ( $\text{NaGdF}_4$ [75],  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ [135]) et dopées avec des ions  $\text{Eu}^{3+}$  permet d'obtenir des sondes paramagnétiques et fluorescentes dans le rouge. L'utilisation d'une matrice  $\text{NaMnF}_3$  dopées avec des ions  $\text{Yb}^{3+}$  et  $\text{Er}^{3+}$  a permis à Zhang *et al.* de limiter les problèmes de toxicité liés au gadolinium.[136] Cependant, la longueur d'onde d'émission autour de 660 nm limite les applications de ces nanoparticules.

Dans le cas III, les deux entités fluorescentes et magnétiques sont incorporées dans une matrice. Yi *et al.* ont ainsi synthétisé des nanoparticules de silice dans lesquelles sont inclus à la fois des nanoparticules de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) et des quantum dots CdSe (FIG. I.17).[137] Salgueiriño-Maceira *et al.* ont recouverts des agrégats de nanopar-

ticules d'oxyde de fer par une couche de silice contenant des quantum dots CdTe.[138] L'utilisation de silice permet de protéger les propriétés optiques des quantum dots en les éloignant de l'eau. Cependant, cette méthode fournit des objets de taille relativement élevée : Yi *et al.* obtiennent ainsi des particules avec des diamètres de l'ordre de 50 nm tandis que les objets de Salgueiriño-Maceira *et al.* atteignent des diamètres d'environ 170 nm. Une autre méthode consiste à adsorber des polyélectrolytes à la surface de nanoparticules de magnétite et à ensuite adsorber des quantum dots sur ces polyélectrolytes (FIG. I.18).[139] Cette technique permet d'obtenir des objets plus petits (de l'ordre de 35 nm de diamètre) qu'en utilisant de la silice mais la stabilité de la sonde, qui repose sur une interaction physique, pourrait être limitée *in vivo*.

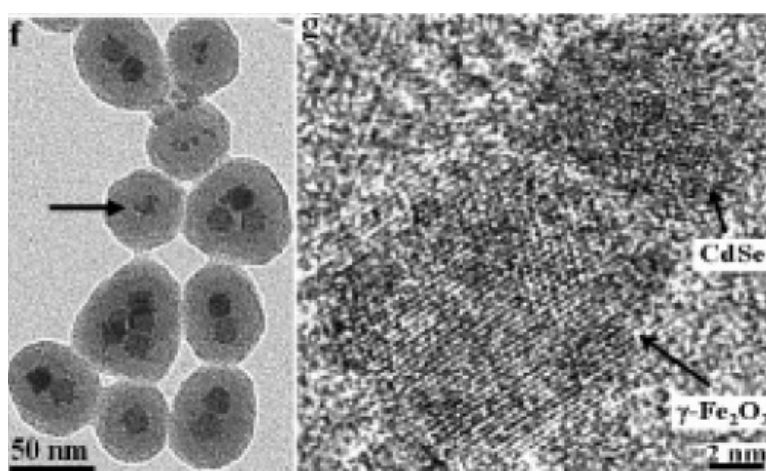


FIGURE I.17 – Images de microscopie électronique de nanoparticules de silice contenant des particules de maghémite et de CdSe. L'image de haute résolution de la particule indiquée par une flèche permet de confirmer la présence des deux types de particules.

Le cas IV correspond au greffage de complexes de gadolinium sur des entités fluorescentes. Pour leur étude sur la migration de cellules souches transplantées, Modo *et al.* ont par exemple utilisé une chaîne de dextrane (un polymère de dextrose) sur laquelle ils ont greffé un fluorophore organique, une rhodamine (FIG. I.19, en orange), et un complexe de gadolinium, le Gd-DTPA (FIG. I.19, en bleu).[21, 140] Cette méthode peut également être utilisée pour greffer des complexes de gadolinium sur différents types de nanoparticules. Yang *et al.* ont greffé des triacides carboxyliques, qui peuvent chélater les ions  $Gd^{3+}$ , à la surface de nanoparticules de silice contenant des quantum dots.[141] Le couplage de ligands chélateurs avec des thiolates ou des dithiolates a permis à Stasiuk *et al.* de conférer des propriétés magnétiques à des quantum dots InP/ZnS.[142, 143] Cette méthode présente des résultats intéressants mais aussi quelques limites. L'utilisation de

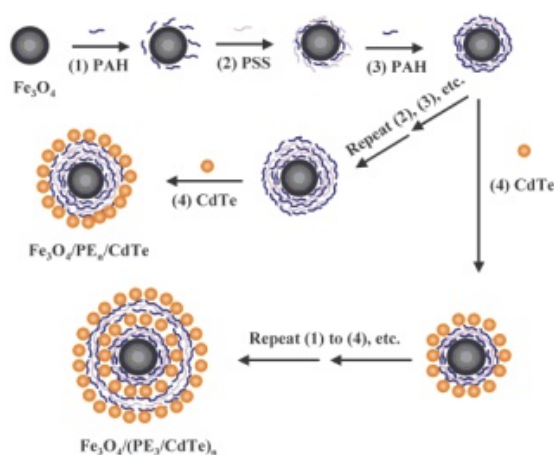


FIGURE I.18 – Schéma du principe de fabrication de sondes obtenues par Hong *et al.*. Trois couches de polyélectrolytes sont adsorbées successivement sur des nanoparticules d'oxyde de fer (étapes 1 à 3) et on adsorbe ensuite des nanoparticules fluorescentes (étape 4).

ligands rigides, qui va diminuer les temps de rotation des complexes, permet d'obtenir des relaxivités plus élevées qu'avec le complexe seul. Malheureusement, les ligands ne sont pas liés de façon covalente aux particules et la dynamique de décrochage de ces ligands pourraient poser des problèmes de biodistribution. Cette méthode souffre également des problèmes liés à l'utilisation des complexes de gadolinium et notamment la toxicité.

Plusieurs de ces objets posent plusieurs problèmes : toxicité des composants (cadmium et gadolinium principalement), faible nombre d'ions paramagnétiques par sondes, propriétés fluorescentes limitées (photoblanchiment rapide, longueur d'onde d'émission inadaptée et/ou rendement quantique faible) ou encore stabilité *in vivo* de certains composés qui repose sur des interactions faibles.

## I.5 Sondes bimodales basées sur des quantum dots I-III-VI

Nous avons vu un peu plus haut que les quantum dots à base de matériau I-III-VI permettent d'obtenir des sondes fluorescentes stables avec une longueur d'onde d'émission modulable sur la « fenêtre thérapeutique ». Avant le début de ce travail de thèse, en septembre 2011, aucun rapport, à notre connaissance, ne mentionnait de sondes multimodales basées sur ce type de nanoparticules mais plusieurs des stratégies décrites ci-dessus ont depuis été décrites dans la littérature. L'incorporation de nanoparticules de magnétite et de quantum dots  $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$  dans une nanoparticule de silice a permis à Sun *et al.* d'obtenir des sondes stables mais avec un diamètre hydrodynamique mini-

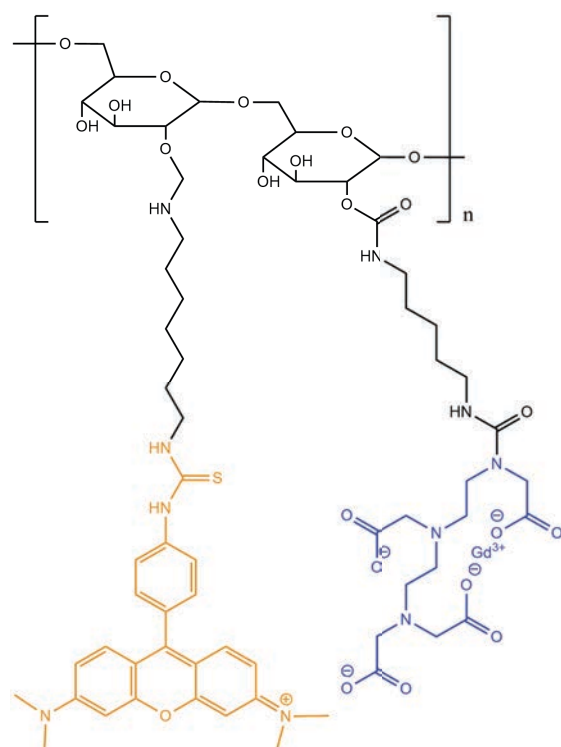


FIGURE I.19 – Structure moléculaire du polymère utilisé par Modò *et al.*[21, 140] une chaîne de dextrane sur laquelle est greffée une rhodamine (orange) et un complexe de gadolinium (bleu).

mal d'environ 170 nm.[144] Le greffage de complexes chélateurs des ions gadolinium a pu être réalisé à la surface de quantum dots  $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$  encapsulés dans la silice[145] ou dans un polymère amphiphile.[146]

L'incorporation d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  dans des cœurs de  $\text{CuInS}_2$ [147] ou dans une coque de  $\text{ZnS}$  déposé sur des cœurs de  $\text{CuInS}_2$ [148, 149] permet d'obtenir des objets fluorescents et paramagnétiques. Malheureusement, les longueurs d'onde d'émission de ces objets sont limitées au visible et aucune étude de l'influence du taux de manganèse sur la relaxivité n'a été réalisée.

## I.6 Solution proposée

Le but de nos sondes est de permettre la colocalisation de cibles à la fois en IRM et en imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge. Nous avons donc besoin d'une sonde fluorescente et paramagnétique qui soit stable dans le temps pour éviter la séparation des deux fonctions qui pourraient avoir des biodistributions différentes et donc ne plus être colocaliser. Il nous faut également une sonde soluble et stable dans les milieux aqueux.

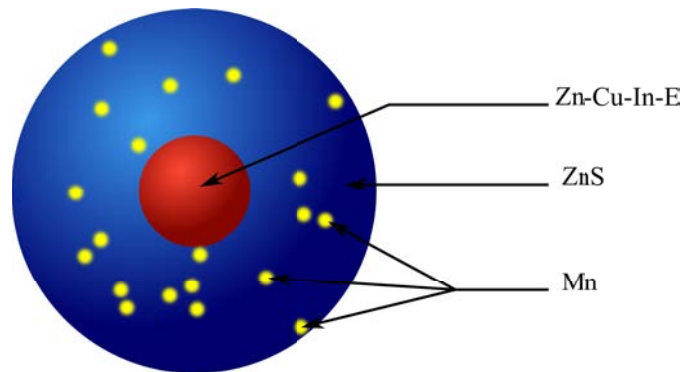


FIGURE I.20 – Schéma des nanoparticules synthétisées durant cette étude. Le cœur de  $\text{Zn-Cu-In-E}$  assure le caractère fluorescent de nos sondes tandis que les ions manganèse incorporés dans la coque de  $\text{ZnS}$  leur confère un caractère paramagnétique.

Pour répondre à ce cahier des charges, nous proposons d'utiliser des quantum dots émettant dans le proche infra-rouge sur lesquels nous avons fait croître une coque de sulfure de zinc dans laquelle sont inclus des ions paramagnétiques  $\text{Mn}^{2+}$ . Nous avons donc synthétisé des cœurs à base de matériau I-III-VI qui ont une longueur d'onde d'émission modulable sur toute la « fenêtre thérapeutique » (700-1000 nm) et ne contiennent pas d'éléments toxiques. L'obtention d'un signal mesurable en IRM nécessite l'inclusion d'un grand nombre d'ions manganèses par particules, qui a été rendu possible grâce au développement d'une méthode de croissance de coques épaisses (2-3 nm) de sulfure

de zinc sur nos objets. Ces synthèses se faisant en milieu organique, les particules ainsi obtenues ne sont pas hydrosolubles et une étape d'échange de ligands nous a permis de transférer ces nanoparticules en phase aqueuse. L'étude *in vitro* de l'influence du taux de manganèse dans nos coques sur les propriétés structurales, magnétiques et fluorescentes nous a permis de trouver l'échantillon optimal pour l'imagerie *in vivo*. Finalement, après une étude de la cytotoxicité de nos sondes, nous avons pu montrer qu'elles pouvaient être utilisée pour la colocalisation en IRM et en imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge de ganglions lymphatiques chez la souris.



## Chapitre II

# Quantum dots I-III-VI et croissance de coque épaisse de zinc

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les quantum dots sont des sondes particulièrement intéressantes pour l'imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge. Pour limiter la toxicité liée au relargage des ions qui constituent les nanoparticules,[150, 151] l'équipe a précédemment développé des quantum dots à base de chalcogénure de cuivre-indium qui ont montré une toxicité plus faible que ceux à base de tellure de cadmium.[1, 2, 152] Dans ce chapitre, nous présenterons les propriétés structurales et opto-électroniques des quantum dots I-III-VI. Après avoir présenté la synthèse des cœurs, nous montrerons la technique retenue pour la croissance de coques épaisses de ZnS développée dans le but de pouvoir ensuite incorporer un maximum d'ions  $Mn^{2+}$ .

### II.1 Propriétés des QDs $CuIn(S,Se)$

Les nanoparticules à base de matériau I-III-VI présentent une émission modulable sur une large gamme spectrale et permettent notamment d'obtenir des sondes pour l'imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge qui ne contiennent pas d'éléments fortement toxiques.

#### II.1.1 Propriétés structurales

Les chalcogénures de cuivre et d'indium existent sous trois formes cristallines qui sont présentés sur la figure II.1 : la structure chalcopyrite (quadratique), sphalérite (cubique)

et würtzite (hexagonale). Dans les trois cas, quatre cations forment un tétraèdre autour d'une atome de soufre, c'est la façon dont se font les enchainements de plans contenant les cations qui vont déterminer si nous avons une structure quadratique/cubique (ABC) ou hexagonale (ABAB).

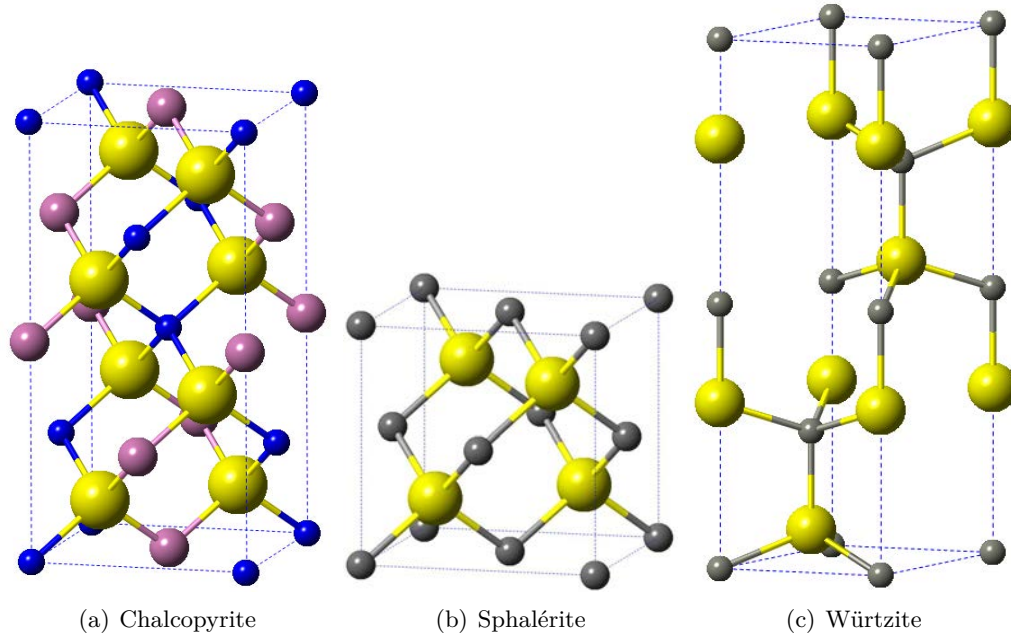


FIGURE II.1 – Schéma des structures cristallines existante pour les chalcogénures. En jaune, les anions ( $S^{2-}$  ou  $Se^{2-}$ ). Les cations sont représentés en gris pour les structures wurtzite et sphalérite et en rose ( $In^{3+}$ ) et bleu ( $Cu^+$ ) dans le cas de la chalcopyrite.

Dans la structure chalcopyrite, les cations  $In^{3+}$  (rose) et  $Cu^+$  (bleu) sont répartis de manière alternée. Dans le plan (001), on peut voir qu'un ion  $In^{3+}$  est entouré de 4 ions  $Cu^+$  et inversement. La structure sphalérite peut être vue comme étant dérivée de cette structure quadratique : si les cations  $In^{3+}$  et  $Cu^+$  sont répartis de manière aléatoire dans la structure, les anions sont entourés de quatre cations « moyen », c'est-à-dire qu'il y a en moyenne 2  $In^{3+}$  et 2  $Cu^+$  mais pas de façon ordonnée. Si on remplace tous les cations (rose et bleu) par un cation « moyen », on obtient deux mailles de la structure sphalérite. On a donc une transition ordre-désordre entre ces deux structures.

Le seul moyen pour différencier les deux structures est en diffraction des rayons X (DRX) mais est extrêmement difficile. En 2008, Allen et Bawendi ont montré que la seule différence entre les deux structures est un pic peu intense correspondant aux plans (211).[117] Ce plan n'existe pas pour la structure sphalérite mais apparait pour la

structure chalcopyrite et faiblement dans le cas où les lacunes sont organisées de manière ordonnée (FIG. II.2). Pour cette raison, il est extrêmement difficile de différencier les deux structures et par la suite, nous considérerons que la structure est cubique lorsque nous n'aurons pas une phase hexagonale.

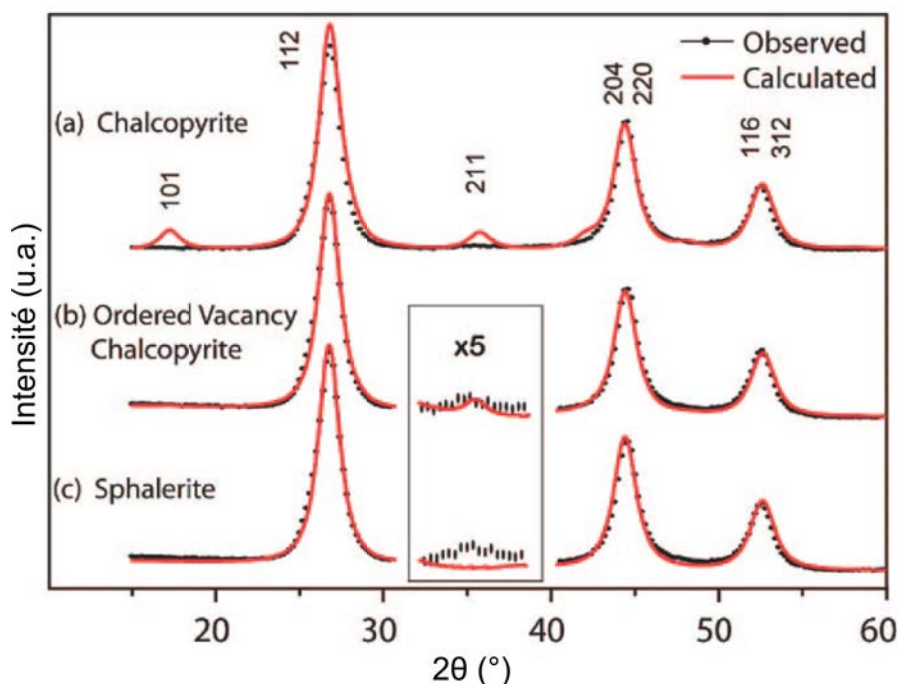


FIGURE II.2 – Diffractogrammes mesurés et calculés pour des nanoparticules de  $\text{CuInSe}_2$  : (a) pour une phase chalcopyrite ; (b) pour une phase chalcopyrite contenant des lacunes ordonnées ; (c) pour une structure sphalérite. Image tirée de la REF. [117].

### II.1.2 Propriétés optiques et applications

L'intérêt des matériaux de type  $\text{CuInE}_2$  réside dans le fait qu'elle possède des bandes interdites directes relativement petites pour les matériaux massifs en structure chalcopyrite<sup>1</sup> : 1,53 eV pour le  $\text{CuInS}_2$  et 1,04 eV pour le  $\text{CuInSe}_2$ . Ces bandes interdites permettent d'obtenir des spectres d'absorption qui couvrent tout la gamme du visible. Dans les années 70, les premières applications de ces matériaux ont concerné le développement de cellules photovoltaïques sous forme de couches minces.[154, 155] Ce domaine d'application est toujours en développement. Avec l'apparition des synthèses de nanoparticules, les méthodes de dépôts de films ou couches minces ont été simplifiées puisqu'on peut

1. La largeur de la bande interdite dépend de la structure cristalline mais des valeurs proches ont été trouvées pour la structure wurtzite[153]

maintenant utiliser les techniques de dépôts de solution (spin- ou dip-coating), ce qui permet de traiter de plus grandes surfaces et ainsi de diminuer les coûts.[156]

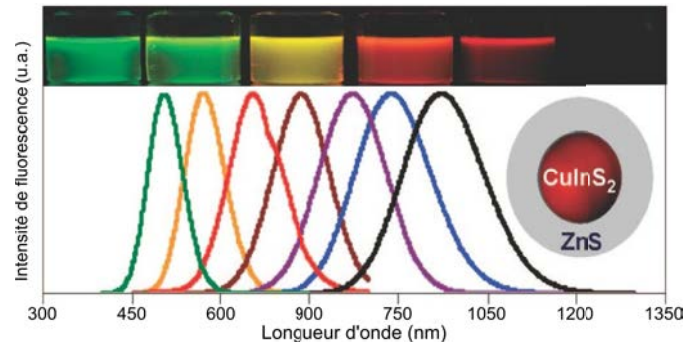


FIGURE II.3 – Spectres d’émission de fluorescence pour différents lots de quantum dots cœur/coques  $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$  et quelques échantillons correspondants. Image tirée de la REF. [157].

La photoluminescence des quantum dots I-III-VI est complexe à cause de la présence de défaut dans la structure cristalline, notamment à cause d’écart à la stœchiométrie.[158] Comme pour les quantum dots II-VI, il existe une émission excitonique qui correspond à une transition entre les bords des bandes de valence et de conduction. Malheureusement, cette transition est difficilement observable à température ambiante pour les nanoparticules présentant des défauts.[159] Pour les matériaux, il existe également des transitions entre les bords de bande (conduction ou valence) et des niveaux situés dans la bande interdite.[158, 160, 161] La formation de paires de défauts ( $2V_{\text{Cu}}^- + \text{In}_{\text{Cu}}^{2+}$ ) soit deux lacunes de cuivre et un  $\text{In}^{3+}$  substitué à un  $\text{Cu}^+$  pourrait créer des niveaux proche de la bande de valence qui conduirait au piégeage des trous.[158, 161, 162] Le recouvrement des fonctions d’ondes des trous et des électrons est alors plus faible, ce qui pourrait expliquer que les temps de vie de fluorescence des quantum dots I-III-VI sont plus longs, de l’ordre de quelques centaines de nanosecondes, que ceux à base de II-VI, de l’ordre de quelques dizaines de nanosecondes.[161]

Même si une étude du début des années 80 s’est intéressé à la fluorescence de ces matériaux,[159, 160] les propriétés d’émission particulières de ces objets n’ont pas été beaucoup étudié avant les années 2000. La synthèse de nanoparticules a permis d’obtenir des longueurs d’onde d’émission couvrant une large gamme spectrale allant du vert au proche infra-rouge (FIG. II.3).[157, 163, 164] Le développement de synthèses qui permettent d’obtenir des particules possédant un rendement quantique élevé a permis la diversification des applications de ces matériaux. Outre les utilisations comme marqueurs pour l’imagerie de fluorescence, ces nanoparticules ont pu être utilisées pour

la fabrication de diodes électro-luminescentes[165, 166] ou encore le développement de photodétecteurs.[167]

## II.2 Synthèse des cœurs I-III-VI

La synthèse de nanocristaux de  $\text{CuInS}_2$  peut se faire de différentes façons : décomposition d'un composé contenant les trois éléments,[115, 158, 168, 169] des réactions en autoclave, [170–172] ou encore par injection à haute température.[173] Malheureusement, ces synthèses ne permettent pas de bien contrôler la taille des objets et aboutissent le plus souvent à de grands objets (de l'ordre de la dizaine de nanomètre)<sup>1</sup> et donc une émission réduite. Les synthèses solvothermales, basées sur la décomposition d'un mélange de précurseurs métalliques, d'un précurseur de chalcogène et de ligands, permettent d'obtenir un meilleur contrôle de la taille des nanoparticules et donc d'obtenir des objets de petite taille avec des rendements quantiques élevés. En 2008, Zhong *et al* proposent d'utiliser un mélange d'acétate de cuivre (I), d'acétate d'indium et de dodécane-thiol (qui servira de précurseur de soufre et de ligands) dans de l'ODE pour obtenir des nanoparticules de  $\text{CuInS}_2$ . Cette synthèse sera ensuite reprise et adaptée par plusieurs équipes.[1, 157, 161, 174]

Comme pour les synthèses de nanoparticules à base de soufre, la synthèse de nanoparticules de  $\text{CuInSe}_2$  a d'abord été réalisée pour des applications dans le domaine photovoltaïque.[156, 175] Là encore les objets obtenus étaient trop grands pour présenter un rendement quantique d'émission suffisamment élevé. En 2008, Allen et Bawendi propose une synthèse basée sur la décomposition de séléniure de bis(triméthylsilyl) en présence d'halogénure de cuivre et d'indium et de trioctylphosphine.[117] Cette synthèse permet d'obtenir des objets de tailles contrôlées avec des rendements quantiques élevés, jusqu'à 25 % et qui diminue lorsque la taille augmente. Malheureusement, ce précurseur de sélénium est dangereux et cher.

Au laboratoire, Thomas Pons, Elsa Cassette *et al.* ont développé des synthèses permettant d'obtenir des nanoparticules de  $\text{CuInS}_2$ [1] et  $\text{CuInSe}_2$ . [2] L'introduction de zinc dans la synthèse permet d'augmenter le rendement quantique des quantum dots I-III-VI[114] et c'est pourquoi nous avons décidé d'incorporer du zinc dans nos cœurs. Cependant, l'incorporation de zinc conduit également à une augmentation de la bande interdite et donc un déplacement hypsochrome de l'émission.[176] Par souci de simplifi-

---

1. Pour pouvoir observer les effets du confinement quantique, il faut que la taille de l'objet soit plus grande que le rayon de Bohr des porteurs de charges qui est de l'ordre de 4 nm pour le  $\text{CuInS}_2$

cation, et comme la stœchiométrie de ces composés est complexe, nous noterons par la suite Zn-Cu-In-S et Zn-Cu-In-Se les matériaux que nous utilisons pour nos cœurs.

### II.2.1 Synthèse des cœurs Zn-Cu-In-S

Pour la synthèse des nanoparticules de Zn-Cu-In-S, nous avons adapté la synthèse solvothermale développée par Li *et al.* (voir Annexe A, page 94 pour le détail des synthèses).[174] De l'iodure de cuivre, de l'acétate d'indium, de l'acétate de zinc et du dodécane-thiol (DDT) sont mélangés avec des rapports molaires (1:1:0,1:21). Le mélange est d'abord chauffé à 120°C, pour solubiliser les différents précurseurs métalliques sous forme de complexe de dodécane-thiolate,[177] puis à 220°C pendant environ 15 minutes pour obtenir des nanocristaux émettant autour de 800 nm (FIG. II.4). L'introduction de zinc qui permet d'obtenir des sondes plus brillantes avec des rendements de l'ordre de 30 % mais ne permet pas d'obtenir des nanoparticules émettant au-delà de 800 nm : il faut alors synthétiser des nanoparticules plus grosses qui ne sont plus stables en solution.

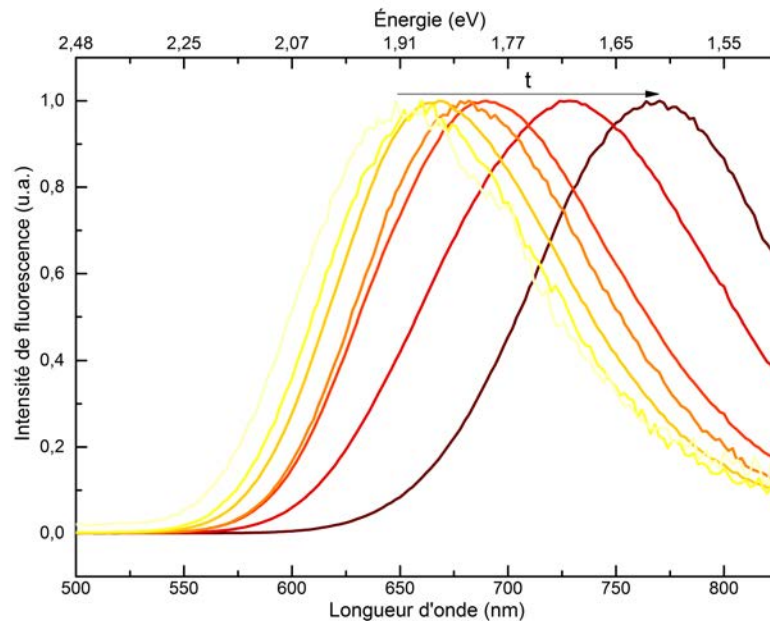


FIGURE II.4 – Évolution du spectre d'émission au cours de la synthèse de cœurs Zn-Cu-In-S

Le diffractogramme de ces objets montre que nous obtenons des objets cristallisés avec une structure chalcopyrite (FIG. II.5). La formule de Scherrer relie la taille des

cristallites à la largeur et la position des pics de diffraction selon :

$$d = \frac{K \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos\theta}, \quad (\text{II.1})$$

où  $K$  est un facteur qui dépend de la forme des cristaux<sup>1</sup>,  $\lambda$  est la longueur d'onde du faisceau incident (dans notre cas, 1,054056 Å pour la raie  $K_{\alpha}$  du cuivre), FWHM la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction et  $\theta$  l'angle de diffraction. L'application de cette formule permet d'obtenir la taille de nos nanoparticules et nous obtenons typiquement des tailles de l'ordre de 3 nm. Cette taille n'a pas pu être confirmée par des images nettes en microscopie électronique en transmission car les objets sont trop petits et/ou par manque de contraste.

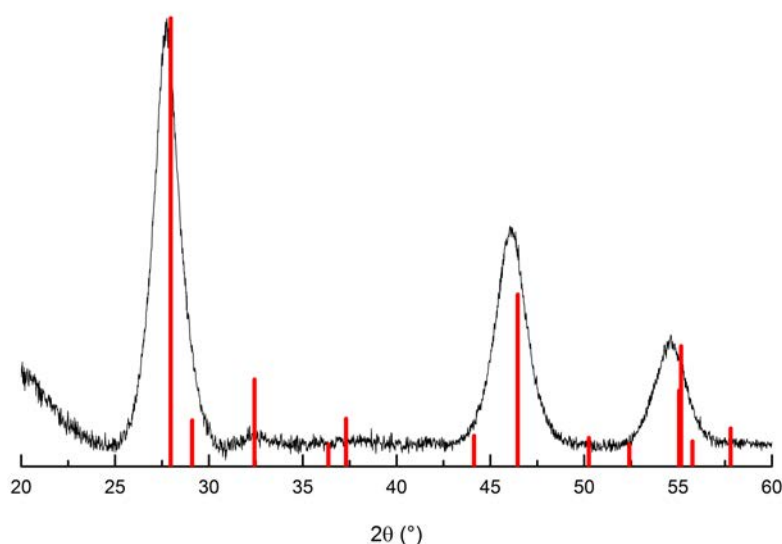


FIGURE II.5 – Diffractogramme de cœurs Zn-Cu-In-S. En rouge, le diffractogramme de référence pour  $\text{CuInS}_2$  en structure chalcopyrite (JCPDS 01-075-0106).

L'analyse élémentaire par analyse dispersive en énergie (EDX) et par ICP-AES a permis de déterminer la stoechiométrie de nos objets et nous avons obtenu une composition Zn:Cu:In:S (0,2:1:1:3). L'excès de soufre provient du fait qu'une partie du signal provient du dodécane-thiol présent comme ligand en surface des quantum dots. La concentration

1. En première approximation, nous avons utilisé une valeur de 0,9 qui correspond à des cristallites sphériques.

est évaluée à partir de la concentration en ions déterminée par ICP-AES et de la taille des objets et on obtient des concentrations de l'ordre de 60  $\mu\text{M}$ .

### II.2.2 Synthèse des cœurs Zn-Cu-In-Se

La synthèse des nanoparticules de  $\text{CuInSe}_2$  se base sur la synthèse développée par Koo *et al.*[175] Leur synthèse repose sur un mélange de chlorures d'indium et de cuivre dans l'oléylamine (OAm) qui réagissait avec un précurseur de sélénium, la sélénourée, à 240°C. L'ajout d'autres ligands dans la synthèse, de la trioctylphosphine (TOP) et DDT, ont permis d'obtenir des objets plus petits que ceux synthétisés par Koo *et al.* Nous avons là encore choisi d'incorporer du zinc dans ces cœurs pour augmenter le rendement quantique. Nous avons ainsi trouver qu'un mélange Zn:Cu:In:Se (2:1:1:2) nous permettait d'obtenir les objets les plus brillants avec des rendements quantiques de l'ordre de 20 %. On peut ainsi obtenir des longueurs d'onde d'émission comprises entre 680 et 820 nm (FIG. II.6).

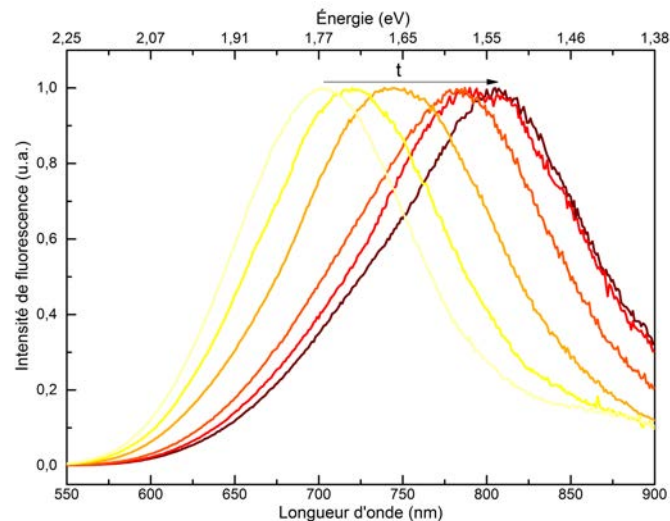


FIGURE II.6 – Évolution du spectre d'émission au cours de la synthèse de cœurs Zn-Cu-In-Se

Comme pour les cœurs à base de soufre, nous obtenons une structure chalcopyrite/sphalérite et l'application de la formule de Scherrer nous donne également des objets d'environ 3 nm de diamètre. Là encore, les tailles et le faible contraste ne permettent pas d'obtenir d'images de MET satisfaisantes. On obtient une composition Zn:Cu:In:Se (10:4:1:4) et des concentrations de l'ordre de 60  $\mu\text{M}$ .

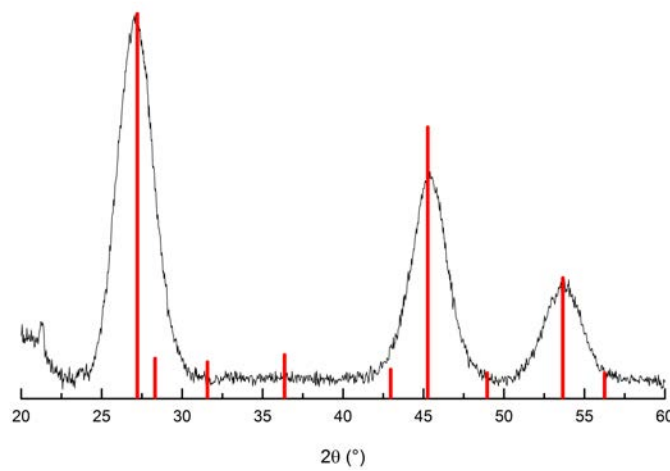


FIGURE II.7 – Diffractogramme de cœurs Zn-Cu-In-Se. En rouge, le diffractogramme de référence pour  $\text{CuInSe}_2$  en structure chalcopirite (JCPDS 00-036-1311).

## II.3 Croissance d'une coque de ZnS

La croissance d'une coque permet de passiver les liaisons pendantes présentes en surface des quantum dots qui peuvent agir comme des pièges pour les charges et ainsi diminuer le rendement quantique de nos objets.

### II.3.1 Les différents types d'hétérostructure

Lors de la fabrication d'hétérostructure, on peut obtenir trois types d'alignement de bandes (FIG. II.8) :

Type I : les deux charges sont confinées dans le cœur, comme c'est le cas pour les hétérostructures  $\text{CdSe/ZnS}$  ou  $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$  ;

Quasi type II : l'une des charges est confinée dans le cœur tandis que l'autre est délocalisée dans toute la structure (sur notre schéma, le trou est confiné dans le cœur tandis que l'électron est délocalisé dans toute la structure). C'est le type d'alignement présenté par le système  $\text{CdSe/CdS}$  ; [178]

Type II : les deux charges sont séparées, l'une est confinée dans le cœur (le trou sur notre schéma) et l'autre est confinée dans la coque (l'électron sur notre schéma). On retrouve cet alignement de bandes pour le système  $\text{CdTe/CdSe}$ . [179]

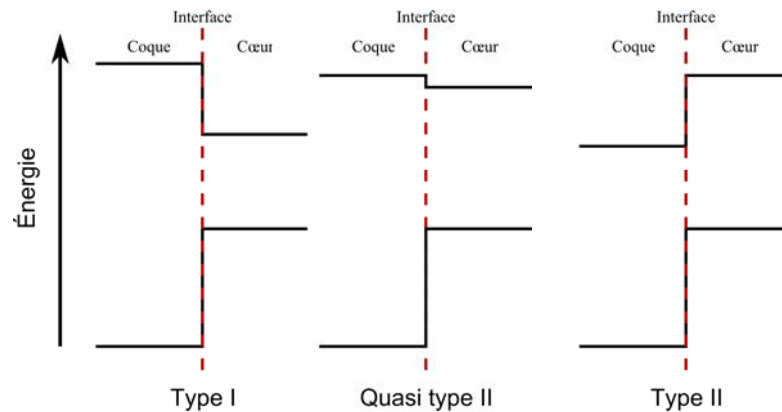


FIGURE II.8 – Schéma des différents alignements de bandes existants.

### II.3.2 Choix du matériau de la coque

La croissance d'une coque autour des nanoparticules de Zn-Cu-In-(S,Se) permet de passiver les liaisons pendantes présentes en surface des quantum dots qui agissent comme des pièges pour les charges et permettent les recombinaisons non-radiatives, diminuant ainsi le rendement quantique de fluorescence.[161] D'autre part, en choisissant un matériau pour la coque avec une bande interdite plus large et qui permette d'obtenir une hétérostructure de type I, la croissance d'une coque permet également d'améliorer le confinement de l'électron dans le cœur de Zn-Cu-In-(S,Se). Dans notre cas, comme nous visons des applications en imagerie, il faut également que la coque soit constituée d'un matériau biocompatible, ce qui élimine le sulfure de cadmium qui a été utilisé pour des applications photovoltaïques.[180, 181]

Pour ces raisons, le sulfure de zinc s'est avéré être un candidat idéal :

- il présente des structures cristallines sphalérite et wurtzite. Dans le cas de la sphalérite (qui est la structure cristalline de nos cœurs), le paramètre de maille du ZnS (5,41 nm) est proche de ceux de CuInS<sub>2</sub> (5,52 nm, soit un désaccord d'environ 2 %) et CuInSe<sub>2</sub> (5,78 nm, soit un désaccord d'environ 6 %). Ces différences permettent *a priori* de faire croître des coques sans avoir des contraintes trop fortes sur les cœurs et devrait donc permettre la croissance épitaxiée de coques épaisses sans créer de défauts ;
- sa bande interdite de 3,54 eV pour la structure sphalérite donne un alignement de type I avec les deux types de cœurs (FIG. II.9) ;[182]
- ZnS est un matériau biocompatible avec une toxicité limitée[183] et qui permet la réalisation d'échange de ligands pour obtenir des sondes hydrosolubles.[183, 184]

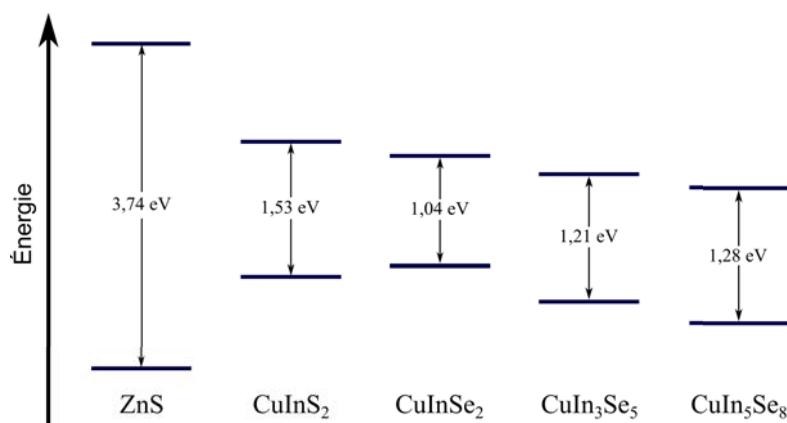


FIGURE II.9 – Alignement de bandes des matériaux massifs ZnS, CuInS<sub>2</sub>, CuInSe<sub>2</sub> et CuIn<sub>5</sub>Se<sub>8</sub> en structure sphalérite[185]

### II.3.3 Méthodes existantes pour la croissance de coques de ZnS

Une fois le matériau choisi, il nous a fallu choisir la méthode pour la croissance de la coque de ZnS. Plusieurs critères ont été pris en compte lors du choix de la méthode de synthèse. Premièrement et comme pour les autres synthèses que nous avons développées, nous avons choisi de limiter l'emploi de matériaux toxiques et/ou dangereux à l'utilisation. Il a fallu également trouver une méthode qui ne nécessite pas une température de chauffage élevée qui peut poser problème avec les cœurs que nous avons synthétisés. Premièrement, une température élevée peut favoriser le mûrissement d'Ostwald et augmenter la dispersion en taille des particules. Deuxièmement, avec les matériaux I-III-VI, comme nous l'avons montré dans la partie précédente, le zinc peut prendre la place du cuivre et ce phénomène sera favorisé à température élevée et si trop de zinc est incorporé, l'émission ne se fera plus dans la gamme spectrale d'intérêt.

Il existe plusieurs types de synthèses pour la croissance de coques de ZnS sur des nanoparticules. La déposition successive de couches de cations et d'anions (SILAR, pour *Successive Ionic Layer Adsorption and Reaction* en anglais), qui a d'abord permis la croissance de CdS sur CdSe[186, 187] avant d'être utilisée pour la croissance de ZnS,[93] permet d'obtenir un très bon contrôle sur la taille des objets ainsi que sur la position du manganèse qui peut être inclus.[188] Cependant, cette technique pose deux problèmes : la nécessité de connaître précisément la concentration en nanoparticules pour pouvoir ajuster les quantités de précurseurs à ajouter et la température . Cette précision est aisée à obtenir pour les quantum dots à base de cadmium pour lesquels il existe une relation entre la concentration et la position du pic d'émission.[189, 190] Elle est en

revanche beaucoup plus compliqué à obtenir, malgré quelques tentatives,[191, 192] pour les matériaux I-III-VI pour lesquels la position du pic d'émission est liée non seulement à la taille des particules mais également à leur composition

Il existe également des méthodes d'injection de précurseurs de soufre et de zinc dans une solution contenant les cœurs. Les premières croissances de coques de ZnS nécessitaient l'utilisation de précurseurs particulièrement toxiques et dangereux. Ainsi Hines et Guyot-Sionnest proposent en 1996 l'injection de solutions de diméthylzinc (extrêmement pyrophoriques) et de sulfure de bis(triméthylsilyl)  $((\text{TMS})_2\text{S}$ , toxique) dissous dans de la TOP.[193] L'année suivante, Dabbousi *et al.* remplacent le diméthylzinc par le diéthylzinc, certes plus stable mais toujours très pyrophorique.[194] Outre leur dangerosité, le fait que ces composés soient très réactif ne permet de contrôler la croissance de la coque de manière satisfaisante. En 2005, Jun et Jang injectent une solution contenant de l'acétate de zinc dans de la trioctylamine et une autre contenant de l'octanethiol pour faire croître une coque de ZnS sur des quantum dots CdSe.[195] La même équipe propose l'année suivante l'utilisation de soufre dissout dans de la TOP (TOPS) pour faire croître des coques de CdS et ZnS.[196] Du fait de la faible réactivité de ce précurseur de soufre, l'injection se fait à 300°C. Afin de limiter les problèmes liés aux hautes températures d'injection, Protière et Reiss proposent d'utiliser l'éthylxanthate de zinc à la fois comme précurseur de zinc et de soufre pour la croissance de coques de ZnS sur des cœurs de CdS.[197] Pour combler le déficit de zinc (il y a deux éthylxanthates par zinc et chaque éthylxanthate peut apporter deux sulfures), ils ajoutent 3 équivalents de stéarate de zinc. La bonne réactivité de l'éthylxanthate de zinc leur permet d'abaisser la température d'injection à 225°C.

Enfin, plus récemment des techniques ont été proposées pour la croissance de coque à température ambiante. Par exemple, Benoit Mahler, Brice Nadal *et al.* ont développé une méthode pour la croissance de coques de CdS et CdZnS sur des nanoplaquettes de CdSe.[198] Cette méthode utilise un mélange d'oléate de cadmium et zinc, de thioacétamide et d'octylamine qui est ajouté à une solution contenant les nanoparticules de cœurs. Une autre méthode développée par Ithurria et Talapin permet de déposer des coques de ZnS dopées en  $\text{Mn}^{2+}$  sur des plaquettes de CdS en déposant successivement des couches de soufre (avec  $\text{Na}_2\text{S}$ ) et de cations (avec  $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ ) dans un mélange biphasique.[199]

## II.4 Méthodes employées pour la croissance de ZnS sur des cœurs I-III-VI

Les méthodes pour faire croître une coque de ZnS sur les matériaux I-III-VI reposent pour partie sur les synthèses développées pour les matériaux II-VI. Ainsi, Li *et al.* ont adapté la méthode utilisant un mélange de zinc stéarate/zinc éthylxanthate pour la croissance de coque sur des cœurs de  $\text{CuInS}_2$ . [174] Cette méthode a été adaptée au laboratoire et permet d'obtenir des coques fines sur des quantum dots  $\text{CuInS}_2$  [1] (en remplaçant l'éthylxanthate de zinc par du *bis*(N-hexyldithiocarbamate) de zinc à la place de l'éthylxanthate) et  $\text{CuInSe}_2$ . [2] Une autre méthode consiste à utiliser une adaptation de la méthode développée par Jun et Jang : un mélange TOPS/stéarate de zinc est injecté à 210°C dans une solution contenant des cœurs  $\text{CuInS}_2$ . [161]

D'autres méthodes plus spécifiques aux matériaux I-III-VI ont été publiées et notamment pour les nanoparticules à base de soufre. En effet, les synthèses utilisant le dodécane-thiol contiennent un excès de précurseur de soufre. Ainsi, Zhang *et al.* utilisent cet excès de DDT comme précurseur et ajoutent de l'oléate de zinc ( $\text{Zn(OA)}_2$ ) en plusieurs fois pour faire croître une coque de ZnS sur des cœurs de Zn-Cu-In-S. [200] Nous avons vu un peu plus haut que le zinc pouvait substituer le cuivre et l'indium. [201] Park et Kim ont donc proposé d'utiliser cette propriété pour obtenir des quantum dots  $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$  en échangeant une partie des cations  $\text{Cu}^+$  et  $\text{In}^{3+}$  par des ions  $\text{Zn}^{2+}$ . [202] Cette technique nécessitera donc d'obtenir des cœurs de grosses tailles et fluorescents afin d'obtenir des sondes émettant dans le proche infra-rouge, ce qui n'est pas aisé avec nos matériaux.

Les méthodes précédemment décrites ne permettent de faire pousser que quelques monocouches de ZnS (0,3 nm par monocouche [203]). Pour nos applications, nous avons besoin d'une coque épaisse de 2 à 3 nm d'épaisseur, soit 7 à 10 monocouches, ce qui n'a pas encore été rapporté sur des matériaux I-III-VI.

## II.5 Croissance de coques épaisses de ZnS

Nous avons donc essayé d'utiliser des mélanges précédemment utilisés pour la croissance de coques fines et d'adapter les quantités et vitesses d'injection afin d'obtenir des coques épaisses.

### II.5.1 Synthèses testées

Nous avons utilisé des méthodes permettant de travailler avec une température maximale de 220°C afin de limiter l'échange de cations par le ZnS et la nucléation secondaire.<sup>1</sup> Pour chaque synthèse, nous avons utilisé l'oléate de zinc comme précurseur de zinc et nous avons étudié différents précurseurs de soufre : soufre dissout dans la TOP (TOPS, 210°C), dodécane-thiol (DDT, 220°C), éthylxanthate de zinc (Zn-ETX, 200°C) et la thioacétamide (TAA). Afin de limiter la nucléation secondaire et notamment dans les solutions d'injections, nous utilisons deux seringues différentes : une contenant le précurseur de zinc et une autre contenant le précurseur de soufre. Pour chaque synthèse, nous avons introduit des quantités de précurseurs correspondant à la croissance d'une coque d'environ 3 nm (l'incertitude provient de la difficulté à accéder à la distribution en taille et à la concentration en particules). Dans le cas de la thioacétamide et après des essais peu concluants à température ambiante en croissance continue, nous avons utilisé une injection de TAA et d'oléate de zinc à 100°C. Pour les trois autres précurseurs, nous avons utilisé des températures d'injection supérieures à 200°C : 200°C pour l'éthylxanthate, 210°C pour la TOPS et 220°C pour le DDT.

### II.5.2 Comparaison des précurseurs de soufre

Comme pour les cœurs, lorsque les coques sont fines, il est difficile de voir les nanoparticules en microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons utilisé des mesures d'absorbance dans l'UV-visible afin de mettre en évidence la présence de ZnS dans les solutions de quantum dots : la présence de sulfure de zinc est caractérisé par une absorbance en-dessous de 350 nm, ce qui correspond à la bande interdite du ZnS.

La figure II.10 présente les spectres d'absorbance normalisée à 500 nm ainsi que pour des cœurs. À cette longueur d'onde, seuls les cœurs absorbent car le ZnS possède une bande interdite de 3,54 eV (soit 350 nm). Ainsi, en normalisant les spectres d'absorbance à 500 nm, on s'affranchit des différences de concentration entre les différents échantillons. On observe que pour les synthèses utilisant la TOPS et le DDT, il n'y a que peu de différences entre les spectres des cœurs et ceux des cœur/coques, ce qui indique la croissance d'une couche fine ou l'absence de croissance de ZnS. Dans le cas de la TAA, l'écart entre la courbe des cœurs et celle obtenus après injection de TAA et Zn(OA)<sub>2</sub> indique la présence de ZnS dans notre solution. L'utilisation d'éthylxanthate de zinc a permis d'obtenir encore davantage de ZnS dans la solution et nous avons donc décidé de

---

1. La nucléation secondaire correspond à la nucléation homogène de nanoparticules de ZnS.

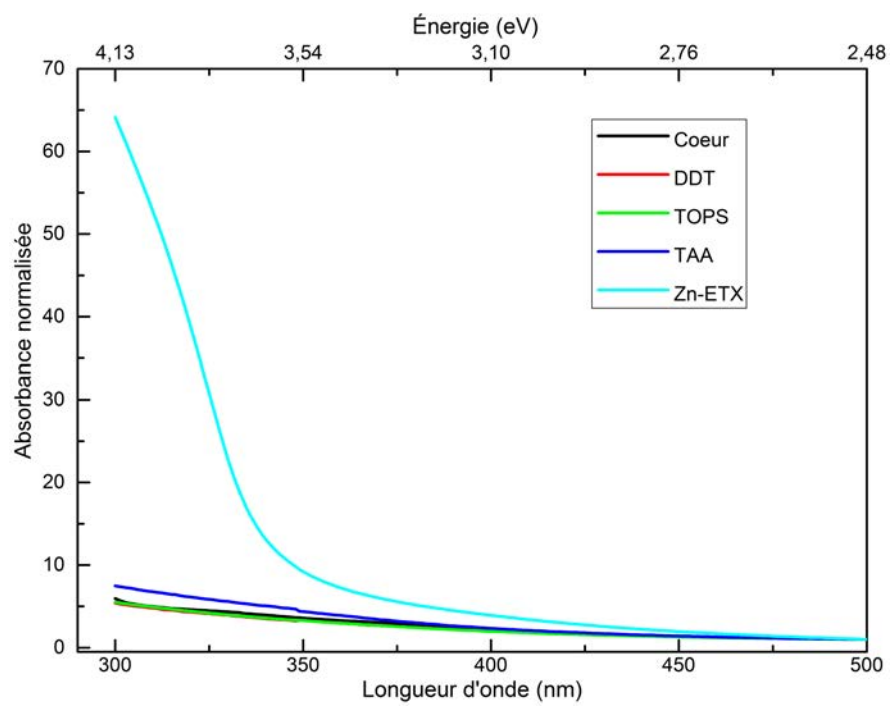


FIGURE II.10 – Spectre d'absorbance normalisée pour des cœurs et différents précurseurs de zinc

poursuivre avec ce précurseur. Cependant, il reste à vérifier que le ZnS est bien déposé sur nos cœurs et ne nucléé pas de manière homogène.

### II.5.3 Synthèse avec éthylxanthate de zinc

Pour cette synthèse, nous utilisons deux seringues séparées, une pour le précurseur de zinc et une pour le précurseur de soufre/zinc, afin de limiter la nucléation secondaire. La première contient de l'oléate de zinc dissout dans un mélange octadécène (ODE)/oléylamine (OAm) 80:20 (v:v) car l'oléate de zinc ne se dissout pas convenablement dans l'ODE seul. La seconde contient de l'éthylxanthate de zinc dissout dans un mélange ODE/OAm 70:30 (v:v).

Afin de vérifier la croissance de coques et l'absence de nucléation secondaire de ZnS, nous avons mis en œuvre différentes techniques. La première consiste à comparer les spectres d'excitation (PLE) aux spectres d'absorption pour mettre en évidence la croissance d'une coque et permet d'évaluer la nucléation secondaire en mesurant l'aire entre la courbe d'excitation et celle d'absorbance (voir l'annexe B pour plus de détails). Les courbes de PLE et d'absorbance normalisées à 500 nm pour les nanoparticules cœur/coques sont présentées sur la figure II.11 et sont comparées à l'absorbance des cœurs. Comme pour l'absorbance, on observe une large augmentation de la PLE en-dessous de 350 nm indiquant bien la formation d'une coque de ZnS sur les cœurs. La mesure de la différence d'aire entre les courbes d'absorbance et de PLE nous donne environ 7 % de l'aire entre les courbes d'absorbance des cœurs et celle des cœur/coques, ce qui indique une nucléation secondaire limitée. On peut également observer sur cette figure que la longueur d'onde d'émission ne varie que d'environ une dizaine de nanomètres lors de la croissance de la coque, ce qui nous permet de garder une émission dans la gamme spectrale d'intérêt. Avec cette méthode, nous obtenons des rendements quantiques de l'ordre de 50-60 %.

Le diffractogramme des nanoparticules cœur/coques obtenues permet de déterminer leur structure et leur taille. La figure II.12 présente les diffractogrammes de nanoparticules Zn-Cu-In-S (noir) et Zn-Cu-In-S/ZnS (rouge) et les pics de référence pour le ZnS en structure sphalérite (vert). On peut observer une très bonne concordance entre le diffractogramme de référence et celui des cœur/coques qui indique qu'il y a bien eu croissance de ZnS dans notre synthèse et l'absence de pics correspondant au Zn-Cu-In-S permet de confirmer le caractère épitaxiée de cette croissance. On peut de plus observer une réduction de la largeur des pics de diffraction, caractéristique de l'accroissement des cristallites dans notre solution. Enfin, la formule de Scherrer nous permet encore de déterminer la taille moyenne de nos objets et dans notre cas, nous trouvons  $7 \pm 1$  nm, ce

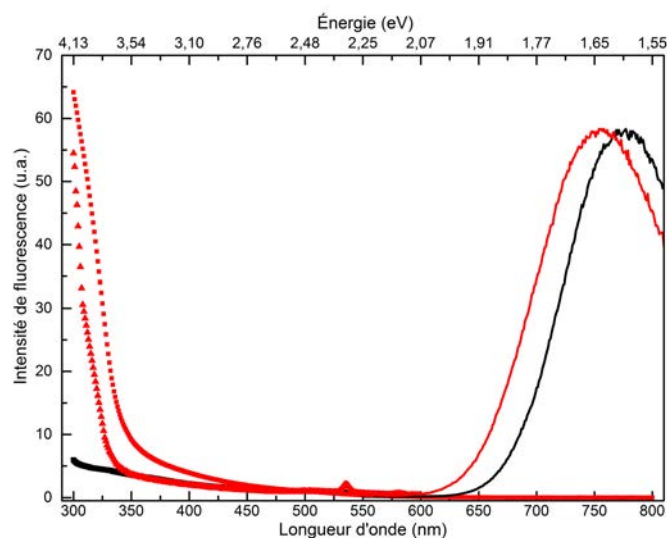


FIGURE II.11 – Comparaison des spectres d'émission (traits continus), d'absorbance (triangle) et PLE (carré) pour les cœurs (noir) et les cœur/coques

qui indiquerait la croissance d'une dizaine de couches de ZnS, comme attendu. Malheureusement, cette technique ne nous permet pas de distinguer les nanoparticules issues de la nucléation secondaire et les cœur/coques.

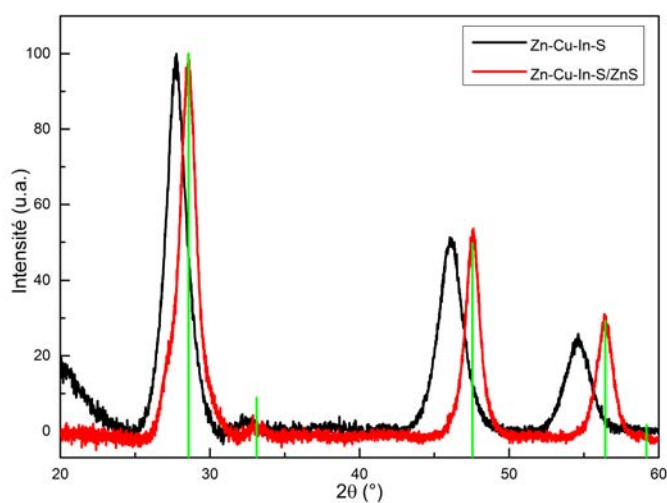


FIGURE II.12 – Comparaison des diffractogrammes pour des cœurs Zn-Cu-In-S (noir) et des cœur/coques Zn-Cu-In-S/ZnS (rouge). Diffractogramme de référence pour ZnS en structure cubique (JCPDS 03-065-5476, en vert).

Pour nous permettre de différencier ces deux populations, nous avons étudié nos nanoparticules par MET (FIG. II.13). Sur ces images, on peut voir une population relative-

ment homogène et la distribution en taille déterminée sur une centaine de nanoparticules (FIG. II.13(b)) nous donne une taille moyenne de  $8\pm 3$  nm. Les images à haute résolution (FIG. II.13(c)) permettent d'observer les plans atomiques et on observe peu de défauts de croissance. La structure cristalline peut être déterminée en effectuant une transformée de Fourier rapide (FFT) pour chaque nanoparticule. La figure II.13(d) correspond à la FFT de la particule encadrée en rouge et la figure de diffraction ainsi obtenue est compatible avec la structure sphalérite du ZnS et confirme les résultats obtenus par DRX.

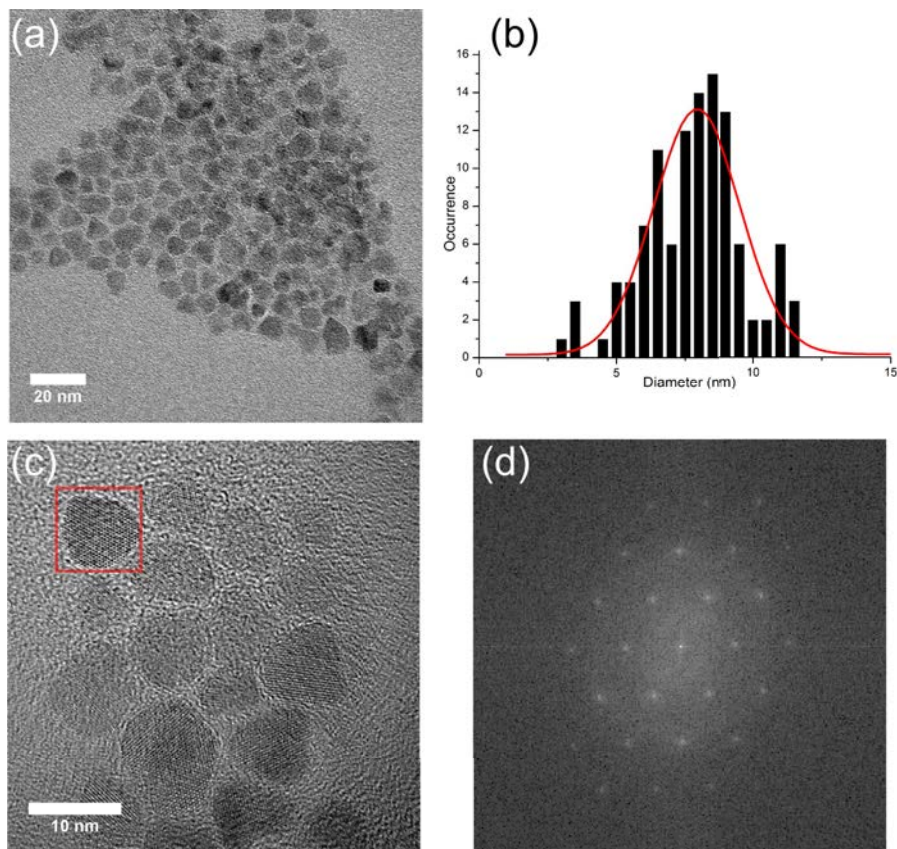


FIGURE II.13 – Images de MET de particules Zn-Cu-In-S/ZnS. Les images à faible grandissement (a) permettent d'évaluer la distribution en taille sur un grand nombre de particules (b) :  $8\pm 3$  nm. Les images à fort grandissement (c) permettent de voir les différents plans atomiques dans les nanoparticules et une transformée de Fourier rapide (FFT) permet d'obtenir la figure de diffraction (d) de la particule encadrée en rouge.

## Conclusion du chapitre

Les nanoparticules de matériaux I-III-VI possèdent une structure complexe et très sensible à la stœchiométrie. Elles possèdent des propriétés optiques et électroniques particulièrement intéressantes avec notamment une émission modulable sur une large gamme spectrale en jouant sur leur taille et leur composition. L'incorporation de zinc dans ces particules permet non seulement d'étendre la gamme spectrale sur laquelle elles émettent mais également d'augmenter leur rendement quantique. La passivation de ces nanoparticules par une coque de ZnS, dont le paramètre de maille est proche de ceux des I-III-VI, permet d'augmenter encore la brillance de ces nanoparticules en les éloignant des pièges de surfaces.

En nous basant sur les travaux précédemment réalisés au laboratoire, nous avons développé une synthèse nous permettant d'obtenir des coques de ZnS de quelques nanomètres d'épaisseur. Les études spectroscopiques couplées à la DRX et à la microscopie électronique ont permis de confirmer la croissance épitaxiale de cette coque sur nos nanoparticules. Nous allons maintenant montrer comment nous avons réussi à adapter cette synthèse afin de pouvoir incorporer un grand nombre d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  dans nos structures et ainsi d'obtenir des sondes bimodales.



## Chapitre III

# Croissance d'un alliage ZnMnS

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, pour obtenir des agents de contraste qui raccourcissent le temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ), il est nécessaire d'avoir des objets paramagnétiques. L'une des stratégies utilisée par plusieurs groupes est d'incorporer des ions  $Mn^{2+}$  dans une matrice de sulfure de zinc. En effet, cet ion possède cinq électrons non appariés et un rayon ionique (67 pm) proche de celui du  $Zn^{2+}$  (74 pm). Les études sur les alliages massifs ont montré qu'il était possible d'obtenir des taux d'incorporation du manganèse jusqu'à 7,5 % en maintenant la structure zinc blende du sulfure de zinc.[204] Gaceur *et al*[41] ont ainsi synthétisé des nanoparticules de  $Zn_{0,9}Mn_{0,1}S$ , d'environ 1,5nm de diamètre, qui possèdent une relaxivité particulièrement élevée (de l'ordre de  $20mM^{-1}(Mn).s^{-1}$  à  $3T^1$ ) et qui peuvent également être utilisées pour l'imagerie de fluorescence, via l'émission bleue du ZnS. D'autres équipes ont développé des sondes bimodales en faisant croître des coques de  $Zn_{1-x}Mn_xS$  sur des quantum dots de CdSe[128] ou de CdTe[205].

### III.1 Choix du précurseur de manganèse

Afin d'obtenir des coques épaisses contenant un alliage de sulfure de zinc et de manganèse, nous avons adapté la synthèse décrite dans la section II.3. Pour ne pas avoir à trop modifier cette synthèse et puisque l'éthylxanthate de zinc sert à la fois de précurseurs de zinc et de soufre, nous avons choisi de remplacer une partie de l'oléate de zinc seulement par un précurseur de manganèse. Dans cette partie, nous détaillerons la méthode utilisée pour déterminer le précurseur de manganèse le plus adapté.

---

1. À titre de comparaison, le Teslascan<sup>TM</sup> a une relaxivité de l'ordre de  $1,6 mM^{-1}(Mn).s^{-1}$  à  $0.5 T$ [32]

TABLE III.1 – Tableau récapitulatif des synthèses proposées pour  $\text{Mn(OA)}_2$ 

| Année | Précurseurs <sup>1</sup> et Méthode  | Résultats attendus   | Résultats obtenus          | Refs      |
|-------|--|--|----------------------------|-----------|
| 2007  | $\text{Mn(OAc)}_2$ (ou $\text{MnCl}_2$ ) + 2 NaOA dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}/\text{hexane}$ pendant une nuit à $70^\circ\text{C}$ | solide rose qui devient un solide cireux au contact de l'air | huile marron               | [25, 206] |
| 2009  | $\text{MnCl}_2$ + 2 OA dans MeOH et injection de NaOH à température ambiante   | Cire rouge   | Cire rouge ou huile marron | [207]     |
| 2010  | 2 OA + TMAOH dans MeOH puis injection de $\text{MnCl}_2$ à température ambiante  | solide rose léger  | poudre marron              | [208]     |
| 2014  | $\text{MnOAc}_2$ + 6 OA chauffé à $150^\circ\text{C}$  | solution marron  | solution marron            | [209]     |

Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer le précurseur de manganèse à utiliser pour obtenir des objets de tailles semblables à ceux obtenus dans le chapitre précédent tout en incorporant un maximum d'ions  $\text{Mn}^{2+}$ . Les critères pour choisir ce précurseur étaient :

- la dangerosité du réactif. Comme pour la croissance de coque de sulfure de zinc, nous n'avons pas souhaité employer de précurseurs très toxiques, pyrophoriques et/ou fortement sensibles à l'eau. Ainsi, l'emploi de carbonyle de manganèse a été proscrit,
- la disponibilité du produit (produit commercial ou non),
- la complexité et la reproductibilité de la synthèse du précurseur,
- la bonne adaptation à la synthèse,
- la réussite de l'implantation du manganèse dans la particule.

Puisque nous voulions remplacer une partie de l'oléate de zinc dans la solution d'injection, le premier précurseur que nous avons voulu tester est l'oléate de manganèse (II). Ce produit n'étant pas disponible commercialement, la première étape a consisté à synthétiser ce précurseur. Plusieurs méthodes pour synthétiser ce précurseur existent et ont été testées. Elles sont récapitulées dans le tableau III.1. On peut voir que les résultats attendus sont variés et pas toujours reproductibles : on aboutit régulièrement à une huile marron qui pourrait indiquer l'oxydation du  $\text{Mn}^{2+}$  en  $\text{Mn}^{3+}$  par l'oxygène dissout dans les solvants.[210, 211] Comme la synthèse de ce précurseur n'était pas repro-

1. Pour rappel : OA, acide oléique ou ion oléate; OAc, ion acétate; TMAOH, hydroxide de tétraméthylammonium; EtOH, éthanol; MeOH, méthanol

ductible de manière satisfaisante, nous nous sommes intéressés à d'autres carboxylates de manganèse pour remplacer l'oléate de zinc.

Nous nous sommes donc intéressés d'abord au stéarate de manganèse (II) car il possède une structure proche de l'oléate. En effet, comme l'acide oléique, l'acide stéarique possède une chaîne linéaire à 18 carbones mais ne possède pas d'insaturation. Comme l'oléate de manganèse, ce produit n'est pas disponible commercialement et nous avons d'abord trouvé une synthèse reproductible. La synthèse proposée par Pradhan et Peng [212] pour ce précurseur a pu être reproduite plusieurs fois de manière satisfaisante. Pour cette synthèse, on injecte du chlorure de manganèse dans une solution de méthanol contenant un mélange équimolaire d'acide stéarique et d'hydroxyde de tétraméthylammonium. Le stéarate de manganèse forme un précipité blanc qui est filtré et lavé avec du méthanol. La synthèse de ce précurseur étant reproductible, nous avons essayé de l'utiliser en remplacement de l'oléate de zinc pour la croissance de coques épaisses. Malheureusement, nous avons rencontré des problèmes de solubilité dans le mélange (ODE/OAm) utilisé précédemment. Nous avons essayé différentes formulations de la solution d'injection en jouant sur les proportions des différents constituants, mais nous ne sommes pas parvenus à obtenir un mélange satisfaisant à température ambiante. À chaque fois, nous avons obtenu un gel qui n'était pas injectable de manière reproductible.

En parallèle des essais de synthèse de précurseur de manganèse, nous avons essayé d'utiliser un autre carboxylate de manganèse : l'acétate de manganèse (II) tétrahydrate,  $\text{Mn}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Contrairement aux deux autres précurseurs précédemment étudiés, celui-ci est disponible commercialement et se présente sous la forme d'une poudre rose. Nous avons donc essayé de reproduire la croissance de coque en remplaçant une partie de l'oléate de zinc par de l'acétate de manganèse. Lorsqu'on dissout le  $\text{Mn}(\text{OAc})_2$  dans le mélange d'injection, celui-ci prend une couleur orange qui tourne au marron. Comme pour la synthèse de l'oléate, cela pourrait indiquer une oxydation des ions  $\text{Mn}^{2+}$  en  $\text{Mn}^{3+}$  par l'oxygène dissout dans les différents liquides.

Pour limiter cette oxydation, nous avons utilisé la méthode de préparation de la solution d'acétate de manganèse proposée par Yang *et al.*[213] Le mélange ODE/OAm/ $\text{Zn}(\text{OA})_2$  est dégazé sous vide à  $120^\circ\text{C}$ <sup>1</sup> pendant 10 minutes avant d'ajouter l'acétate de manganèse et de dégazer de nouveau le mélange pendant 10 minutes à  $120^\circ\text{C}$ . Avec cette méthode, on obtient une solution d'injection orange de manière reproductible. Nous avons ensuite vérifié que ce nouveau précurseur pouvait être utilisé pour la croissance de coques épaisses contenant du manganèse. Les résultats qui seront présentés par la suite ont été obtenus avec ce précurseur. Pour étudier les différentes propriétés (structurales, op-

---

1. On atteint le reflux de l'oléylamine

tiques, magnétiques) de nos objets, nous avons synthétisé une série d'échantillon avec différents taux de manganèse (1, 2, 5, 10, 20, 30 %) et effectué une étude systématique des différentes propriétés. Dans notre cas, le taux de manganèse est défini par rapport à la quantité totale de cations,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  dans la coque, soit :

$$\%Mn = \frac{n_{Mn}}{n_{Mn} + n_{Zn}}. \quad (\text{III.1})$$

## III.2 Mise en évidence de l'incorporation du manganèse dans le QD

Afin de mettre en évidence l'incorporation d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  dans nos objets et non une simple adsorption à la surface, nous avons utilisé plusieurs méthodes de caractérisations<sup>1</sup> : la spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX), la spectrométrie par torche plasma (ICP-AES/MS), la DRX et la résonance paramagnétique électronique (RPE). L'incorporation du manganèse dans nos particules est primordiale pour la colocalisation en IRM et en imagerie de fluorescence. En effet, la biodistribution des particules et des complexes d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  risquent d'être différentes et la colocalisation des deux fonctions en pâtirait.

La RPE est une technique utilisée pour mettre en évidence la présence d'électrons non-appariés dans un échantillon ainsi que leur environnement. C'est donc une méthode de choix pour déterminer l'environnement d'un ion  $\text{Mn}^{2+}$  (qui possède 5 électrons non appariés et donc un nombre quantique de spin  $S=5/2$ ) dans une matrice de ZnS.[214–217] En présence d'un champ magnétique  $H$ , on a une levée de dégénérescence par effet Zeeman et on obtient  $2S+1=5$  états (FIG. III.1). Le manganèse possède également un spin nucléaire  $I=5/2$  et le couplage hyperfin entre le spin nucléaire et le spin électronique donne naissance à  $2I+1=5$  états pour chaque valeur de  $m_s$ . La présence d'un champ radiofréquence va permettre des transitions entre ses niveaux avec des règles de sélection,  $\Delta m_s = \pm 1$  et  $\Delta m_I = 0$ .

Nous avons obtenu des courbes (voir figure III.2) similaires à celles reportées dans la littérature.[215, 218–221] Pour des taux de manganèse inférieur à 2 %, on observe une structure fine à 6 bandes avec un couplage hyperfin de 71 G à 9,5 MHz, ce qui correspond bien à l'incorporation de  $\text{Mn}^{2+}$  dans une matrice de ZnS.[218] Lorsque le taux de manganèse augmente, la distance entre les ions manganèses diminue et l'interaction dipole-dipole entre les spins électroniques de deux ions  $\text{Mn}^{2+}$  voisins n'est plus négligeable. Cette interaction provoque la division de chaque ligne de la structure hy-

1. Pour plus de détails sur les différentes techniques de caractérisation voir l'annexe B

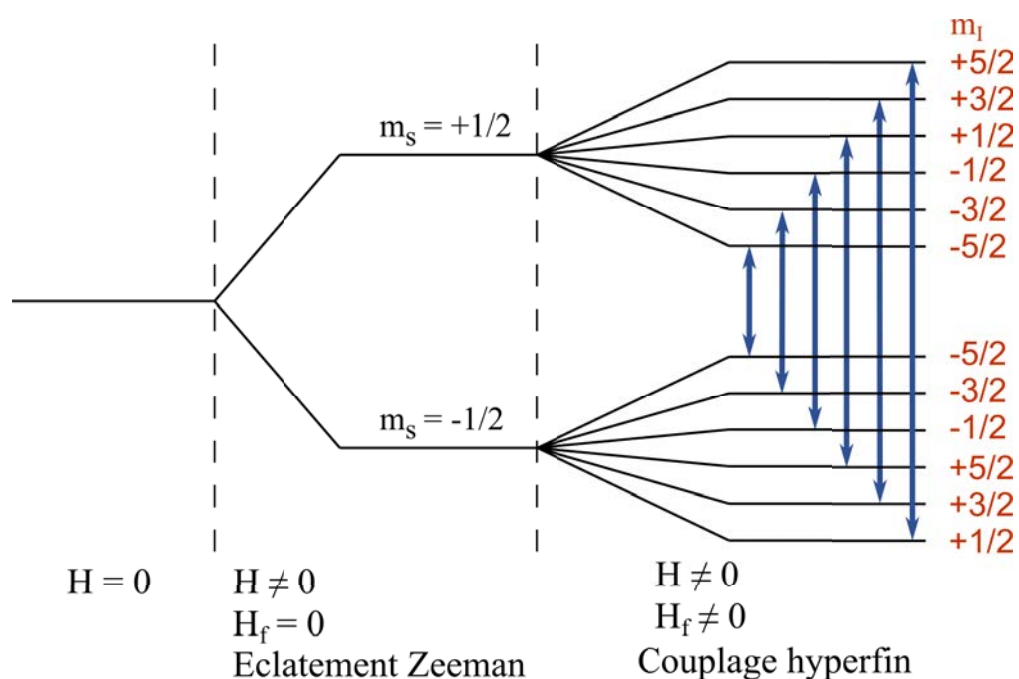


FIGURE III.1 – Schéma de séparation des niveaux d'énergie pour le cas des ions  $Mn^{2+}$ . Pour des raisons de simplification du schéma, nous ne présentons qu'un groupe de couplage hyperfin.

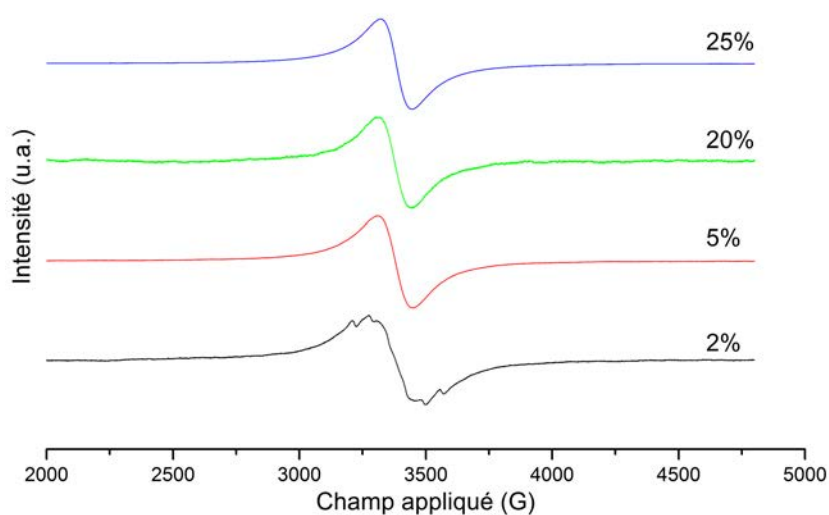


FIGURE III.2 – Spectre RPE obtenus pour différents taux de manganèse dans la solution d'injection

perfine en plusieurs lignes.[214] La somme des différentes contributions provoque un élargissement de la réponse.

Afin de confirmer la bonne incorporation du manganèse dans nos nanoparticules, nous avons analysé nos échantillons par DRX. La figure III.3 présente les diffractogrammes obtenus pour différents taux de dopage. Lorsque le taux de manganèse dans la solution d'injection augmente, on observe un déplacement des pics de diffraction du sulfure de zinc pur vers le sulfure manganèse, ce qui semble indiquer la formation d'un « alliage ». Cependant, il est impossible de déterminer si nous sommes en présence d'un alliage homogène ou si nous avons des domaines de sulfure de manganèse incluses dans du sulfure de zinc. Dans le cas d'un « alliage » inhomogène, l'apparition de contraintes va provoquer l'adaptation du paramètre de maille : on n'observera pas des pics correspondant à chacune des phases mais un pic moyen semblable à ce que nous observons. Dans le cas d'un alliage homogène, la loi de Végard relie les paramètres de maille d'un

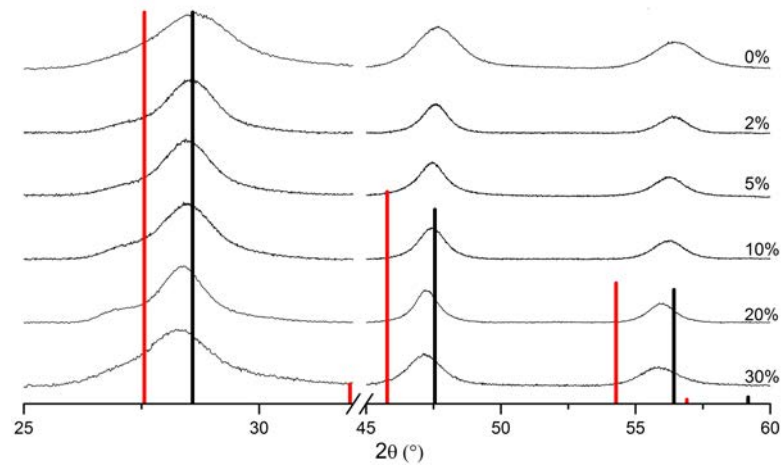


FIGURE III.3 – Diffractogrammes obtenus pour des échantillons avec différents taux de manganèse dans la coque. Comme référence nous avons ajouté les structure zinc blende ZnS, en noir (JCPDS 03-065-5476) et MnS, en rouge (JCPDS 03-065-2884)

alliage binaire aux paramètres de maille des composants de cet alliage. Dans notre cas, cela donne :

$$a_{ech} = (1 - x)a_{ZnS} + xa_{MnS}$$

,

avec  $a_{ech}$  le paramètre de maille de l'échantillon analysé,  $a_{ZnS}$  le paramètre de maille de ZnS (5,404 Å),  $a_{MnS}$  le paramètre de maille de MnS (5,601 Å) et  $x$  est le pourcentage de manganèse dans la coque. À partir de cette équation, le pourcentage de manganèse dans nos objets est donc donné par :

$$x = \frac{a_{ech} - a_{ZnS}}{a_{MnS} - a_{ZnS}}$$

Le tableau III.2 indique la composition des nanoparticules en utilisant la loi de Végard pour différents taux nominaux de manganèse. On observe que le taux réel de manganèse suit bien le taux de manganèse injecté.

TABLE III.2 – Taux de dopage effectif de manganèse déterminé grâce à la DRX.

| Taux injecté de Mn <sup>2+</sup> (en %) | 2         | 5         | 10        | 20         | 30     |
|---|-----------|-----------|-----------|------------|--------|
| Taux réel de Mn <sup>2+</sup> (en %)    | 3,4 ± 0,6 | 7,6 ± 0,5 | 6,8 ± 0,5 | 18,6 ± 0,2 | 24 ± 1 |

Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé deux techniques d'analyse élémentaire : la spectroscopie X à dispersion d'énergie (EDX) et la spectrométrie par torche plasma (ICP-AES/MS). Pour la spectroscopie X à dispersion d'énergie, on dépose une goutte de notre solution de nanoparticules sur un substrat qui est ensuite bombardé par un faisceau d'électron suffisamment énergétique pour arracher des électrons de coeurs (créant ainsi une lacune). Les électrons d'orbitales plus hautes en énergie vont combler cette lacune. Il existe plusieurs mécanismes pour cela mais l'un d'entre eux consiste à émettre la différence d'énergie sous forme de photons X. L'analyse de l'énergie et du nombre de ces photons X permet de trouver quels sont les atomes présents dans notre échantillon et dans quelle proportion. La figure III.4 présente un spectre typique obtenu lors de l'analyse de nos particules contenant du manganèse.

Comme attendu, on observe sur ce spectre la présence de chacun des éléments composant nos nanoparticules ainsi que du carbone et de l'oxygène provenant des ligands. Malheureusement, comme nous l'avons mentionné plus haut, cette technique est seulement semi-quantitative et ne permet pas de remonter à la concentration des différents ions. De plus, pour les éléments qui ont des énergies de transition assez proches, il peut être compliqué de déterminer les proportions exactes de chaque élément. On peut voir par exemple que les bandes d'émission du cuivre et du zinc autour de 1 eV sont difficilement

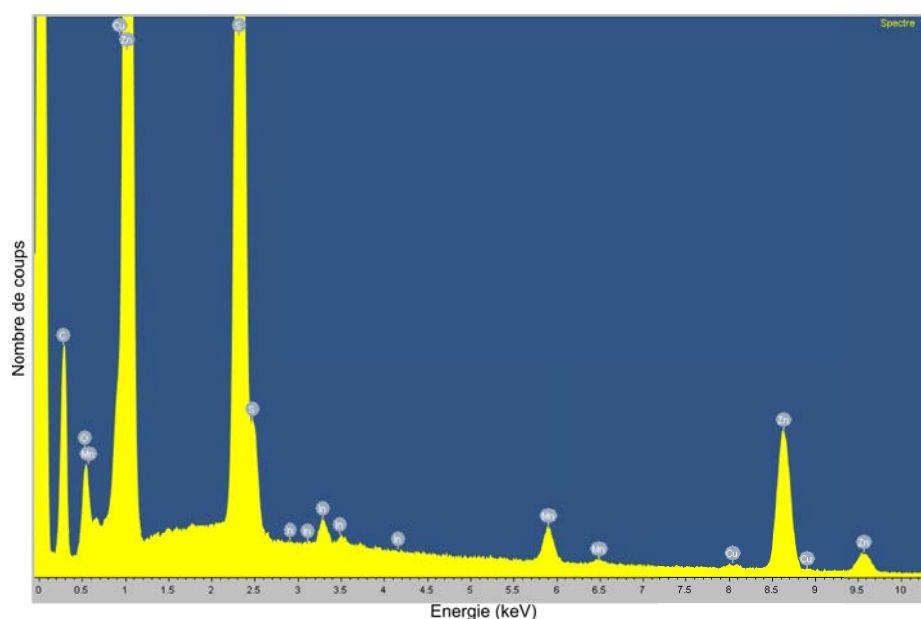


FIGURE III.4 – Spectre d’analyse dispersive en énergie pour un échantillon Zn-Cu-In-S/ $\text{Zn}_{0,8}\text{Mn}_{0,2}\text{S}$

distinguable. Une autre limitation de cette technique vient du fait de la préparation des échantillons. En effet, on analyse une goutte de solution de nanoparticules et il n’y a donc aucun moyen de savoir si les ions  $\text{Mn}^{2+}$  sont en solution ou s’ils sont bien incorporés dans les nanoparticules.

Nous avons également fait analyser nos échantillons par spectrométrie par torche à plasma. C’est une méthode quantitative qui permet de remonter précisément à la concentration en ions dans une solution donnée. La préparation des échantillons implique donc la dissolution des nanoparticules (typiquement avec de l’acide nitrique). Cette technique est donc utile pour déterminer aussi bien la composition que la concentration<sup>1</sup> de nos particules, ce qui nous sera utile par la suite. Avec cette technique également, il n’est pas possible de savoir si le manganèse est bien incorporé dans la nanoparticule ou s’il est juste en solution mais la purification par précipitation devrait éliminer les ions libres.

Chacune des trois techniques utilisées possède des avantages et des inconvénients. La figure III.5 montre la composition pour différents échantillons déterminés par chacune des trois techniques. On peut voir que pour des taux compris entre 2 et 20 % les taux obtenus par les différentes techniques sont sensiblement égaux et proche des taux injecté.

1. A condition de connaître la taille et de supposer une faible dispersion.

En revanche, au-delà de 20%, le taux de manganèse effectif commence à différer du taux injecté. Pour l'alliage  $Zn_{1-x}Mn_xS$  massif, contrairement aux structures NaCl et wurtzite pour lesquelles des taux d'incorporation supérieurs à 30 % ont été atteints,[222] le taux maximal d'incorporation de manganèse rapporté est de 7,5 % pour la structure zinc-blende.[204] Au-dessus de cette valeur, il est possible que des clusters riche en manganèse se forment et que leur inclusion dans une matrice de ZnS ne soit plus complète à partir d'un certain seuil, ce qui pourrait expliquer l'écart entre le taux réel et le taux effectif au-delà de 20 %.

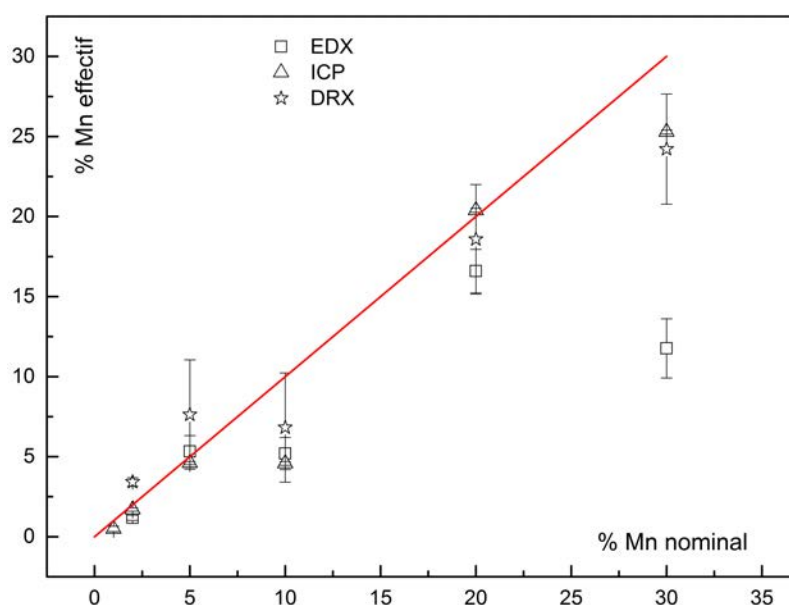


FIGURE III.5 – Comparaison des taux effectifs de manganèse obtenus par les différentes techniques utilisées. La ligne rouge correspond à un taux effectif égal au taux nominal. Carré, EDX ; triangle, ICP ; étoile, DRX

Nous avons donc synthétisé des nanoparticules dans lesquelles nous avons réussi à incorporer différents taux de manganèse avec jusqu'à 2000 atomes de manganèse soit 400 fois plus que Wang *et al.* en 2007 (52 ions  $Mn^{2+}$  par particules).[128] Avant de nous intéresser à la fonctionnalisation de nos particules pour leur solubilisation dans l'eau, nous avons voulu vérifier qu'elles possédaient bien les propriétés attendues : émission dans le rouge/proche-infrarouge et paramagnétisme.

### III.3 Influence du taux d'incorporation de manganèse sur les propriétés optiques, magnétiques et morphologiques de nos sondes

#### III.3.1 Propriétés optiques

Afin de vérifier les propriétés optiques de nos objets, nous avons mesuré les spectres d'émission de particules avec différents taux d'incorporation de manganèse et des cœurs correspondant (Fig. III.6). Comme lors de la croissance de coques de ZnS, on observe un déplacement hypsochrome<sup>1</sup> de l'émission. Cependant, ce phénomène reste limité et on obtient toujours une émission dans la gamme spectrale souhaitée, et ce, quel que soit le taux de manganèse injecté. De la même façon, la mesure de rendement quantique nous a donné des résultats similaires à ceux des nanoparticules sans manganèse. Nous obtenons des rendements typiques de 40-50 % pour tous les échantillons, chiffre qui peut aller jusqu'à 60 % pour certains échantillons.

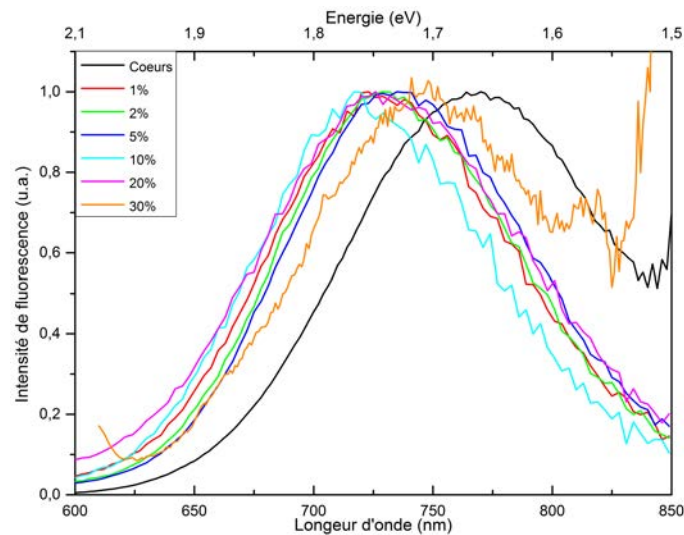


FIGURE III.6 – Spectres d'émission de fluorescence pour différents taux de manganèse injecté

Contrairement aux quantum dots émettant dans le visible et l'UV, on n'observe pas de signal provenant de la luminescence du manganèse. Pour observer la luminescence du manganèse qui correspond à la transition  ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$ , il faut qu'il y ait un transfert d'énergie entre le quantum dot et l'ion manganèse.[223] Dans le cas des quantum dots

1. vers les énergies plus élevées

émettant dans le visible ou l'UV, l'énergie correspondant à la largeur de la bande interdite est plus grande que l'énergie de la transition  ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$  et elle peut avoir lieu. Dans notre cas, la largeur de la bande interdite est plus petite donc le transfert d'énergie est inexistant.

### III.3.2 Propriétés magnétiques

Comme cela a été mentionné au début du chapitre, les agents de contraste  $T_1$  pour l'IRM doivent posséder un caractère paramagnétique. Des mesures d'aimantation ont été réalisées afin de vérifier que cela était bien le cas. La figure III.7(a) présente les courbes d'aimantation pour les différents échantillons. On observe un comportement purement paramagnétique pour tous les échantillons avec des susceptibilités magnétiques qui augmentent avec le taux de manganèse (FIG. III.7(b)). L'augmentation de la susceptibilité en fonction du taux de manganèse n'est pas linéaire, ce qui pourrait provenir de la présence de cluster de sulfure de manganèse. Le sulfure de manganèse étant un matériau antiferromagnétique,[224] la susceptibilité des clusters devrait être plus faible que celle des ions libres. Il est intéressant de noter que les valeurs de susceptibilité que nous avons mesurées sont significativement plus petites que celles rapportées pour des objets similaires.[41]

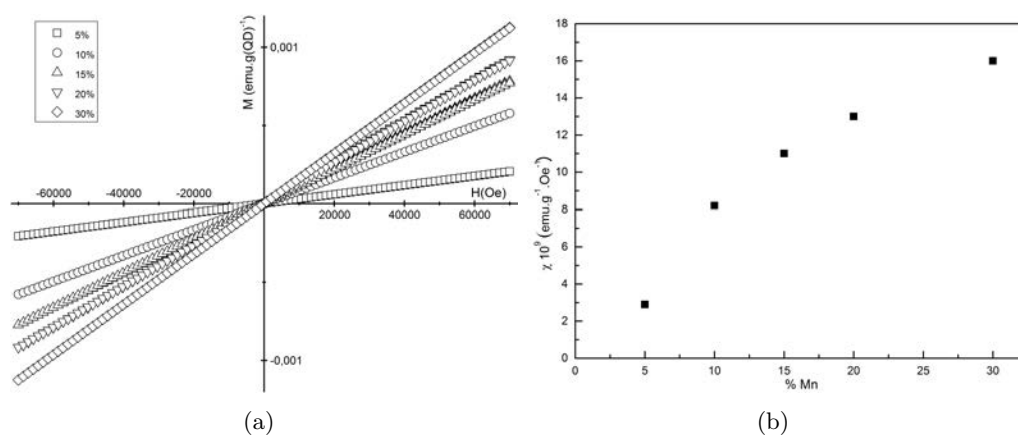


FIGURE III.7 – Propriétés magnétiques des quantum dots Zn-Cu-In-S/ $Zn_{1-x}Mn_xS$  : (a) courbes d'aimantation pour des échantillons avec différents taux de manganèse dans la coque ; (b) susceptibilité magnétique en fonction du taux de manganèse dans la coque.

### III.4 Conclusion du chapitre

Nous avons réussi à faire croître des coques épaisses de  $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$  sur nos cœurs de  $\text{ZnCuInS}$  grâce à l'adaptation de la synthèse développée pour la croissance de  $\text{ZnS}$ . Le remplacement d'une partie de l'oléate de zinc par de l'acétate de manganèse nous a permis d'obtenir des objets paramagnétiques avec une émission dans la gamme spectrale souhaitée. Nous avons mis en évidence l'incorporation du manganèse *dans* la particule et non juste l'adsorption à la surface. Cependant, en fin de synthèse, nos nanoparticules sont recouvertes de ligands hydrophobes et ne sont donc pas utilisables en l'état pour les applications visées. La fonctionnalisation de ces particules et la caractérisation de leurs propriétés une fois transférées dans l'eau est donc un point crucial du développement de nos sondes.

## Chapitre IV

# Vers l'imagerie *in vivo*

Pour faire des études de colocalisation en IRM pondérée en  $T_1$  et en imagerie de fluorescence, il est nécessaire d'avoir une sonde compacte, stable et avec une toxicité limitée contenant une entité paramagnétique et une entité fluorescente, de préférence dans le proche-infrarouge pour augmenter la profondeur de pénétration. Nous avons montré dans les chapitres précédents la synthèse de nanoparticules avec un cœur fluorescent, qui émet dans la première fenêtre thérapeutique, sur lequel nous avons fait croître une coque paramagnétique, à base de  $Zn_{1-x}Mn_xS$ , qui devrait avoir des effets en IRM. Nous avons vu dans le premier chapitre que les nanoparticules étaient recouvertes de ligands pour assurer leur stabilité colloïdale. Or, la synthèse est faite en milieu organique et les nanoparticules sont donc recouvertes de ligands hydrophobes en fin de synthèse, pour les cœurs comme pour la croissance des coques.

Il nous a donc fallu développer une méthode pour rendre ces sondes solubles et stables en milieu aqueux répondant à plusieurs contraintes :

- la stabilité sur une large gamme de pH,
- une taille limitée (un rayon hydrodynamique inférieur à 100 nm) pour permettre une bonne circulation,
- une adsorption non-spécifique limitée, pour éviter le blocage d'éventuelles fonctions de ciblage en surface, pour limiter une augmentation du rayon hydrodynamique et une élimination trop rapide par le système immunitaire,[225]
- l'intégrité de la nanoparticule pour éviter le relargage du manganèse, qui pourrait fausser sa biodistribution.

Nous détaillerons ici les différentes méthodes qui existent pour rendre une nanoparticule soluble dans les milieux aqueux et celle que nous avons choisie.

Après avoir obtenu des sondes hydrosolubles et stables, nous avons vérifié que les pro-

priétés optiques, c'est-à-dire les spectres d'absorption et la longueur d'onde d'émission, et les propriétés magnétiques, plus spécifiquement la relaxivité longitudinale, étaient suffisantes pour l'imagerie dans le petit animal. Avant de passer à l'imagerie *in vivo*, nous avons également étudié la cytotoxicité de nos sondes. Les propriétés optiques et magnétiques étant satisfaisantes *in vitro*, nous avons tenté de montrer, comme preuve de principe, que nos sondes pouvaient être utilisées pour la détection de ganglions lymphatiques chez la souris en IRM comme en fluorescence infra-rouge.

## IV.1 Transfert et stabilité en milieu aqueux

Afin d'obtenir des sondes utilisables pour l'imagerie *in vivo*, il a d'abord fallu modifier la surface des nanoparticules de manière à les rendre solubles dans les milieux utilisés pour l'imagerie. Nous allons détailler ici les différentes techniques qui existent pour solubiliser des nanoparticules dans l'eau et la solution que nous avons retenue.

### IV.1.1 Méthodes existantes

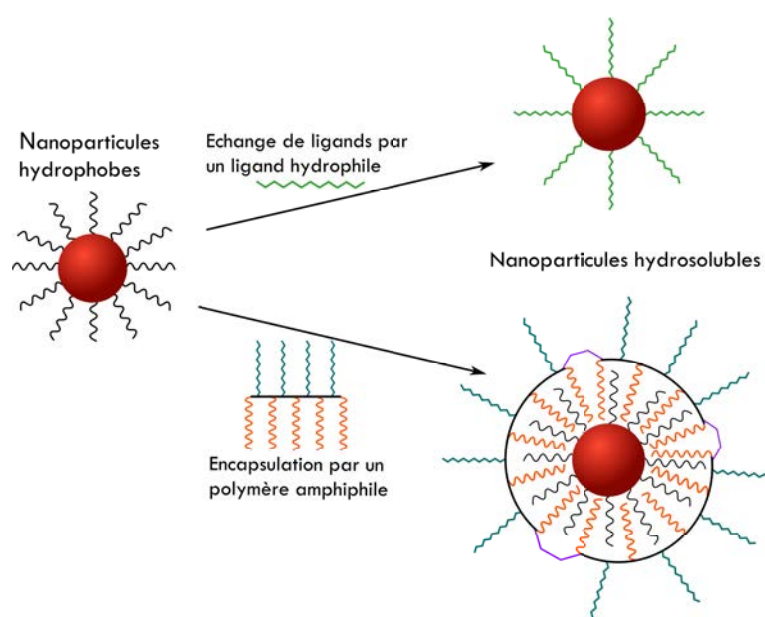


FIGURE IV.1 – Stratégies pour la solubilisation de nanoparticules dans l'eau. En haut, l'échange de ligands : on remplace les ligands hydrophobes (en noir) par des ligands hydrophiles (en vert). En bas, l'encapsulation par un polymère amphiphile. La partie hydrophobe du polymère (en orange) va interagir avec les ligands de la particule alors que la partie hydrophile (en bleu) assure la solubilité.

Il existe essentiellement deux techniques pour rendre soluble dans l'eau des particules recouvertes de ligands hydrophobes : l'encapsulation et l'échange de ligands.[226–230] La figure IV.1 présente un schéma des objets obtenus avec les deux techniques. Pour chacune de ces techniques, il est nécessaire d'avoir un ligand bifonctionnel : une fonction d'accroche sur la nanoparticule et une fonction hydrophile qui va permettre la solubilisation dans l'eau ainsi que la dispersion colloïdale.

### L'encapsulation par des molécules amphiphiles

Dans le cas de l'encapsulation, on utilise une molécule amphiphile.[108, 110, 231] La partie hydrophobe (en orange sur la figure IV.1) joue le rôle de fonction d'accroche en interagissant avec la couche de ligands hydrophobes présents à la surface de la nanoparticule. La partie hydrophile permet quant à elle la bonne dispersion dans l'eau des nanoparticules. Par exemple, Dubertret *et al* en 2002 ont utilisé une phosphatidyléthanolamine (PE) couplée à un poly-(éthylèneglycol) (PEG) (Fig. IV.2, PL-PEG2000) pour solubiliser des quantum dots CdSe/ZnS. En 2003, Wu *et al.* utilisent un polymère amphiphile basé sur un poly-(acide acrylique) couplé avec des groupements octylamine et lysine pour solubiliser des quantum dots CdSe/ZnS(Fig. IV.2 PAA-lysine-octylamine).[108] Pellegrino *et al.* ont montré en 2004 que l'utilisation d'un poly-(anhydride maléique-*alt*-1-tétradécène) permettait de solubiliser non seulement des quantum dots CdSe/ZnS mais aussi des nanoparticules métalliques (Au, CoPt<sub>3</sub>) ou d'oxydes (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).[231]

Cette technique présente l'avantage de conserver la structure du quantum dot : la surface est toujours passivée par les ligands issus de la synthèse, ce qui permet en général de conserver le rendement quantique des objets initiaux. De plus, la formation d'une couche hydrophobe à la surface des nanoparticules empêche la diffusion de l'eau vers la surface, limitant de fait l'oxydation des quantum dots et donc la perte de rendement quantique. Si c'est un avantage pour la mise au point de sondes fluorescentes, cela peut devenir problématique dans notre cas. En effet, comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, l'accélération de la relaxation longitudinale par les agents de contraste se fait via une interaction dipôle-dipôle entre les ions paramagnétiques et les molécules d'eau. Or c'est une interaction courte distance (elle décroît en  $1/r^6$ ) et la présence d'une couche hydrophobe va limiter les relaxivités de nos objets. D'autre part, à cause de la couche lipidique, les objets obtenus par cette technique ont en général un rayon hydrodynamique plus grand que ceux obtenus par échange de ligands,[232] ce qui peut poser des problèmes pour certaines applications où la diffusion dans les capillaires sanguins fins est nécessaire.

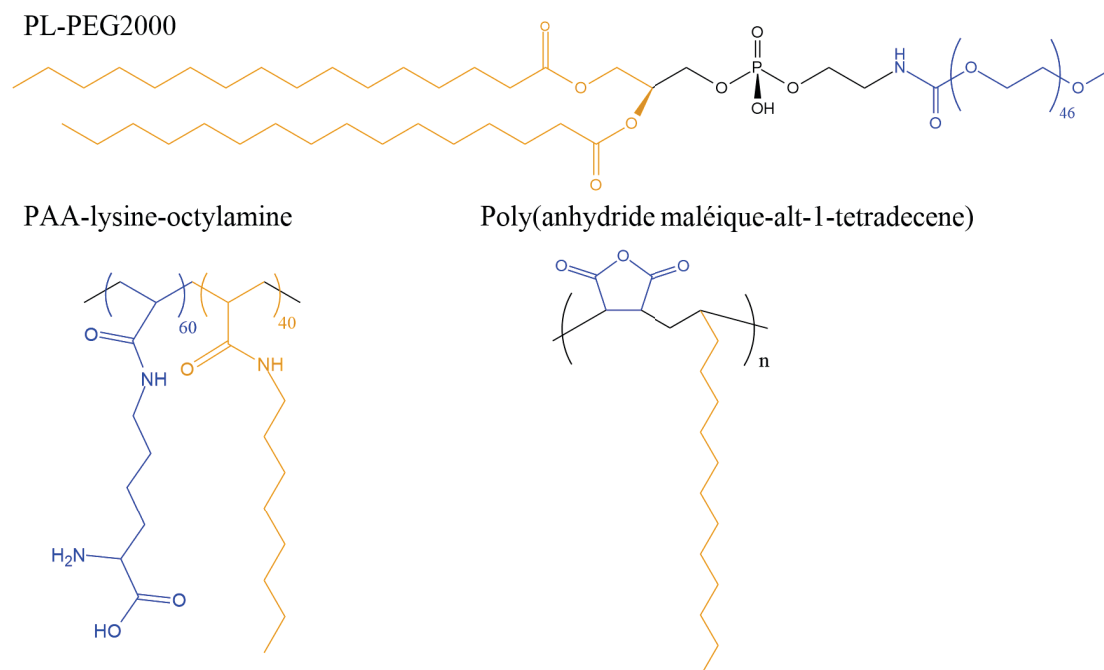


FIGURE IV.2 – Exemples de ligands utilisés pour l'encapsulation de quantum dots

### L'échange de ligands

L'autre technique développée pour solubiliser les nanoparticules dans l'eau est l'échange de ligands (voir figure IV.1). Cette technique consiste à remplacer les ligands hydrophobes présents à la surface des nanoparticules par des ligands hydrophiles. Comme pour les molécules amphiphiles, ces ligands possèdent deux fonctions : une fonction qui permet l'accroche directement à la surface de la nanoparticule et une fonction hydrophile, qui permet la dispersion et la stabilité colloïdale. Pour les nanoparticules recouvertes d'une couche de sulfure de zinc, la fonction d'accroche la plus utilisée est la fonction thiol en raison de la grande affinité entre le zinc et le soufre.[233]

En 1998, Chan et Nie ont proposé d'utiliser l'acide 2-mercaptoacétique pour solubiliser des quantum dots CdSe/ZnS (FIG. IV.3).[234] Depuis, de nombreuses équipes ont utilisé d'autres ligands monodentates comme l'acide 3-mercaptopropionique,[235], la cystéine,[236] des thiols couplés à des brins d'ADN,[237] des sucres[238] ou du diéthylène-glycol (2-(2-(2-mercaptoéthoxy)éthoxy)éthanol).[91] Malheureusement, la stabilité des nanoparticules solubilisées par des ligands monodentates est limitée.[239] Pong *et al.* ont montré que les ligands sont plus fortement liés lorsqu'ils sont sous forme de thiolates.[184, 240] Or, la proportion de thiolates dépend fortement du pH de la solution et de fait, la

stabilité des nanoparticules va, elle aussi, dépendre fortement du pH. Ainsi, Aldana *et al.* ont montré que les ligands (acide 3-mercaptopropionique et 3-mercaptopropanol) liés à des nanocristaux de CdSe se protonent pour des pH < 9-9,5, ce qui limite l'utilisation des quantum dots pour l'imagerie.

Pour pallier à ces problèmes, Mattoussi *et al.* ont proposé l'utilisation d'un ligand bidentate, l'acide dihydrolipoïque (DHLA, voir la figure IV.3 pour la structure), pour solubiliser des quantum dots.[241] Malheureusement, comme pour les ligands monodentates, il est nécessaire d'avoir la forme carboxylate de l'acide et donc avoir un pH > 7-8. De plus, la charge négative peut poser des problèmes d'adsorption non spécifique avec des biomolécules chargées positivement. Pour pallier à ce problème, Susumu *et al.* ont couplé une chaîne de poly-(éthylène glycol) (PEG) à de l'acide dihydrolipoïque (DHLA).[242] Le PEG est un polymère très hydrophile et neutre, ce qui permet de limiter l'adsorption non spécifique.[243] Outre les quantum dots,[244] le PEG est utilisé pour solubiliser de nombreux types de nanoparticules : Au,[245, 246] Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,[52, 247], Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,[248] ou encore SiO<sub>2</sub>. [249, 250] Le couplage du DHLA avec une sulfobétaïne (DHLA-SB) a permis à notre groupe d'obtenir des nanoparticules avec une stabilité équivalente mais avec un rayon hydrodynamique plus petit.[251, 252] D'autres fonctions bidentates ont été proposées pour améliorer la stabilité des quantum dots : le dithiothréitol,[253] des dithiocarbamates,[254] ou encore des dithiocarboxylates.[255, 256] Nous avons développé un ligand oligomérique contenant plusieurs fonctions DHLA et sulfobétaïne et nous avons montré que les quantum dots ainsi obtenus sont stables sur une plus longue période que ceux avec une seule fonction d'accroche.[257]

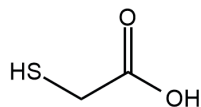
#### IV.1.2 L'échange de ligands par le DHLA-PEG

Pour nos objets, nous avons décidé d'utiliser un ligand DHLA-PEG. En effet, ce ligand répond aux critères de stabilité (fonction d'accroche bidentate), de solubilité et limite fortement l'adsorption non spécifique grâce au PEG. De plus, sa solubilité dans de nombreux solvants, polaires ou non, permet d'effectuer un échange monophasique simple à mettre en œuvre contrairement aux sulfobétaïnes. Contrairement aux quantum dots hydrophobes, les sulfobétaïnes ne sont solubles que dans les solvants polaires et nécessitent soit un échange biphasique, soit deux échanges monophasiques consécutifs. Dans le cas du DHLA-PEG, les quantum dots (typiquement CdSe/ZnS), dispersés dans le chloroforme, sont ajoutés à une solution de DHLA-PEG dans le chloroforme et laissé à 60°C pendant une nuit. Les ligands hydrophobes sont remplacés par le DHLA-PEG et on obtient ainsi des nanoparticules solubles dans l'eau.

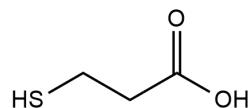
Malheureusement, l'échange n'est pas aussi évident pour nos nanoparticules Zn-Cu-

## Ligands monodentates

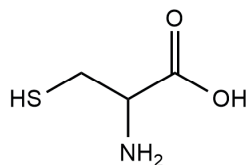
Acide 2-mercaptoacétique



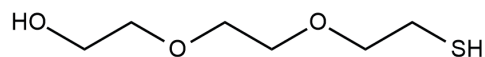
Acide 3-mercaptopropionique



Cystéine

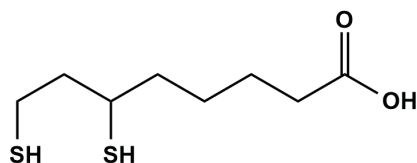


2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)ethanol

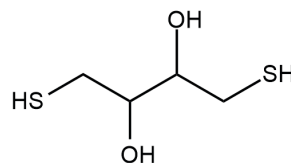


## Ligands bidentates

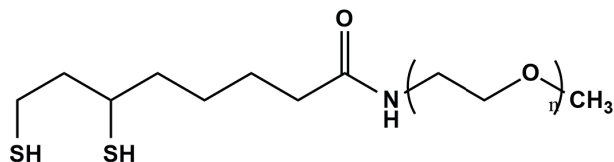
DHLA



Dithiothréitol



DHLA-PEG



DHLA-SB

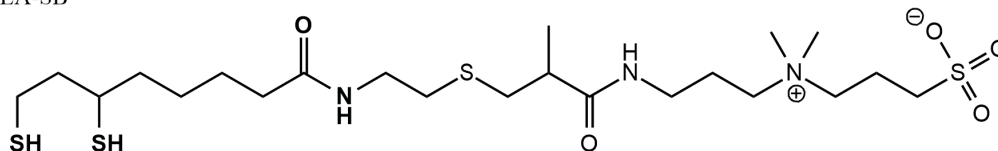


FIGURE IV.3 – Exemples de ligands mono- et bidentates utilisés pour l'échange de ligands

In-(S,Se)/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S. En effet, sans traitement post-synthèse de notre part, nous n'arrivons pas à obtenir des objets solubles dans l'eau. Ceci peut venir du fait que dans notre synthèse, nous utilisons de l'éthylxanthate qui peut complexer fortement nos quantum dots et donc être difficile à échanger.[256] Afin de savoir quels sont les ligands présents en surface, nous avons analysé nos quantum dots par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FT-IR). La figure IV.4 présente les spectres pour nos quantum dots solubles dans les solvants organiques ainsi que les ligands possiblement en surface : DDT<sup>1</sup>, oléate et xanthate. L'analyse par EDX n'a pas révélé de présence d'azote, ce qui laisse à penser que l'oléylamine n'est présent au mieux qu'en faible quantité à la surface de nos particules.

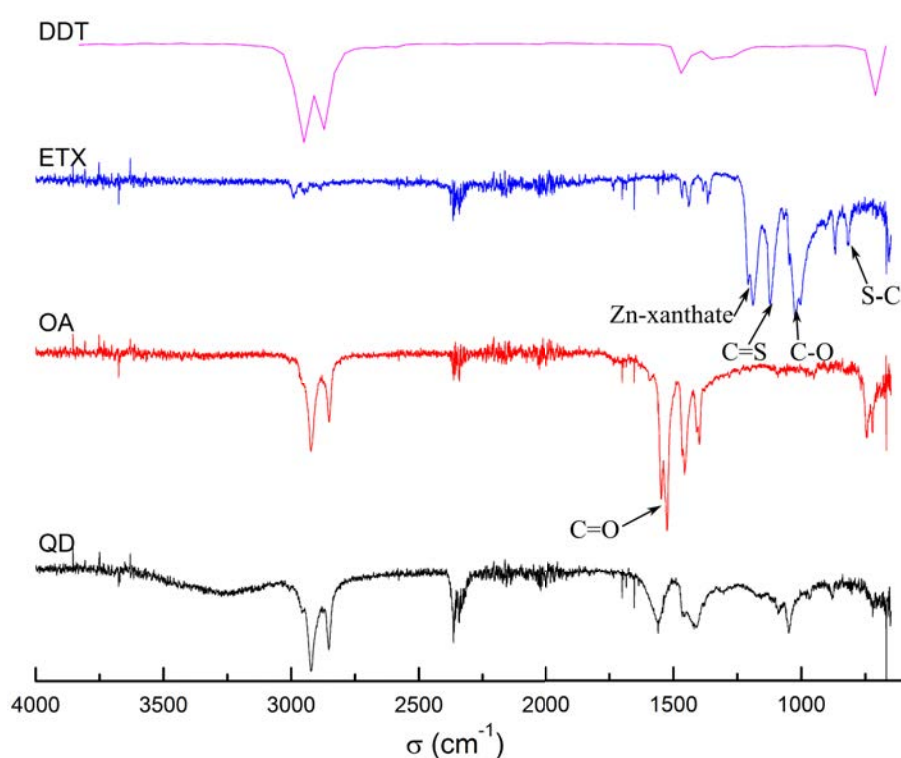


FIGURE IV.4 – Spectre infrarouge d'un échantillon avant échange de ligands (noir) et comparaison avec l'oléate de zinc (rouge), l'éthylxanthate de zinc (bleu) et le dodécane-1-thiol (rose)

Ces spectres semblent indiquer que les ligands majoritaires en surface de nos quantum dots sont des oléates et des éthylxanthates. Pour retirer ces deux ligands qui sont liés

1. Nous avons utilisé un spectre de référence tiré de la base de données pour les composés organiques de l'Institut National des Sciences et Technologies du Japon[258]

TABLE IV.1 – Tableau récapitulatif des traitements de surface essayé

| Ligands  | T (en °C) | Durée      | Problèmes rencontrés  |
|----------|-----------|------------|---|
| TOP/TOPO | 230       | 20 minutes | Précipitation des quantum dots à chaud et impossibilité de les redisperser                    |
| OAm/OA   | 200       | 20 minutes | Problème de reproductibilité dans les échanges avec le DHLA-PEG ensuite                       |
| MPA      | 200       | 60 minutes | Diminution de la fluorescence et problème de reproductibilité dans l'échange avec le DHLA-PEG |

de façon stable à la surface de nos nanoparticules, nous avons du mettre au point un traitement de surface. Nous avons donc essayé de chauffer nos nanoparticules en présence d'un excès de ligands plus faiblement liés à la surface. Nous avons rencontré divers problèmes liés à la nature des différents ligands utilisés. Le tableau IV.1 récapitule les différents mélanges que nous avons essayé. Avec cette méthode, nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats suffisamment reproductibles.

Nous avons donc décidé d'essayer d'utiliser une autre méthode qui consiste à déposer une couche de soufre puis une couche de zinc tout en contrôlant mieux les ligands présents en surface (pour plus de détails sur le traitement de surface et sur l'échange de ligands voir l'annexe A.3). Cette méthode se base sur un protocole mis au point au laboratoire par Benoit Mahler, Brice Nadal *et al.* pour la croissance de coque de sulfure de cadmium/zinc sur des nanoplaquettes de séléniure de cadmium.[198] Les quantum dots sont dispersés dans une solution de chloroforme en présence d'octylamine et de thioacétamide (TAA) et mis à l'étuve à 60°C pendant une nuit. Cette étape permet le dépôt d'une couche de soufre sur nos particules. L'excès de réactif est ensuite éliminé en précipitant les nanoparticules avec de l'éthanol. Elles sont ensuite reprises dans le chloroforme et l'ajout d'oléate de zinc permet de remplacer les octylammoniums présents en surface par une couche de zinc et des ligands oléate. Encore une fois, l'excès de réactif est éliminé par précipitation avec de l'éthanol. Cette méthode reproductible permet d'obtenir des particules pour lesquelles l'échange avec le DHLA-PEG est performant avec toutefois quelques limitations, comme nous le verrons un peu plus loin.

L'échange à proprement parler se déroule en une étape : les quantum dots sont solubilisés dans du chloroforme et on ajoute à cette solution une solution de DHLA-PEG dans du chloroforme. Après une nuit à l'étuve (60°C), les quantum dots sont repris dans un mélange éthanol/hexane qui permet de précipiter les nanoparticules tandis que le surnageant contient l'excès de DHLA-PEG. Les nanoparticules ainsi obtenues sont

ensuite purifiées par ultrafiltration et ultracentrifugation.

### IV.1.3 DLS et zétamétrie

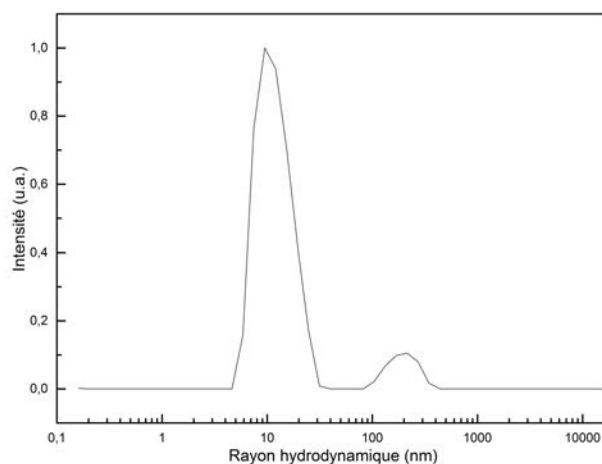
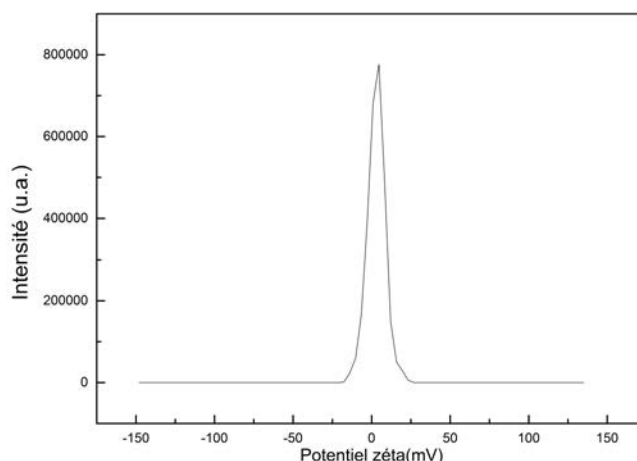


FIGURE IV.5 – Mesure du rayon hydrodynamique de quantum dots  $\text{ZnCuInSe/Zn}_{0,86}\text{Mn}_{0,14}\text{S}$

Après l'échange, nous avons mesuré le rayon hydrodynamique de nos sondes par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *Diffusion Light Scattering* en anglais). Nous avons obtenu des rayons hydrodynamiques de  $10,8 \pm 0,7$  nm, comme on peut le voir sur la figure IV.5. On observe également une seconde population avec un rayon hydrodynamique de l'ordre de 100 nm qui correspond à la présence d'agrégats dans notre solution. L'intensité de la lumière diffusée par une nanoparticule est proportionnel à  $d^6$ ,  $d$  étant le diamètre de l'objet diffusant : les agrégats représentent donc moins d'une partie par million.

L'une des raisons pour lesquelles nous avons choisi ce ligand, le DHLA-PEG avec un groupe méthoxy terminal, est la présence de PEG qui va limiter l'adsorption non-spécifique, notamment grâce à l'absence de charge de surface.[245, 259] Nous avons donc mesuré la charge de surface de nos sondes par zétamétrie. Cette mesure a confirmé l'absence de charge de surface puisque nous avons obtenu un potentiel de  $0,5 \pm 0,2$  mV (voir la figure IV.6).

Ces deux mesures confirment que nos nanoparticules devraient être utilisables *in vivo*, à condition qu'elles possèdent des relaxivités (pour l'IRM) et des rendements quantiques (pour l'imagerie de fluorescence) suffisamment élevés.

FIGURE IV.6 – Mesure du potentiel zéta de quantum dots ZnCuInSe/Zn<sub>0,86</sub>Mn<sub>0,14</sub>S

## IV.2 Propriétés des sondes en milieu aqueux

Afin de vérifier que nos sondes remplissaient bien le cahier des charges que l'on s'était fixé, nous avons effectué un certain nombre d'analyses : propriétés optiques, relaxivité ou encore cytotoxicité.

### IV.2.1 Propriétés optiques

Nous avons d'abord vérifié que les propriétés optiques de nos objets étaient bien conservées lors de leur passage dans l'eau. La figure IV.7 présente les spectres d'émission et d'absorbance avant et après échange pour un échantillon Zn-Cu-In-S/Zn<sub>0,8</sub>Mn<sub>0,2</sub>S. On observe un pic d'émission large caractéristique des quantum dots I-III-VI avec un léger décalage hypsochrome et une absorbance qui augmente continuellement lorsque la longueur d'onde diminue.

Malheureusement, avec le traitement que nous utilisons pour rendre nos nanoparticules hydrosolubles, nous obtenons des quantum dots moins brillants une fois passés dans l'eau. La figure IV.8 présente l'intégrale de la courbe d'émission normalisée par l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation. On peut notamment observer que la plus grosse perte de fluorescence a lieu lors du traitement de nos nanoparticules avec l'octylamine et le TAA. Néanmoins, comme nous le verrons par la suite, les rendements quantiques (de l'ordre de 10-20 %) restent suffisants pour effectuer des images de fluorescence *in vivo*.

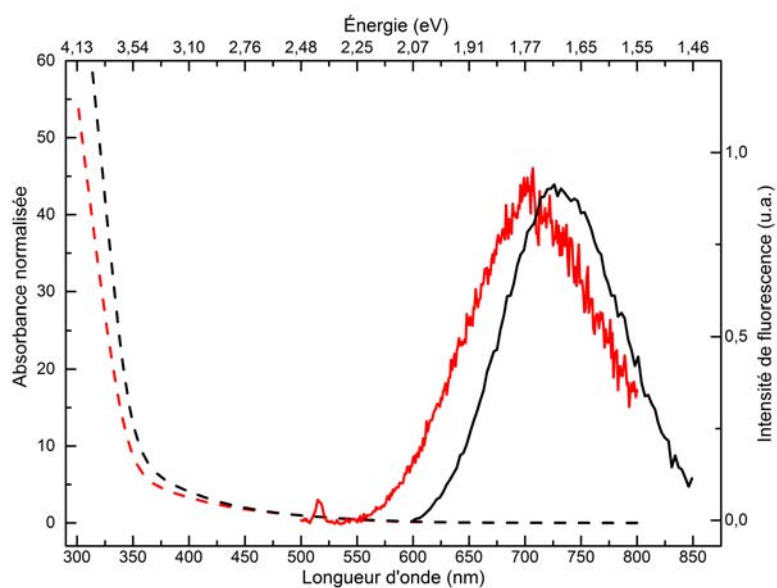


FIGURE IV.7 – Spectre d'absorbance (tirets) et d'émission (trait plein) de quantum dots ZnCuInS/Zn<sub>0,8</sub>Mn<sub>0,2</sub>S avant (noir) et après (rouge) échange avec le DHLA-PEG.

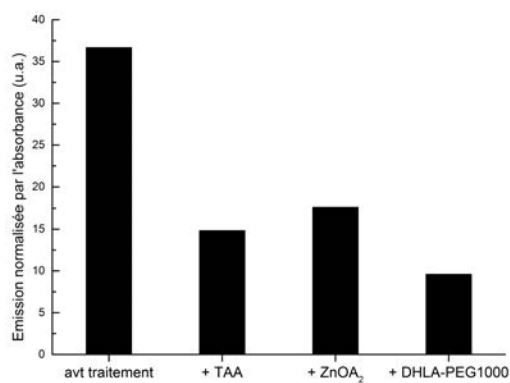


FIGURE IV.8 – Émission normalisée par l'absorbance à chaque étape du traitement de nos nanoparticules

### IV.2.2 Mesures de relaxivité

Pour déterminer le pouvoir contrastant de nos objets en IRM, nous avons mesuré les relaxivités longitudinales ( $r_1$ ) de nos objets. Cette grandeur permet d'évaluer dans quelle mesure nos sondes vont accélérer la relaxation des particules d'eau situées dans leur voisinage.

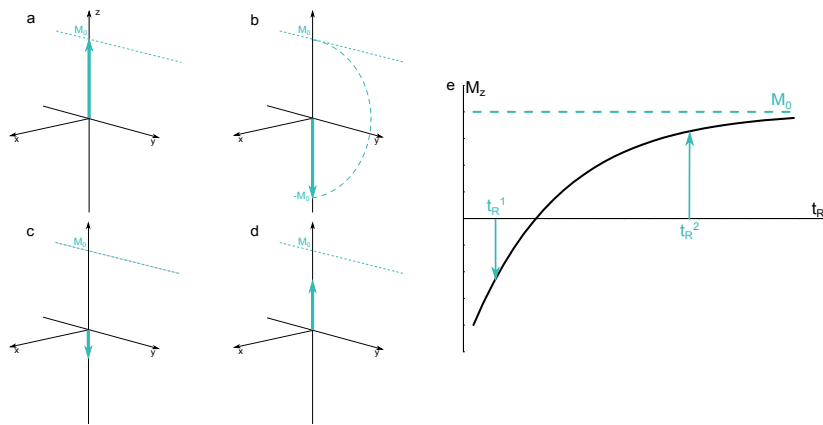


FIGURE IV.9 – Schéma de principe d'une mesure du temps de relaxation longitudinale par une séquence d'inversion récupération

Comme nous ne disposons pas d'un relaxomètre, ces mesures ont été effectuées sur un spectromètre RMN fonctionnant à 7 T par un procédé d'inversion-récupération. La figure IV.9 explique le principe de cette mesure. En l'absence de perturbation (Fig. IV.9.a), l'aimantation longitudinale  $M_z$  prend sa valeur à l'équilibre  $M_0$ . L'application d'une impulsion radiofréquence  $\pi$  va retourner l'aimantation et l'on aura  $M_z = -M_0$  (Fig. IV.9.b). Après un temps de relaxation  $T_r$  (Fig. IV.9.c et d), on applique une impulsion radiofréquence de  $\pi/2$  pour permettre la mesure de  $M_z(T_r)$ . Or,  $M_z$  évolue selon (Fig. IV.9.e) :

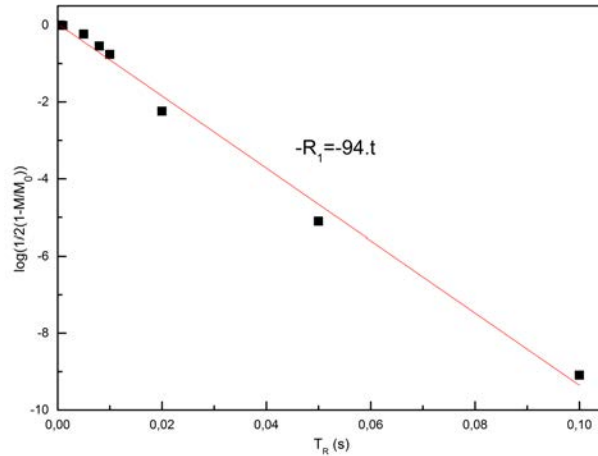
$$M_z(t) = M_0(1 - 2e^{-t/T_1})$$

,

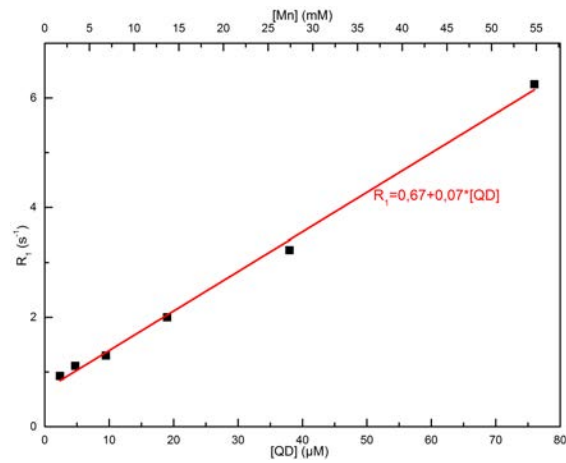
avec  $T_1$  le temps de relaxation longitudinal. En traçant et en ajustant la courbe  $\ln(1/2(1 - M_z(T_r)/M_0))$  en fonction de  $T_r$ , on obtient une droite de pente  $-R_1 = -1/T_1$ , comme on peut le voir sur la figure IV.10(a). Pour un même échantillon, cette mesure est faite à différentes concentrations et le tracé de  $R_1$  en fonction de la concentration en nanoparticules donne une droite de pente  $r_1$  (voir la figure IV.10(b)). En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, le taux de relaxation  $R_1$  est relié à la relaxivité selon :

$$R_1 = R_1^d + r_1[QD],$$

avec  $R_1^d$  est le taux de relaxation en l'absence d'agent de contraste et  $[QD]$  la concentration en quantum dots.



(a)



(b)

FIGURE IV.10 – Mesure de relaxivité pour un échantillon. (a) Tracé de  $\ln(1/2(1 - M_z(T_r)/M_0))$  en fonction de  $T_r$ ; (b) Taux de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en quantum dots et en manganèse.

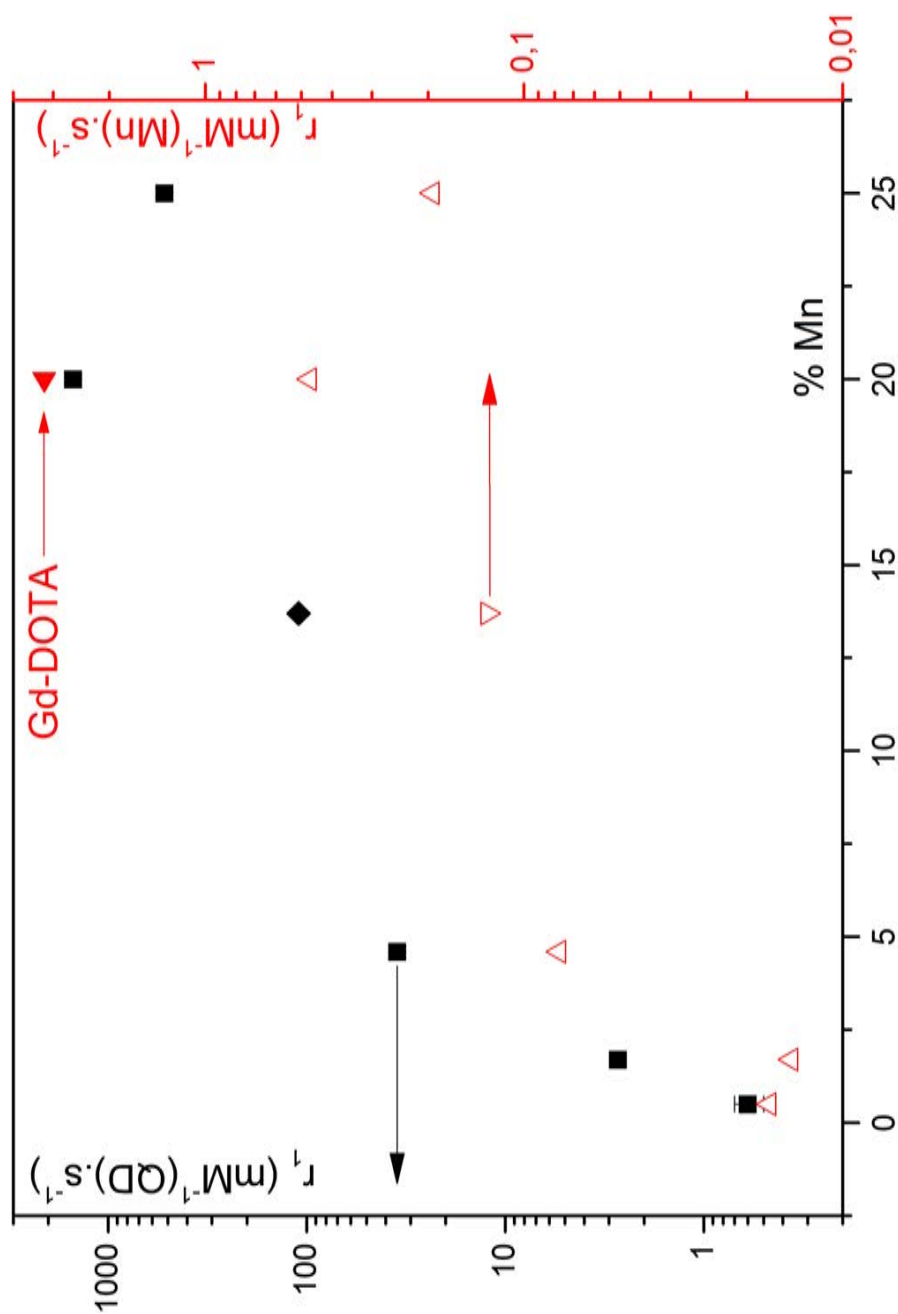


FIGURE IV.11 – Relaxivité (mesurée à 7 T et 300 K) pour des échantillons de Zn-Cu-In-S/ $Zn_{1-x}Mn_x$ S avec différents taux de manganèse en fonction de la concentration en QDs (■) ou en manganèse ( $\Delta$ ) et un échantillon Zn-Cu-In-Se/ $Zn_{0.86}Mn_{0.14}S$  ( $\blacklozenge$  et  $\blacktriangledown$ ). À titre de comparaison, nous indiquons un complexe commercial de gadolinium ( $\blacktriangledown$ ).

Ces mesures ont été effectuées pour des échantillons avec différents taux de manganèse dans la coque. La figure IV.11 indique les relaxivités pour différents échantillons et la comparaison avec un complexe commercial de gadolinium. On peut voir que jusqu'à un certain point, la relaxivité par rapport à la concentration en nanoparticules augmente avec le taux de manganèse. Ceci est cohérent avec le fait que lorsque le taux de manganèse augmente, le nombre d'ions  $Mn^{2+}$  par nanoparticules augmente.

Contrairement à la méthode SILAR utilisée pour la croissance de coques dopées sur des quantum dots II-VI, la localisation des ions  $Mn^{2+}$  dans la nanoparticule n'est pas contrôlable et il est difficile de mettre en évidence la formation d'un alliage homogène. Ainsi, lorsqu'on augmente le nombre d'ions  $Mn^{2+}$  par particule, il est possible que la proportion d'ions paramagnétiques présents en surface augmente également à cause de la différence de réactivité entre les précurseurs de zinc et de manganèse. Or ce sont ces ions là qui vont participer à l'augmentation de la relaxivité mesurée. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la relaxivité par ion manganèse.

Lorsque le taux de manganèse présent dans la coque dépasse 20 %, on observe une diminution de la relaxivité par nanoparticule. À ces concentrations, on dépasse la limite de miscibilité entre ZnS et MnS et il se peut qu'il y ait une ségrégation de phase et que des clusters de sulfure de manganèse soient « enfouis » dans la coque. Dans ce cas, si ils sont trop loin de la surface et ne participe que faiblement à l'augmentation de la relaxivité, ce qui est cohérent avec la diminution de la relaxivité par rapport à la concentration en ions manganèse. Il est également possible que les interactions antiferromagnétiques entre manganèse diminuent le moment magnétique localement et entraîne une diminution de la relaxivité par ions.

Les valeurs de relaxivité que nous obtenons par rapport à la concentration en manganèse sont beaucoup plus faibles que pour d'autres nanoparticules ou complexes présentés dans la littérature. Ainsi, Wang *et al.* obtiennent, pour des QDs  $CdSe/Zn_{1-x}Mn_xS$ , des relaxations par manganèse de l'ordre de  $10-20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , soit 30 à 40 fois plus élevées que les nôtres mais pour des coques moins épaisse (0,3 à 1,8 nm d'épaisseur).[128] Plus récemment, Gaceur *et al.* ont obtenu des relaxations de l'ordre de  $20 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour des nanoparticules de  $Zn_{0,9}Mn_{0,1}S$ . [41] D'une part, leur mesure est faite à 3 T et il a été montré que la relaxivité longitudinale diminue lorsqu'on augmente le champ appliqué. D'autre part, leurs nanoparticules sont plus petites (environ 1,5 nm de diamètre) ce qui fait un nombre plus important d'ions manganèse en surface ou proches de la surface. Le rapport surface sur volume pour une sphère est inversement proportionnel à son rayon. Ainsi, en passant d'une sphère de 8 nm de diamètre à une sphère de 1,5 nm on multiplie ce rapport de par 5.

D'autre part, nous obtenons des relaxivités plus faibles que pour le complexe de gadolinium commercial. Cela peut s'expliquer par le fait que le gadolinium possède plus d'électrons non appariés et on a donc des relaxivités plus élevées pour les complexes de gadolinium que pour les complexes de manganèse.[260]

### IV.2.3 Relargage du manganèse

Afin de nous assurer que les relaxivités que nous obtenions n'étaient pas dues à des ions manganèse en solution, nous avons analysé les quantités de manganèse relargué par nos sondes au cours du temps (la méthode est détaillée dans l'annexe B.1.2, page 106). Pour cela, nous avons incubé des triplicats d'échantillons dans du milieu de culture cellulaire à 37°C pendant 3 et 7 jours. Nous avons ensuite utilisé un dosage colorimétrique du manganèse mis au point par Serrat.[261] Cette méthode repose sur une réduction de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) par les ions  $Mn^{2+}$  qui induit la formation d'un composé jaune dont l'absorbance est mesurée à 460 nm (FIG. IV.12(a)). Nous avons d'abord établi une courbe d'étalonnage pour déterminer la gamme de concentration mesurable ainsi que la valeur du coefficient d'extinction molaire (FIG. IV.12(b)). Nous avons pu déterminer que les concentrations minimales mesurables sont de l'ordre de quelques  $\mu M$ , ce qui correspond pour nos objets au relargage d'un ion  $Mn^{2+}$  par particule, et que le coefficient d'extinction molaire du complexe est de  $21 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

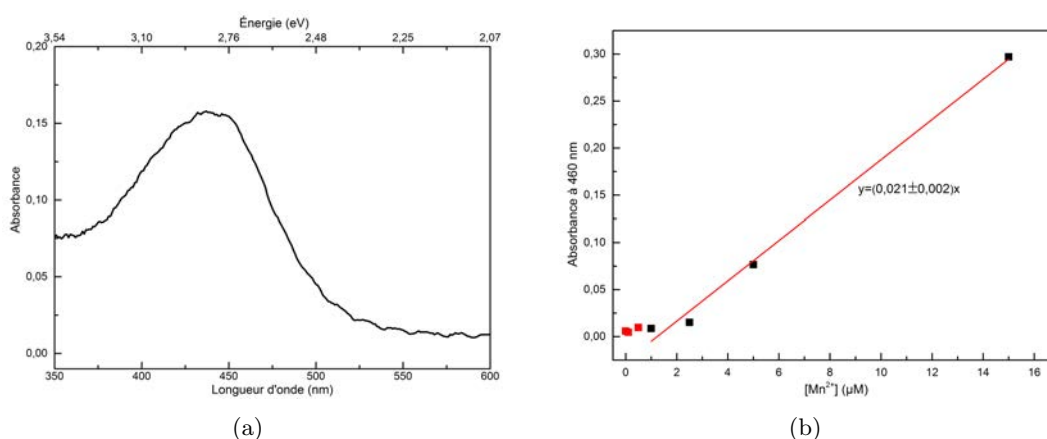


FIGURE IV.12 – Dosage colorimétrique des ions  $Mn^{2+}$  par la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine : (a) Spectre d'absorbance d'une solution contenant des ions  $Mn^{2+}$  après ajout de TMB ; (b) Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en ions  $Mn^{2+}$ .

À partir de ces données, nous avons mesuré la concentration en manganèse libre dans

nos solutions. Pour cela, les quantum dots et les protéines du milieu de culture ont été éliminés par ultrafiltration et le dosage a été réalisé sur les solutions résultantes. Des taux de relargage de  $1,3 \pm 0,8\%$  (3 jours) et  $2,6 \pm 0,9\%$  (7 jours) ont été mesurés, ce qui correspond à environ 1 à 3 manganèse par quantum dots. Les relaxivités mesurées proviennent bien donc seulement du manganèse inclus dans les nanoparticules. De plus, le faible taux de relargage devrait limiter la toxicité de nos sondes et favoriser la colocalisation des signaux de fluorescence et IRM.

#### IV.2.4 Cytotoxicité

Avant d'utiliser nos sondes *in vivo*, nous avons étudié leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules HeLa en utilisant un test MTT.[262, 263] Ce test est basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (jaune) en formazan (violet) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. Ainsi, le taux de MTT converti dépend linéairement du nombre de cellules vivantes et une mesure de l'absorbance permet de remonter au nombre de cellules vivantes et à leur métabolisme. Dans notre cas, les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37°C dans du milieu de culture contenant des concentrations variables de quantum dots jusqu'à 10  $\mu\text{M}$  (tous les échantillons ont été testés trois fois) après quoi le milieu est éliminé. Les cellules sont alors rincées avec un tampon phosphate salin (PBS) et on ajoute une solution de Triton®X-100 dans de l'isopropanol pour dissoudre les cellules et dissoudre le formazan. Après 30 minutes pour permettre la bonne dissolution des cristaux de formazan, l'absorbance est mesurée à 550 nm.

La figure IV.13 présente le résultat des mesures pour des quantum dots avec et sans manganèse incubés pendant 24 heures avec les cellules HeLa. Comme attendu car le manganèse n'est pas relargué, la présence de manganèse ne modifie pas la cytotoxicité des sondes. Pour des concentrations allant jusqu'à 1  $\mu\text{M}$ , le taux de viabilité reste supérieure à 80 %, ce qui montre la faible toxicité de nos sondes. À titre de comparaison, d'autres quantum dots montrent une toxicité plus grande : la concentration inhibitrice médiane ( $\text{CI}_{50}$ )<sup>1</sup> est ainsi de 45 nM pour des CdSe/ZnS,[264] 100 nM pour des CdTe/ZnS[265] ou des InAs/InP/ZnS.[96] La faible cytotoxicité de nos objets peut s'expliquer par la bonne passivation par une couche épaisse de sulfure de zinc et par le faible relargage des ions  $\text{Mn}^{2+}$ .

Si les mesures de cytotoxicité sont indispensables, elles ne renseignent pas sur la toxicité des nanoparticules *in vivo* qui dépend de la voie d'administration, de la biodistribution, des doses dans les différents organes ainsi que des possibles voies d'élimination.[266,

---

1. c'est la concentration pour laquelle la viabilité cellulaire vaut 50 %

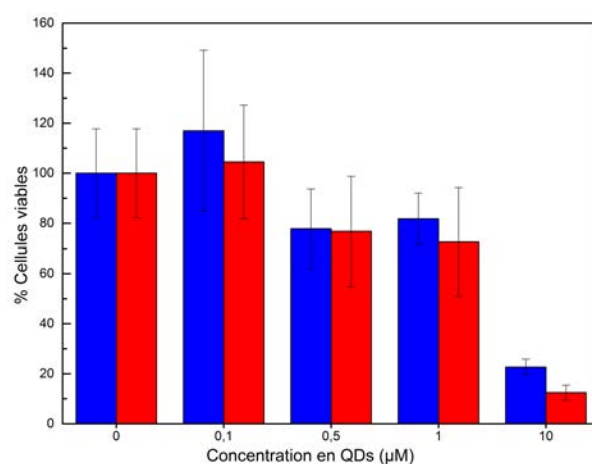


FIGURE IV.13 – Mesure du taux de cellules viables après exposition pendant 24 heures à des quantum dots ZnCuInSe/ZnS (bleu) et ZnCuInSe/Zn<sub>0,86</sub>Mn<sub>0,14</sub>S (rouge)

267] Il a par exemple été montré que l’injection intraveineuse de quantum dots CdSe/CdS/ZnS chez un primate n’entraînait pas l’apparition de signes de toxicité même à haute dose.[268] On peut donc estimer que nos sondes, qui montre une plus faible cytotoxicité que les sondes à base de cadmium, devraient donc se révéler moins toxiques *in vivo*.

### IV.3 Une application *in vivo* : la détection du ganglion lymphatique

Après avoir évalué les performances de nos sondes *in vitro*, nous avons voulu montrer qu’elles pouvaient être utilisées *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi une application simple : la détection du ganglion lymphatique régional. Ces travaux ont été réalisés grâce à nos partenaires : Marine Beaumont du Centre d’Investigation Clinique et d’Innovation Technologique du CHU Nancy (CIC-IT) pour la partie IRM ; Lina Bezdetnaya et Frédéric Marchal de l’Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL) pour l’imagerie de fluorescence. Cependant, avant d’essayer d’utiliser nos sondes *in vivo*, nous avons d’abord vérifié que le signal obtenu en IRM sur l’imageur du CIC-IT qui sera utilisée par la suite était suffisant. Nous avons donc réalisé des images de tubes contenant des solution de quantum dots de concentration variable (FIG. IV.14). Lorsque la concentration en agent de contraste augmente, on observe bien un éclaircissement du signal obtenu caractéristique d’une réduction du temps de relaxation longitudinale de la solution.

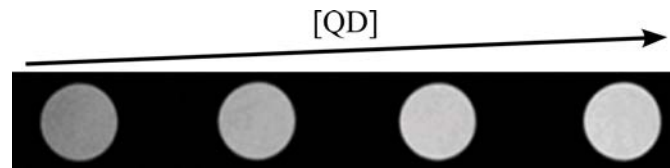


FIGURE IV.14 – Images IRM pondérées en  $T_1$  de tubes contenant des solutions de quantum dots de concentration variable.

Dans le cas d'une personne atteinte de cancer (principalement dans le cas de cancer du sein), la détection de ce que l'on appelle le ganglion lymphatique sentinelle (GLS) est une étape importante du diagnostic. Le GLS est le premier ganglion dans le réseau lymphatique drainé après la tumeur. À l'heure actuelle, son repérage est assuré par une combinaison de scintigraphie et d'une détection visuelle. Dans ce cas, les marqueurs sont des radiocolloïdes à base de technétium 99 métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ) pour la scintigraphie et un colorant bleu (bleu patenté V en France et bleu d'isosulfan aux États-Unis) pour la détection visuelle.[269] Les marqueurs sont injectés au niveau de la tumeur et migrent vers le GLS où ils sont captés par les macrophages. Le GLS peut ainsi être résecté et analysé, principalement pour détecter la présence de métastases. Ces marqueurs posent plusieurs problèmes : exposition à des rayons ionisants, nécessité d'avoir un service de médecine nucléaire et d'hospitaliser le patient (le radiocolloïde est en général injecté la veille de l'intervention) pour ce qui concerne la scintigraphie ; réactions allergiques et marquage de la peau pour les colorants bleus.[270, 271] Afin de s'affranchir de ces limitations, l'utilisation de sondes bimodales IRM/fluorescence semble une option intéressante : l'IRM permettra la détection à large échelle tandis que la fluorescence permettra de guider l'intervention chirurgicale.

Comme preuve de principe de l'utilisation de nos sondes *in vivo*, nous avons essayé de montrer qu'elles peuvent permettre la détection d'un ganglion lymphatique chez la souris. Dans le cas de sujets sains, lorsque des quantum dots sont injectés en sous-cutané, ils migrent simplement dans les vaisseaux lymphatiques vers le ganglion le plus proche et sont captés par lui.[272] Nous avons donc vérifié si nos sondes se comportaient de la sorte et permettaient la détection en IRM et en imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge. Nous avons donc injecté 4 nmol de  $\text{ZnCuInSe}/\text{Zn}_{0,86}\text{Mn}_{0,14}\text{S}$  dans la patte d'une souris et nous avons laissé les sondes migrées vers le ganglion. Après environ 15-20 minutes, nous avons pris des images pondérées en  $T_1$  en IRM à 3 T. Les images sont obtenus en utilisant une séquence spin-écho rapide avec les paramètres suivants :

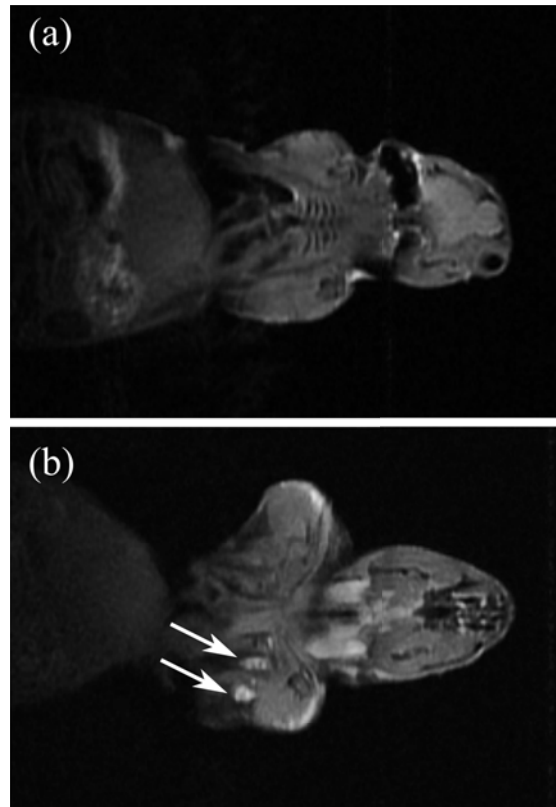


FIGURE IV.15 – Images de souris injectée avec des QDs  $\text{ZnCuInSe}/\text{Zn}_{0,86}\text{Mn}_{0,14}\text{S}$  par résonance magnétique pondérées en  $T_1$  et en fluorescence proche infra-rouge. (a) IRM avant injection ; (b) IRM 20 minutes après injection.

$TE/TR = 12/500\text{ms}^1$ ; largeur de champ :  $120\text{ mm}^2$ ; épaisseur de coupe :  $1\text{ mm}$ . La figure IV.15 présente des coupes obtenues avant (a) et 20 minutes après (b) injection des sondes. On voit apparaître sur l'image après injection deux structures (flèches blanches) qui correspondent aux ganglions axillaires.

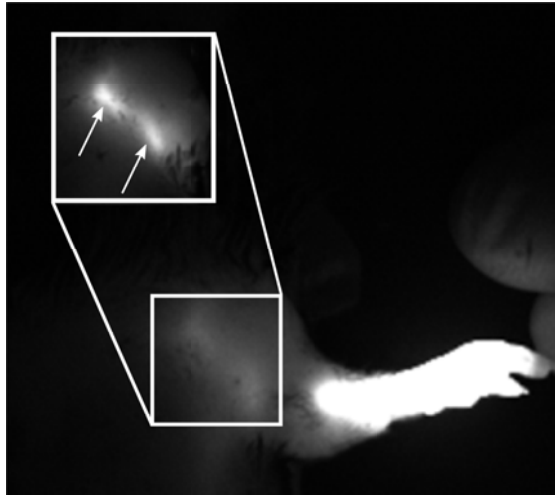


FIGURE IV.16 – Images de fluorescence dans le proche infrarouge obtenues 30 minutes après l'injection. L'insert présente une image de la région d'intérêt en ayant masqué le point d'injection.

Des images de fluorescence dans le proche infra-rouge ont ensuite été réalisées sur la même souris en utilisant un Fluobeam®(Fluoptics, Grenoble). C'est un système comportant un laser d'excitation émettant à  $690\text{ nm}$  et d'une caméra CCD couplée à un filtre passe-haut (en longueur d'onde) ayant une longueur d'onde de coupure de  $750\text{ nm}$ . Des images de la région d'intérêt déterminée en IRM ont été réalisées quelques minutes après la sortie de l'IRM (FIG. IV.16). Sur ces images, on observe un fort signal provenant du point d'injection et un signal plus faible de la zone d'intérêt. En effectuant une image de la zone d'intérêt en masquant le point d'injection (insert), on obtient un meilleur contraste et on peut alors distinguer deux structures (flèches blanches) comme en IRM, qui correspondent aux ganglions axillaires. Ces structures apparaissent un peu diffuses car les images ont été prises sur une souris non ouverte et le signal de fluorescence est donc diffusé par les tissus.

---

1. TE : temps d'écho ; TR : temps de répétition

## Conclusion du chapitre

Les sondes bimodales que nous avons développées ont pu être transférées avec succès dans l'eau grâce à un échange de ligand par un ligand bidentate, le DHLA-PEG. Malgré une perte de fluorescence, les nanoparticules conservent une émission suffisante dans la gamme spectrale d'intérêt (700-1000 nm). Nous avons également vérifié leur stabilité structurale (il n'y a pas de relargage d'ions  $Mn^{2+}$ ). Nous avons examiné l'influence du taux de manganèse sur la relaxivité de ces nanoparticules et déterminé le taux d'incorporation optimal. Si la relaxivité par ion manganèse reste faible par rapport à d'autres types de nanoparticules, la relaxivité par quantum dots est intéressante et atteint  $1500 \text{ mM(QD)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , soit 1,5 fois plus élevée que celle obtenue sur des quantum dots dopés au manganèse par Wang *et al.* Des images obtenues par IRM et imagerie de fluorescence infra-rouge ont également permis de montrer que ces sondes pouvaient être utilisées pour la détection *in vivo* de structures marquées.



# Conclusion et perspectives

L'utilisation de la fluorescence en diagnostic et pour le guidage de la chirurgie est une méthode en pleine expansion. C'est une technique de détection très sensible (on peut détecter des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de picomoles par litre) et ayant une résolution spatiale de l'ordre de quelques micromètres. De plus, cette technique utilise un matériel d'usage flexible et relativement peu onéreux, dans notre cas un détecteur qui combine une source laser et une petite caméra. Elle possède néanmoins quelques limitations notamment en terme de profondeur de pénétration et de résolution *in vivo* qui sont limitées par l'absorption et la diffusion par les tissus. L'utilisation de sondes émettant dans la « fenêtre thérapeutique » (700-1000 nm) permet de passer d'une profondeur de pénétration de quelques millimètres avec des sondes émettant dans le visible à quelques centimètres pour les sondes émettant dans le proche infra-rouge.

Dans ce cadre, notre équipe a développé des synthèses de quantum dots à base de matériaux I-III-VI. Ces synthèses nous ont permis d'obtenir des sondes dont la longueur d'onde d'émission est modulable sur la gamme spectrale d'intérêt en modifiant leur taille et composition. La croissance d'une coque de sulfure de zinc a permis d'isoler les cœurs fluorescents de l'environnement extérieur et donc de protéger leurs propriétés optoélectroniques, notamment en limitant l'oxydation. Comme les autres quantum dots, ces sondes possèdent des sections efficaces d'absorption élevées, des rendements quantiques de l'ordre de 20 % dans l'eau ainsi qu'une bonne photostabilité. L'équipe a démontré, en collaboration avec une équipe de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, que ces sondes permettaient la détection du ganglion lymphatique sentinelle chez des souris atteintes de cancer du sein. Dans ce cas, la fluorescence a été utilisée pour guider la résection de ce ganglion. Si une profondeur de quelques centimètres est suffisante pour faire des images sur toute la profondeur de petits animaux (vers, souris, rat), cela reste insuffisant pour les plus gros animaux. Pour remédier à ce problème, l'une des possibilités est de coupler la détection par fluorescence à une détection par IRM, qui elle ne souffre d'aucune limitation de la profondeur de pénétration. Le couplage de ces deux techniques

nécessite le développement de sondes qui combinent à la fois des propriétés magnétiques pour l'IRM et une émission dans le proche infra-rouge pour la fluorescence.

Nous nous sommes donc basés sur les travaux précédents de l'équipe et nous avons essayé de conférer à nos objets un caractère paramagnétique afin de pouvoir les utiliser comme agent de contraste en  $T_1$  en IRM. Pour cela, nous avons décidé d'introduire des ions  $Mn^{2+}$  paramagnétiques (ils possèdent chacun 5 électrons non appariés) dans la coque de ZnS de nos objets. Afin d'obtenir une grande relaxivité par quantum dot, nous avons souhaité introduire un grand nombre d'ions par particule. Nous avons donc développé une synthèse avec de l'oléate de zinc et de l'éthylxanthate de zinc qui nous permet d'obtenir des coques de quelques nanomètres d'épaisseur, ce qui correspond à des coques environ dix fois plus épaisses que celles rapportées dans la littérature. La microscopie électronique en transmission et la DRX indiquent que cette croissance se fait de manière épitaxiale et permet d'obtenir des rendements quantiques de l'ordre de 50-60 % dans les milieux organiques. L'adaptation de cette synthèse en remplaçant une partie du précurseur de zinc a permis d'obtenir l'inclusion d'ions  $Mn^{2+}$  dans la coque de nos objets. En combinant des analyses en DRX, RPE et ICP-AES, nous avons mis en évidence que le manganèse était bien incorporé dans nos objets et pas simplement présent dans la solution ou adsorbé en surface. De plus, des analyses en spectroscopie de fluorescence montrent que l'inclusion de manganèse dans nos objets ne modifie pas leurs propriétés optiques.

Afin d'évaluer les performances de nos objets *in vitro*, nous avons d'abord dû les solubiliser dans l'eau et nous avons choisi d'utiliser une méthode d'échange de ligands afin de laisser l'eau avoir accès à la surface de nos quantum dots pour augmenter leur relaxivité. Malheureusement, la synthèse de coques que nous avons choisi laisse des ligands fortement liés à la surface en fin de synthèse et l'échange n'était pas réalisable directement. Nous avons donc développé un traitement post-synthèse pour permettre l'élimination de ces ligands forts et ainsi améliorer la qualité de l'échange de ligands. Cette méthode permet donc d'améliorer la stabilité de nos quantum dots dans les milieux aqueux mais entraîne une diminution de la fluorescence. L'évaluation de la relaxivité à 7T en fonction du pourcentage de manganèse présent dans la coque a mis en évidence la présence d'un optimum autour de 20 %. Après avoir étudié la cytotoxicité de ces nanoparticules et montré qu'elle était plus faible que pour d'autres types de quantum dots, nous avons montré que ces sondes pouvaient être utilisées pour marquer et détecter des structures *in vivo*, dans notre cas, des ganglions lymphatiques chez la souris.

Bien que les résultats de cette étude soient encourageants, ce type d'objets possède quelques limites. Ainsi, les relaxivités par rapport à la concentration en manganèse ob-

tenues restent bien inférieures à d'autres nanoparticules semblables présentées dans la littérature, ce qui peut être expliqué en partie par l'épaisseur de la coque obtenue : les ions  $Mn^{2+}$  trop éloignés de la surface ne participent que peu à l'augmentation de la relaxivité. Une étude plus détaillée de l'influence de la distance de ces ions à la surface permettrait sans doute de mieux comprendre quelle répartition serait la plus avantageuse pour l'IRM. D'autre part, à l'heure actuelle, nous devons injecter des quantités assez élevées de nanoparticules à cause de la faible sensibilité en IRM et nous n'avons donc pas de problème de sensibilité en fluorescence pour le moment. Cependant, il pourrait être intéressant de trouver un traitement de surface qui limite la perte de fluorescence. Même si nos objets ne contiennent pas d'éléments présentant une toxicité élevée et sont moins cytotoxiques que d'autres nanoparticules, les larges quantités injectées peuvent poser des problèmes de toxicité et une étude du devenir de ces nanoparticules et de leur toxicité *in vivo* est nécessaire avant le développement de toute application. Enfin, le greffage de fonctions de ciblage sur nos objets sera une étape nécessaire et non triviale du développement de ces objets.

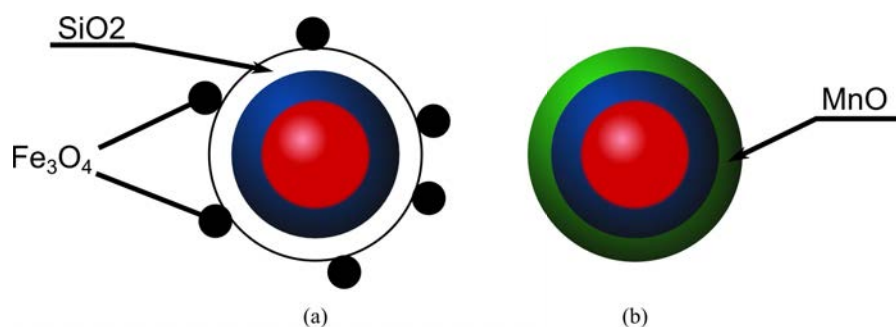


FIGURE IV.17 – Schéma des autres types de nanoparticules envisagées pour l'obtention de sondes fluorescentes et magnétiques.

Pour répondre à plusieurs de ces questions, nous travaillons également au développement de deux autres types de sondes bimodales en couplant des oxydes magnétiques à nos quantum dots. Il a en effet été montré que les nanoparticules d'oxyde de manganèse et d'oxyde de fer de taille inférieure à 3 nm constituaient des agents de contraste en  $T_1$  particulièrement performants. Une des stratégies que nous essayons de développer est la croissance d'une couche de silice autour des quantum dots Zn-Cu-In-(S,Se)/ZnS qui sera ensuite décorée par des nanoparticules de magnétite (FIG. IV.17(a)). En mettant plusieurs nanoparticules de magnétite par objet, nous devrions augmenter la surface d'oxyde magnétique par particule et obtenir des relaxivités plus élevées. Cette stratégie fournit certes des objets plus gros que les nôtres mais la présence d'oxyde

( $\text{SiO}_2$  et  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en surface permettra également une fonctionnalisation plus aisée et surtout plus stable. En effet, une des stratégies adoptées pour la fonctionnalisation des nanoparticules de silice et d'oxydes de fer consiste à greffer de façon covalente des silanes couplés à des fonctions de ciblage en surface. L'autre stratégie que nous essayons de développer actuellement consiste à faire croître une couche d'oxyde magnétique ( $\text{MnO}$  ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sur des quantum dots  $\text{Zn-Cu-In-(S,Se)/ZnS}$  (FIG. IV.17(b)). Cette géométrie cœurs/coques/coques permet d'obtenir des sondes de plus petites tailles que les objets précédemment décrit. Là encore, la couche d'oxyde en surface permettra également de protéger les quantum dots et une fonctionnalisation plus facile et plus stable que dans le cas des quantum dots « simples ». Dans le cas de cette dernière géométrie, les applications ne se limiteraient pas aux seules applications en imagerie. En modifiant le type d'oxyde déposé et le type de quantum dots au cœur, nous pourrions obtenir des objets intéressants pour d'autres applications en photocatalyse ( $\text{CdS/ZnO}$  ;  $\text{ZnS/TiO}_2$ ) ou en photovoltaïque ( $\text{CuInS}_2/\text{TiO}_2$ ).

# Annexe A

## Synthèses

### Sommaire

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>A.1 Synthèse des cœurs</b> . . . . .                                 | <b>94</b>  |
| A.1.1 Synthèse de cœurs Zn-Cu-In-S . . . . .                            | 94         |
| A.1.2 Synthèse des cœurs ZnCuInSe . . . . .                             | 95         |
| <b>A.2 Synthèse des coques</b> . . . . .                                | <b>97</b>  |
| A.2.1 Synthèse des précurseurs pour les coques . . . . .                | 97         |
| A.2.2 Synthèse des coques de $Zn_{1-x}Mn_xS$ . . . . .                  | 98         |
| <b>A.3 Échange de ligands</b> . . . . .                                 | <b>100</b> |
| A.3.1 Synthèse du DHLA-PEG1000 . . . . .                                | 100        |
| A.3.2 Traitement de surface des nanoparticules . . . . .                | 101        |
| A.3.3 Méthode de l'échange . . . . .                                    | 102        |
| <b>A.4 Méthodes de purification de nanoparticules hydrosolubles</b> . . | <b>102</b> |
| A.4.1 L'ultrafiltration . . . . .                                       | 102        |
| A.4.2 L'ultracentrifugation . . . . .                                   | 103        |

---

Dans ce chapitre, nous détaillons l'ensemble des synthèses qui nous ont été utiles. Il comporte :

- la synthèse de cœurs de I-III-VI,
- la synthèse des précurseurs utiles à la croissance des différents types de coques,
- les différentes méthodes mises en œuvres pour la synthèse des coques,
- la synthèse des différents ligands qui ont été utilisés,
- les différentes méthodes de purification des sondes solubles dans l'eau.

Les quantum dots et leur précurseurs sont extrêmement sensibles à l'oxydation. Les synthèses sont donc réalisées sur des rampes à vide équipées d'une double tubulure : une pour le vide et une pour un gaz inerte, dans notre cas de l'argon.

## A.1 Synthèse des cœurs

Durant cette étude, nous avons utilisé deux types de cœurs à base de  $\text{CuInS}_2$  et  $\text{CuInSe}_2$ . Il a été montré que l'inclusion de zinc dans ce type d'objets permet d'obtenir des rendements quantiques plus élevés. Pour des raisons pratiques et bien que la stoechiométrie ne soit pas respectée, nous les noterons par la suite Zn-Cu-In-S et Zn-Cu-In-Se. Les deux synthèses sont basées sur un mélange de précurseurs qui va être décomposé à haute température.

### A.1.1 Synthèse de cœurs Zn-Cu-In-S

La synthèse des cœurs de Zn-Cu-In-S est basée sur une synthèse développée par l'équipe de Peter Reiss[174] et adaptée au laboratoire par Thomas Pons, Elsa Cassette *et al.*[1] Elle nécessite un précurseur de cuivre (I), l'iodure de cuivre ( $\text{CuI}$ ), un précurseur d'indium, l'acétate d'indium ( $\text{In}(\text{OAc})_3$ ), un précurseur de zinc, l'acétate de zinc ( $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ ) et un précurseur de soufre, le dodécane-thiol (DDT), qui va également servir de ligands et de solvant.

**Protocole** Pour cette synthèse, on introduit dans un ballon tricol de 50 ml :

| Réactifs         | M (en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) | Quantité (en mmoles) | Masse pesée (en mg) |
|------------------|--|----------------------|---------------------|
| CuI              | 190,45                                 | 1                    | 190                 |
| $\text{InOAc}_3$ | 291,95                                 | 1                    | 292                 |
| $\text{ZnOAc}_2$ | 183,48                                 | 0,1                  | 18                  |
| DDT              | 202,40 ( $\rho = 0.85$ )               | 20,9                 | 5 ml                |

La solution est dégazée pendant 30 minutes à  $40^\circ\text{C}$  pour éliminer les traces d'eau et d'oxygène dans le solvant. Après avoir passé le ballon sous argon, la solution est chauffée à  $120^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes pour permettre la solubilisation des différents composés sous forme de complexes de type  $\text{CuIn}(\text{DDT})_x$ [177, 273] et on obtient une solution jaune pâle translucide. La solution est ensuite chauffée à  $220^\circ\text{C}$  et change de couleur, passant du

jaune à l'orange puis au rouge. On obtient finalement une solution marron/noire suivant la longueur d'onde d'émission souhaitée (FIG. A.1). Il faut environ 15 minutes pour atteindre des longueurs d'onde d'émission de l'ordre de 780nm. Au-delà de cette valeur, les cœurs ont tendance à précipiter sans doute à cause de leur taille et du déficit en DDT. Après avoir refroidi rapidement le ballon, la solution est récupérée et les nanoparticules sont lavées par trois cycles de précipitation (avec de l'éthanol, EtOH)/redispersion (dans de l'hexane). Les particules sont finalement collectées dans un volume connu d'hexane, typiquement 10 ml et stockées dans un pilulier.

### A.1.2 Synthèse des cœurs ZnCuInSe

Cette synthèse est inspirée de la synthèse développée par Elsa Cassette durant sa thèse,[2] elle-même inspirée d'une synthèse de Koo *et al.*[175] Elle est très semblable à la précédente pour laquelle les précurseurs de cuivre et d'indium sont différents puisque nous utilisons cette fois-ci des chlorures, pour le cuivre comme pour l'indium. Le sélénium provient lui de la sélénourée (SeU).

**Protocole** Pour cette synthèse, on introduit dans un ballon tricol de 100 ml :

| Réactifs           | M (en g.mol <sup>-1</sup> ) | Quantité (en mmoles) | Masse pesée (en mg) |
|--------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| CuCl               | 190,45                      | 1                    | 190                 |
| InCl <sub>3</sub>  | 291,95                      | 1                    | 292                 |
| ZnOAc <sub>2</sub> | 183,48                      | 2                    | 367                 |
| SeU                | 123                         | 2                    | 246                 |
| DTT                | 202,40 ( $\rho = 0.85$ )    | 20,9                 | 5 ml                |
| OAm                | 267,49 ( $\rho = 0.81$ )    | 30                   | 10 ml               |
| TOP                |                             |                      | 10ml                |
| ODE                |                             |                      | 25ml                |

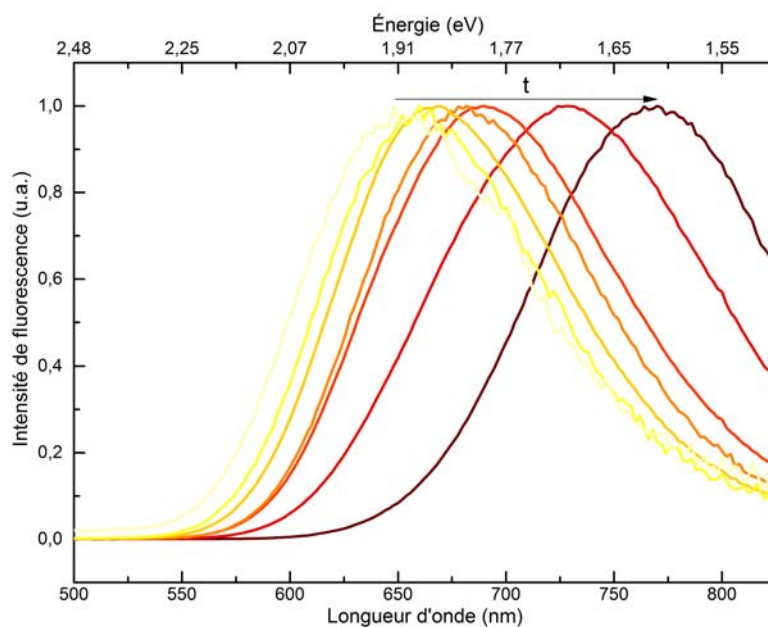
La solution est dégazée pendant 30 minutes à 40°C. Après passage du ballon sous atmosphère inerte, la solution rose est chauffée à 230°C. Vers 80°C, la solution devient translucide avant de se colorer rapidement en jaune puis orange, rouge et enfin marron/noir. La solution est laissée à 230°C jusqu'à atteindre la longueur d'onde d'émission désirée. Il faut attendre environ 60 min pour atteindre des longueurs d'onde de l'ordre de 820 nm. La figure A.2 présente les spectres d'émission au cours d'une synthèse. Après



(a)



(b)



(c)

FIGURE A.1 – Photographies d'échantillons prélevés au cours de la synthèse d'échantillons avec (b) et sans (a) illumination dans l'UV. Spectres d'émission de prélèvements effectués au cours d'une synthèse de cœur ZnCuInS.

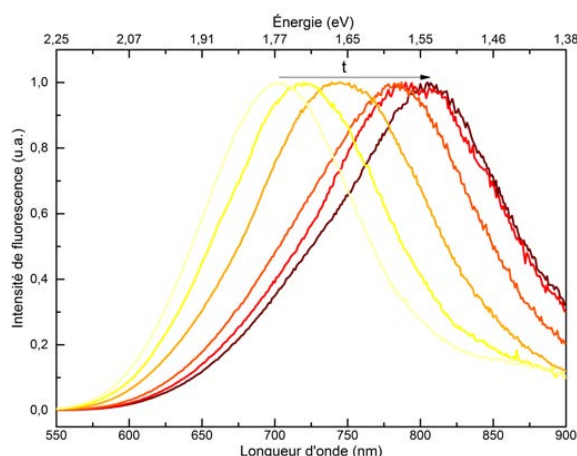


FIGURE A.2 – Spectres d'émission de prélevements effectués au cours d'une synthèse de cœur ZnCuInSe

avoir refroidi rapidement le ballon, la solution est récupérée et les nanoparticules sont lavées par trois cycles de précipitation (avec EtOH)/redispersion (dans de l'hexane). Les particules sont finalement collectées dans un volume connu d'hexane, typiquement 10 ml et stockées dans un pilulier.

## A.2 Synthèse des coques

Nous détaillons ici la synthèse de coques mise au point durant cette étude qui repose sur l'injection à 200°C de deux solutions l'une contenant un précurseur de zinc et de soufre, l'éthylxanthate de zinc, et l'autre contenant un mélange d'oléate de zinc et d'acétate de manganèse pour atteindre la composition souhaitée. Les précurseurs de zinc n'étant pas disponibles commercialement, nous détaillons également leur synthèse.

### A.2.1 Synthèse des précurseurs pour les coques

**L'oléate de zinc** Le Zn(OA)<sub>2</sub> est préparé en dissolvant séparément 20 mmol de nitrate de zinc hexahydrate ( $M = 297,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $m = 5,94 \text{ g}$ ) dans 40 mL de méthanol et 40 mmol d'oléate de sodium ( $M = 304,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $m = 12,2 \text{ g}$ ) dans 200 mL de méthanol. Lorsque les deux solutions sont limpides, on ajoute lentement la solution de nitrate de zinc dans la solution d'oléate de sodium. Un précipité blanc se forme alors puis est récupéré et lavé à l'aide d'un büchner. Le précurseur est ensuite séché quelques jours sous vide avant d'être utilisé.

**L'éthylxanthate de zinc** Le  $\text{Zn}(\text{EtX})_2$  est préparé suivant la synthèse proposée par Protière et Reiss.[197] Pour cette synthèse, 10mmol de chlorure de zinc et 20mmol de potassium ethylxanthogénate sont séparément dissous dans 20mL d'eau distillée. Ces deux solutions sont ensuite lentement mélangées sous agitation pour obtenir un précipité blanc qui sera isolé et lavé sur filtre büchner. Le  $\text{Zn}(\text{EtX})_2$  est alors séché à l'étuve pendant une nuit puis quelques jours sous vide avant d'être utilisé.

### A.2.2 Synthèse des coques de $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$

Cette synthèse est donc basée sur l'injection de deux solutions, l'une contenant le précurseur de soufre (qui est également un précurseur de zinc) et l'autre contenant des précurseurs de manganèse et de zinc dans des proportions variables. On injecte 5 mmol d'un mélange stœchiométrique de cations ( $\text{Zn}+\text{Mn}$ ) et de soufre. Chaque éthylxanthate de zinc apporte un atome de zinc pour deux atomes de soufre : on va donc injecter une solution contenant 2,5 mmoles d'éthylxanthate de zinc et une solution contenant 2,5 mmoles de cations, en jouant sur les proportions d'oléate de zinc et d'acétate de manganèse pour atteindre les taux d'injection souhaités.

**Calcul de la composition de la solution de cations** La quantité de cations à injecter est 5 mmoles. Pour atteindre la composition  $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$ , il faut donc injecter  $5 \cdot x$  mmoles d'acétate de manganèse et  $5 \cdot (1-x)$  mmoles de zinc. Sur cette quantité de zinc, 2,5 mmoles proviennent de l'éthylxanthate de zinc. Il faut donc injecter  $5 \cdot (1-x) - 2,5 = 2,5 - 5 \cdot x$  mmoles d'oléate de zinc dans notre solution. Le tableau A.1 récapitule la composition pour les différents échantillons synthétisés.

△ Les masses de  $\text{ZnOA}_2$  ( $M = 628,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sont indiquées en grammes alors que celles de  $\text{MnOAc}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $M = 245,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sont indiquées en mg

TABLE A.1 – Tableau récapitulatif de la composition de la solution d'injection de cations

| $x$ en %                      | 0    | 1    | 2    | 5    | 10   | 20   | 30   |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| $n_{\text{ZnOA}_2}$ (mmoles)  | 2,5  | 2,45 | 2,4  | 2,25 | 2    | 1,5  | 1    |
| $m_{\text{ZnOA}_2}$ (g)       | 1,57 | 1,54 | 1,51 | 1,41 | 1,26 | 0,94 | 0,63 |
| $n_{\text{MnOAc}_2}$ (mmoles) | 0    | 0,05 | 0,1  | 0,25 | 0,5  | 1    | 1,5  |
| $m_{\text{MnOAc}_2}$ (mg)     | 0    | 12   | 25   | 61   | 123  | 245  | 368  |

**Préparation des solutions** Il y a donc trois solutions à préparer : une contenant les cations ( $\text{ZnOA}_2$  et  $\text{MnOAc}_2$ ), que nous appellerons solution cation, une autre contenant l'éthylxanthate de zinc, que nous appellerons solution anion et une contenant les cœurs dans laquelle nous injecterons les deux autres.

**Solution cation** La solution de cations contient 2,5 mmoles de cations dans les proportions données dans le tableau A.1 dissouts dans un mélange d'ODE (8 ml) et OAm (2 ml) (l'oleylamine permet de faciliter la solubilisation de l'oléate de zinc). Pour éviter les problèmes d'oxydation du manganèse lors de l'ajout des solvants, [210, 211] nous avons utilisé la méthode de préparation mise au point par Yang *et al.* [213] Dans un ballon tricol de 50 ml, on introduit l'oléate de zinc, l'ODE et l'oleylamine. La solution est dégazée pendant 10 minutes à  $120^\circ\text{C}$  sous pression réduite. À cette température, on atteint la température d'ébullition de l'oleylamine sous une pression de 0,1 mbar, proche des valeurs atteintes sur nos rampes de synthèse. Cette étape permet donc l'élimination de l'eau et de l'oxygène dissout qui pouvait provoquer l'oxydation du manganèse (II) en manganèse (III). Après refroidissement de la solution (jaune à ce moment de la synthèse), on ajoute l'acétate de manganèse, la solution vire au orange et on dégaze de nouveau la solution à  $120^\circ\text{C}$  sous pression réduite. Après refroidissement de la solution, on prépare une seringue.

⚠ Cette solution se conserve mal et est préparée juste avant l'injection.

**Solution anion** Pour cette solution, on introduit 2,5 mmoles de d'éthylxanthate de zinc dans un pilulier et on ajoute 7 ml d'ODE et 3 ml d'oleylamine. La solution est mise sous agitation jusqu'à dissolution (environ 30 minutes). On obtient une solution laiteuse avec laquelle on prépare une seconde seringue.

**Injection** Dans un ballon tricol de 100 ml, on introduit 1/10 de la synthèse de cœurs de  $\text{ZnCuInS}$  ou  $\text{ZnCuInSe}$  et 10 ml d'ODE. La solution est dégazée pendant 30 minutes à  $40^\circ\text{C}$  pour éliminer l'hexane (qui provient de la solution de cœurs) et les traces d'oxygène et d'eau. Après passage sous atmosphère inerte, la solution est portée à une température de  $200^\circ\text{C}$ . Une fois cette température atteinte les deux solutions sont injectées simultanément en 2 heures ( $5 \text{ ml.h}^{-1}$ ). À la fin de l'injection, la solution est refroidie et les nanoparticules sont lavées par des cycles de précipitation (avec un mélange méthanol/éthanol,  $\text{MeOH/EtOH}$ )/redispersion (avec hexane). Les quantum dots sont finalement dispersés dans un volume connu d'hexane et peuvent être conservés pendant plusieurs mois.

## A.3 Échange de ligands

Pour solubiliser nos nanoparticules dans l'eau, nous avons décidé d'utiliser une méthode d'échange de ligands dans laquelle les ligands hydrophobes de fin de synthèse sont remplacés par un ligand hydrophile : le DHLA-PEG1000, qui est obtenu en couplant une molécule d'acide dihydrolipoïque (DHLA) à de la Jeffamine® M-1000, une chaîne PEGylée avec une amine primaire à une extrémité et un groupement methoxy à l'autre extrémité. Malheureusement, l'échange sur les nanoparticules obtenues n'est pas performant et un traitement est nécessaire avant échange.

### A.3.1 Synthèse du DHLA-PEG1000

Avant d'expliquer le traitement infligé à nos particules avant l'échange et le protocole de l'échange, nous allons détailler la synthèse du ligand, proposée par Uyeda *et al.* en 2005.[274] Ce ligand est obtenu en deux étapes : d'abord par un couplage peptidique entre l'acide thioctique et la Jeffamine® M-1000, un polymère composé de 19 monomères d'oxyde d'éthylène (EO) et 3 de monomères d'oxyde de propylène (PO) distribués statistiquement ; puis par réduction du pont disulfure par le borohydrure de sodium.

**Protocole** Le tableau A.2 présente les différents réactifs utilisés durant cette synthèse.

TABLE A.2 – Précurseurs utilisés

| Nom du produit                          | Notation          | Formule   | M (g.mol <sup>-1</sup> ) |
|---|-------------------|---|--------------------------|
| Jeffamine® M-1000                       | PEG1000           | H <sub>3</sub> C-EO <sub>19</sub> - <i>st</i> -PO <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub> | 1000                     |
| Acide thioctique                        | TA                | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>                    | 206,22                   |
| 4-( <i>N,N</i> -diméthylamino)-pyridine | DMAP              | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>                                   | 122,17                   |
| <i>N,N'</i> -dicyclohexycarbodiimide    | DCC               | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>                                  | 206,33                   |
| Borohydrure de sodium                   | NaBH <sub>4</sub> | NaBH <sub>4</sub>   | 37,83                    |

**Couplage TA-Jeffamine® M-1000** 20 g de PEG1000 (20 mmol, 1 eq), 1,22 g de DMAP (10 mmol, 0,5 eq), 4,13 g de DCC (20 mmol, 1 eq) et 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont mélangés dans un ballon de 500 mL. Le tout est agité à 0 °C dans un bain de glace sous argon pendant 15 minutes. 4,12 g de TA (20 mmol, 1 eq), dissout dans 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'un pousse seringue en 30 minutes ( (30 mL.h<sup>-1</sup>).

Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 h à 0°C, puis il est lentement réchauffé à température ambiante, et laissé sous agitation toute la nuit sous argon.

Le mélange est filtré sur papier filtre pour éliminer l'urée. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif (25 °C, 350 mbar), le mélange réactionnel est dilué avec 100 mL d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et le produit brut est extrait par 3x100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques extraites sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et filtrées, puis le solvant est évaporé (60 °C, 350 mbar). Le produit brut est purifié sur colonne chromatographique sur gel de silice, suivie en chromatographie sur couche mince (CCM), avec d'abord un mélange éluant acétate d'éthyle :hexane (90 :10 v/v) pour éliminer rapidement un premier sous-produit et ensuite avec un mélange éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> :MeOH (90 :10 v/v) pour éliminer le PEG1000 libre afin d'obtenir une huile jaune (rendement ≈ 60 %). La CCM du produit avec un éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> :MeOH (90 :10 v/v) donne R<sub>f</sub> ≈ 0,55.

**Réduction du pont disulfure** 1 g de TA-M1000 (0,83 mmol, 1 eq) est redispersé dans un mélange de 3 mL de MeOH et de 6 mL de H<sub>2</sub>O dans un ballon de 50 mL. Le tout est agité sous argon et refroidi à 0°C dans un bain de glace. 62,8 mg de NaBH<sub>4</sub> (1,66 mmol, 2 eq) sont dissous dans 6 mL de H<sub>2</sub>O. La solution est injectée lentement dans le mélange réactionnel, qui est laissé sous agitation pendant 2 h à 0 °C puis 1 h à température ambiante.

Le mélange est extrait par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et filtrées, puis le solvant est évaporé pour obtenir une huile transparente (rendement ≈ 81 %).

### A.3.2 Traitement de surface de nos nanoparticules

#### ZnCuIn(S,Se)/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S

Nous avons utilisé une méthode qui consiste à déposer une couche de soufre puis une couche de zinc tout en contrôlant les ligands présents en surface. Cette méthode se base sur un protocole mis au point au laboratoire par Benoit Mahler, Brice Nadal *et al.* pour la croissance de coque de sulfure de zinc sur des nanoplaquettes.[198]

Typiquement, 1/10 de la solution obtenue lors de la croissance de coque est dispersé dans 1 ml de chloroforme. On ajoute ensuite une solution contenant 40 mg de thioacétamide (TAA) dissouts dans 1 ml de chloroforme. La solution ainsi obtenue est mise à l'étuve à 60°C pendant une nuit. Cette étape, durant laquelle le solvant est évaporé, permet le dépôt d'une couche de soufre sur nos particules. L'excès de réactif est éliminé en redispersant les nanoparticules dans du chloroforme et en les précipitant avec

EtOH. Elles sont ensuite reprises dans 2 ml de chloroforme. On ajoute 60 mg d'oléate de zinc à cette solution et le mélange est placé à l'étuve pendant 2 heures. L'excès de réactif est de nouveau éliminé en précipitant les nanoparticules avec EtOH et en éliminant le surnageant. Elles sont ensuite reprises dans 2 ml de chloroforme. Cette étape permet de remplacer les octylammonium présents en surface par une couche de zinc et des ligands oléate.

### A.3.3 Méthode de l'échange

Aux particules précédemment obtenues, on ajoute 400 mg de DHLA-PEG1000 et 20 mg de borohydrure de tétra-*n*-butylammonium pour s'assurer de la bonne réduction du TA en DHLA. Après une nuit à l'étuve à 60°C, les particules sont dissoutes dans 1 ml de chloroforme. On ajoute ensuite lentement de l'hexane : un précipité blanc se forme. En agitant la solution, le précipité se dissout et on continue d'ajouter lentement de l'hexane jusqu'à ce que le précipité ne puisse plus être dispersé. Si jamais on ajoute trop d'hexane, les deux phases se démixent. L'ajout d'éthanol en faible quantité permet de récupérer une phase continue. Durant cette étape, on diminue la polarité du solvant jusqu'à ce que les nanoparticules précipitent tandis que le ligand libre est toujours soluble. Une centrifugation permet d'éliminer l'excès de ligands libres. Les nanoparticules sont alors récupérées dans l'eau et purifiées.

## A.4 Méthodes de purification de nanoparticules hydrosolubles

Nous utilisons principalement deux méthodes pour la purification de nos nanoparticules lorsqu'elles sont solubles dans l'eau : l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation.

### A.4.1 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique qui a été mise au point pour la purification de protéines. Elle permet d'éliminer les petites molécules (notamment des sels et les particules d'eau) : elle permet donc la concentration de solution de nanoparticules. Elle consiste à faire passer la solution contenant les particules à purifier à travers une membrane « passe-bas », c'est-à-dire qui va retenir les molécules et particules plus grosses que le seuil de coupure. Il existe des membranes avec différentes tailles de pores mais nous utilisons essentiellement des seuils de coupure entre 30 kDa et 100 kDa.<sup>1</sup> Puis-

---

1. L'ultrafiltration ayant été développée pour la purification de protéines, les membranes sont indiquées en kilodalton qui est l'unité de prédilection dans ce domaine. 1 dalton équivaut à 1 g.mol<sup>-1</sup>

qu'elle utilise un filtre « passe-bas », cette technique ne permet d'éliminer ni les ligands avec des masses élevées, ni les agrégats de nanoparticules. Pour cela, nous utiliserons l'ultracentrifugation.

#### A.4.2 L'ultracentrifugation

La technique d'ultracentrifugation, développée par Theodor Svedberg (pour laquelle il a reçu le prix nobel en 1926), permet de séparer des nanoparticules suivant leur masse molaire, leur forme et leur taille.[275, 276] D'un point de vue pratique, nous utilisons des gradients de sucrose (typiquement des solutions entre 10 et 40 % en masse) pour séparer nos objets. Lors de l'ultracentrifugation, les objets de masse volumique faible vont rester dans le haut du tube tandis que les objets plus denses vont migrer vers le fond du tube comme indiqué sur le schéma A.3. Les différentes populations peuvent alors récupérées séparément et le sucrose est éliminé par ultrafiltration.

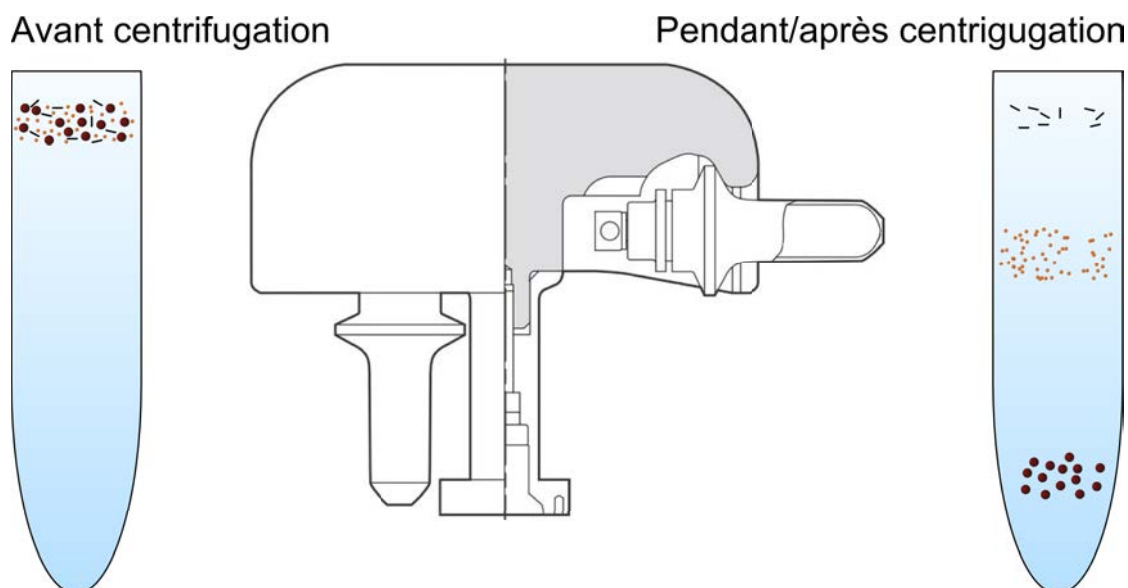


FIGURE A.3 – Schéma de principe de la séparation par ultracentrifugation

D'un point de vue théorique, les différences de coefficient de sédimentation permet la séparation des différentes populations. Dans un tube d'ultracentrifugation, le coefficient de sédimentation,  $S$  s'écrit pour une population donnée :

$$S = M \frac{1 - \bar{v} \rho_{sol}}{\mathcal{N}_A \cdot f}$$

avec  $M$  la masse molaire de l'objet étudié,  $\bar{v}$  son volume spécifique (dans notre cas, l'inverse de sa densité),  $\rho_{sol}$  la densité du solvant,  $\mathcal{N}_A$  la constante d'Avogadro et  $f$  le coefficient de friction, qui dépend de la forme et de la taille de l'objet étudié. Ainsi avec cette technique, il est possible de séparer des objets suivant leur taille (dont  $M$  et  $f$  dépendent) et leur forme (dont  $f$  dépend). Il est aussi possible de séparer des objets par leur masse volumique. Lorsque la masse volumique de l'objet est égal à la masse volumique du solvant, le coefficient de sédimentation est nulle : la particule cesse de migrer.

# Annexe B

## Caractérisations

### Sommaire

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>B.1 Absorbance</b> . . . . .                               | <b>106</b> |
| B.1.1 Mesure de la concentration en nanoparticules . . . . .  | 106        |
| B.1.2 Relargage du Manganèse . . . . .                        | 106        |
| B.1.3 Fluorescence . . . . .                                  | 108        |
| B.1.4 Rendement quantique . . . . .                           | 111        |
| <b>B.2 Microscopie électronique en transmission</b> . . . . . | <b>113</b> |
| <b>B.3 Diffraction des rayons X</b> . . . . .                 | <b>113</b> |
| B.3.1 Détermination de la taille des cristaux . . . . .       | 113        |
| B.3.2 Détermination de la composition d'un alliage . . . . .  | 114        |
| <b>B.4 Analyse élémentaire</b> . . . . .                      | <b>114</b> |
| B.4.1 Analyse dispersive en énergie (EDX) . . . . .           | 114        |
| B.4.2 Spectrométrie par torche à plasma . . . . .             | 116        |
| <b>B.5 Relaxivité</b> . . . . .                               | <b>116</b> |
| B.5.1 Principe de la mesure . . . . .                         | 116        |
| B.5.2 Réalisation de la mesure . . . . .                      | 117        |
| <b>B.6 Résonance Paramagnétique Électronique</b> . . . . .    | <b>118</b> |
| B.6.1 Principe de la RPE . . . . .                            | 118        |
| B.6.2 Mesure de spectre de RPE . . . . .                      | 119        |
| <b>B.7 Propriétés magnétiques</b> . . . . .                   | <b>119</b> |

---

Dans cette annexe, nous expliquons les principes et la préparation des échantillons pour les différentes techniques de caractérisation mises en œuvre lors de cette étude.

## B.1 Absorbance

Les mesures d'absorbance ont été réalisées sur un spectrophotomètre ultraviolet (UV)-visible (Vis)-proche infrarouge (NIR) Varian Cary-5E équipé d'une lampe halogène pour la gamme 350-3300 nm et d'une lampe au deutérium pour la gamme 175-350 nm. Nous sommes équipés d'un spectromètre une voie et il est donc nécessaire d'établir la ligne de base avec le solvant et la cuvette utilisés avant toute mesure. Les échantillons sont placés dans une cuve en quartz : 3 ml pour les échantillons pour lesquels nous disposons d'une quantité suffisante et 600  $\mu$ l pour les autres. Ces cuves présentent une absorption limitée sur la gamme UV-Vis-NIR. Les spectres sont acquis avec un pas d'un nanomètre.

### B.1.1 Mesure de la concentration en nanoparticules

Les mesures d'absorbance sont particulièrement utiles pour mesurer des concentrations. En effet, la loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance  $A$  d'une solution à sa concentration en fluorophores  $C_{fluo}$  selon :

$$A = \epsilon_{fluo}^{\lambda} \cdot l \cdot C_{fluo}, \quad (\text{B.1})$$

avec  $l$  la longueur de l'échantillon et  $\epsilon_{fluo}^{\lambda}$  le coefficient d'extinction molaire du fluorophore qui dépend du matériau et de la taille des nanoparticules à analyser ainsi que de la longueur d'onde. Il n'existe pas de moyen simple pour déterminer le coefficient d'extinction molaire des quantum dots I-III-VI. Il peut néanmoins être déterminé à condition de connaître la composition et la taille de nos nanoparticules. En couplant des mesures d'ICP-AES pour la composition à des mesures en DRX pour déterminer la taille, on peut remonter à la concentration en nanoparticules et une mesure d'absorbance nous permet alors de déterminer  $\epsilon_{fluo}^{\lambda}$ .

### B.1.2 Relargage du Manganèse

Pour la mesure du relargage du manganèse, nous avons utilisé un dosage colorimétrique mis au point par Serrat en 1998.[261] Dans cette méthode, le manganèse (II) est d'abord oxydé en manganèse (IV) en milieu basique. Le manganèse (IV) permet ensuite l'oxydation de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) en une diimine (FIG. B.1). Au cours de cette réaction, on passe d'une solution incolore à une solution jaune car la TMB est incolore et la diimine correspondante est jaune. La mesure de l'absorbance de ce composé nous permet donc de remonter à la quantité de manganèse présent dans la

solution à analyser grâce à la loi de Beer-Lambert : la quantité de diimine obtenue est égale à la quantité de manganèse (IV) présent dans la solution.

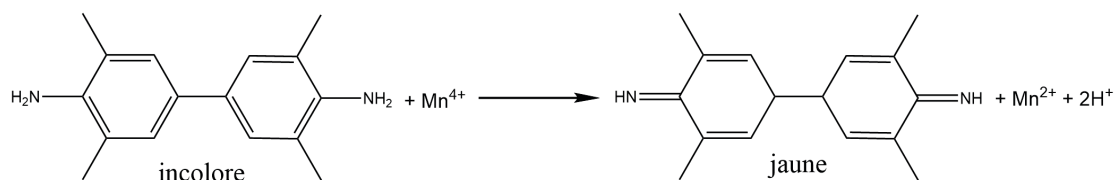


FIGURE B.1 – Schéma de la réaction entre la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et le manganèse (IV).

## Protocole

Pour cette synthèse, il faut préparer plusieurs solutions qui doivent être fraîchement préparées. La solution de TMB est obtenue en dissolvant 10 mg de TMB dans 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M. Une solution d'acide phosphorique à 7,5 M est préparée en diluant deux fois une solution à 85 %. Une solution de soude à 1,5 M est préparée en dissolvant 600 mg de soude dans 10 ml d'eau.

Pour réaliser le dosage, on place 500 µl de solution contenant du manganèse dans un pilulier et on ajoute 20 µl de la solution de soude. Après 15-20 minutes sous agitation, on ajoute 20 µl de la solution de TMB puis 20 µl de la solution d'acide phosphorique. Il se forme alors un produit jaune et on mesure l'absorbance à 450 nm dans les 10 minutes suivantes en utilisant une cuve en quartz de 600 µl.

## Étalonnage

Avant d'évaluer le taux de manganèse relargué par nos nanoparticules, nous avons d'abord déterminé le coefficient d'extinction molaire de la diimine. Pour cela, nous avons préparé des solutions de chlorure de manganèse dans l'eau avec des concentrations allant de 0,5 µM à 15 µM que nous avons traité avec le protocole décrit ci-dessus et nous avons mesuré l'absorbance (FIG. B.2(a)). La mesure de l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration en manganèse nous a permis d'évaluer la gamme de concentration mesurable ainsi que le coefficient d'extinction molaire (FIG. B.2(b)). On peut voir que l'on obtient un comportement linéaire pour des concentrations supérieures à 1 µM avec un coefficient d'extinction molaire de  $21 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

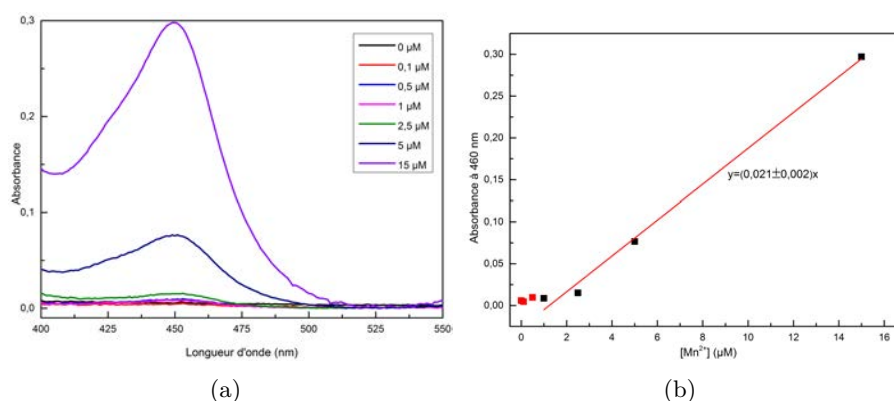


FIGURE B.2 – Dosage colorimétrique des ions  $Mn^{2+}$  par la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine : (a) Spectres d'absorbance de solutions contenant des ions  $Mn^{2+}$  après ajout de TMB ; (b) Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en ions  $Mn^{2+}$ .

### Relargage du manganèse

Pour étudier le relargage du manganèse, nous avons incubé des quantum dots dans du milieu de culture cellulaire avec des concentrations en nanoparticules de l'ordre de  $1 \mu M$  en nanoparticules pendant des durées variables à  $37^\circ C$ . Avant le dosage, les quantum dots et les biomolécules présentes dans le milieu de culture sont éliminées par ultrafiltration sur membranes avec des tailles de coupure de  $5 \text{ kDa}$ . La solution ainsi obtenue est translucide et le dosage peut être réalisé suivant le protocole ci-dessus et permet de déterminer la concentration en manganèse dans la solution mère.

#### B.1.3 Fluorescence

Les spectres de fluorescence et les courbes de déclin de fluorescence sont réalisés grâce à des fluorimètres (ou spectromètres). La figure B.3 schématise le fonctionnement d'un fluorimètre. L'échantillon (en orange) est excité par une onde monochromatique incidente (en vert). Les photons émis (en rouge) par les fluorophores sont collectés à  $90^\circ$  pour limiter le signal transmis directement depuis la source. Pour certains objets, la diffusion n'est pas négligeable et pour limiter le nombre de photons diffusés vers le détecteur, il est parfois utile de placer un filtre passe-haut (en longueur d'onde) entre l'échantillon et le détecteur. La longueur d'onde de coupure est alors choisie supérieure à la longueur d'onde d'excitation mais inférieure au signal à mesurer.

Il existe deux types de spectres de fluorescence : les spectres d'émission (PL) et les spectres d'excitation (PLE). Dans le premier cas, les fluorophores sont illuminés

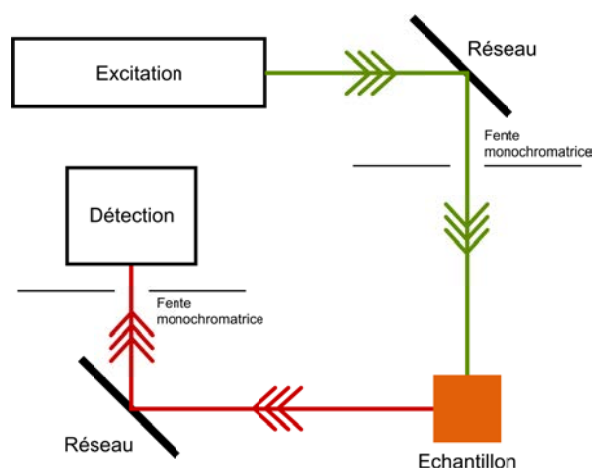


FIGURE B.3 – Schéma du principe de fonctionnement d'un fluorimètre.

par une source d'excitation avec une longueur d'onde fixe et on mesure le nombre de photons émis pour chaque longueur d'onde avec un photodétecteur. Dans un spectre d'excitation, on regarde le nombre de photons émis par le fluorophore à une longueur d'onde donnée en fonction de la longueur d'onde des photons incidents. Les deux spectres fournissent des informations complémentaires : les spectres d'émission nous renseignent sur le profil d'émission des fluorophores étudiés (longueur d'onde d'émission, nombre de photons émis) tandis que les spectres d'excitation permettent d'obtenir des informations sur l'absorbance de fluorophores émettant à la longueur d'onde d'étude. Comme pour les spectres d'absorbance, les spectres de fluorescence sont réalisés sur des solutions placées dans des cuves en quartz. Au LPEM, nous avons deux fluorimètres qui nous permettent d'obtenir ce type de spectres : un Horiba Jobin Yvon Fluoromax-3 et un Edinburgh Instruments FSP920. Les deux sont équipés d'une lampe blanche continue qui, combinée avec un monochromateur de largeur variable, permet de choisir la longueur d'onde d'excitation. Le fluoromax est équipé d'un seul détecteur qui permet d'obtenir des spectres sur la gamme spectrale du visible (400-800 nm). Le FSP920 possède quatre détecteurs mais nous n'en avons utilisé que deux : l'un très sensible couvre la gamme du visible (400-800 nm) et l'autre, un peu moins sensible, couvre une gamme spectrale plus large (500-1000 nm). Ce spectromètre est également équipé d'une diode laser pulsée émettant à 376 nm avec une fréquence de pulse variable entre 50 ns et 50  $\mu$ s qui nous permet de réaliser des courbes de déclin de fluorescence.

## Spectre d'émission

Les spectres d'émission ont été réalisés sur le FSP920 qui possède une gamme de détection étendue au proche infrarouge utile pour un certain nombre de nos échantillons. Du fait de la sensibilité dans le proche infrarouge, nous avons utilisé des largeurs de monochromateurs plus larges que pour les fluorophores visibles. Pour les mesures de fluorescence, il est préférable de limiter l'ouverture du monochromateur dont on veut tirer des informations. Ainsi pour les spectres d'émission, on limitera l'ouverture du monochromateur du détecteur et on ouvrira le monochromateur à l'excitation pour augmenter le nombre de photons incidents. Pour les spectres d'émission, nous avons typiquement utilisé des ouvertures équivalentes à une résolution de 5 nm à l'excitation et 2 nm à l'émission.

## Spectre d'excitation

Si l'on suppose que le rendement quantique de nos objets ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation (ce qui est vrai en première approximation), les spectres d'excitation nous renseignent sur l'absorption des objets qui émettent de la lumière puisque l'on étudie le nombre de photons émis par nos objets en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La comparaison des spectres d'absorbance et des spectres d'excitation nous renseignent donc sur la proportion de nos objets qui émettent effectivement de la lumière. Ainsi, lors de la croissance d'une coque de ZnS, il est possible de vérifier que la coque pousse effectivement, en comparant la PLE des cœurs et celles des cœurs/coques, et la proportion de nucléation secondaire, en comparant l'absorbance et la PLE. Si on observe une augmentation de la PLE en-dessous de 350 nm (ce qui correspond à la largeur de bande interdite du ZnS), cela indique que la section efficace d'absorption de nos objets augmente et que l'on a bien une croissance de coque. En comparant la PLE et l'absorbance, il est possible de d'évaluer la proportion de nucléation secondaire. Si la croissance de coque n'a pas eu lieu et qu'on a de la nucléation secondaire, l'absorbance de la solution va augmenter puisque du ZnS sera présent en solution tandis que la PLE ne va pas évoluer puisque l'absorbance des objets fluorescents ne va pas évoluer. Si la croissance de coque a bien eu lieu, les profils de PLE et d'absorbance seront semblables. La nucléation secondaire peut être évaluée en comparant l'aire totale correspondant au ZnS (zone hachurée sur la figure B.4) et celle correspondant à la nucléation secondaire (zone hachurée oblique sur la même figure).

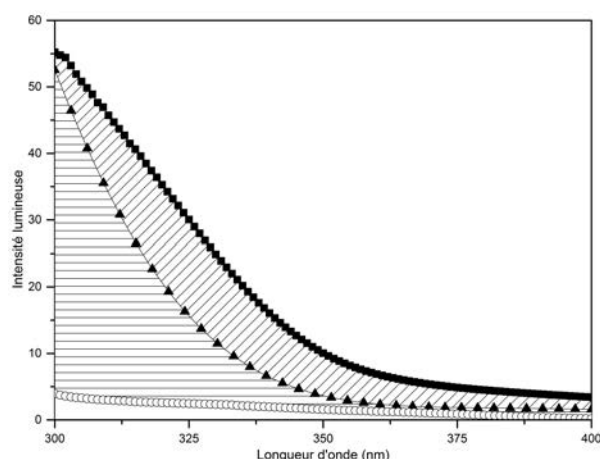


FIGURE B.4 – Comparaison des spectres d’excitation des cœurs (○), cœurs/coques (▲) et spectres d’absorbance (■).

### Temps de vie

Sur le spectromètre Edinburgh, nous pouvons également étudié le déclin de fluorescence. En revanche, la mesure est faite sur le même type d’échantillon. Là encore pour éviter la réabsorption il est nécessaire d’utiliser des solutions diluées. Pour cela, nous n’utilisons plus une source continue mais une diode laser pulsée. À chaque pulse, des photons sont émis par l’échantillon et on peut mesurer entre l’impulsion d’excitation et l’arrivée du photon sur le détecteur. On obtient alors une courbe de l’intensité de fluorescence en fonction du temps (FIG. B.5). L’ajustement de cette courbe par une courbe multiexponentielle permet de déterminer les différents temps de vie radiatifs.

#### B.1.4 Rendement quantique

L’efficacité des fluorophores est évaluée grâce au rendement quantique qui est le rapport entre le nombre de photons émis par le fluorophore et le nombre de photons absorbés par le fluorophore. Cette mesure est réalisée en comparant le rapport des nombres de photons émis et absorbés par nos objets à un fluorophore de référence dont le rendement quantique est connu. Cette méthode nécessite d’avoir un spectre d’émission et d’absorbance pour le fluorophore de référence et pour l’échantillon à mesurer. Le rendement quantique est alors donné par :

$$\phi_{ech} = \frac{F_{ech}}{A_{ech}} \frac{A_{ref}}{F_{ref}} \left( \frac{n_{ech}}{n_{ref}} \right)^2 \phi_{ref} \quad (\text{B.2})$$

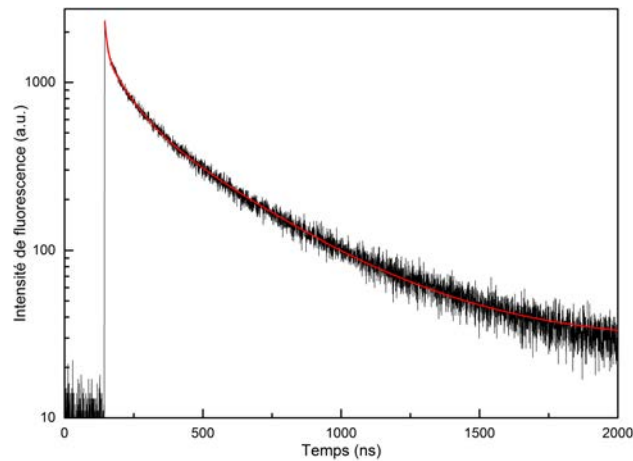


FIGURE B.5 – Intensité de fluorescence en fonction du temps. En rouge, ajustement par une triexponentielle décroissante.

où les indices *ref* et *ech* indiquent l'espèce considérée, le fluorophore de référence et l'échantillon respectivement,  $A_i$  est l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation,  $F_i$  est l'aire sous la courbe de fluorescence (sur la figure B.6(a), cela correspond à la zone hachurée),  $n_i$  est l'indice du solvant utilisé pour faire les spectres et  $\phi_{ref}$  est le rendement quantique du fluorophore de référence. Pour obtenir le rendement avec le maximum de précision, il existe plusieurs contraintes. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des solutions diluées afin d'éviter les risques de réabsorption. Pour cela, nous avons travaillé avec des solutions présentant des absorbances inférieures à 0,1 sur toute la gamme d'émission des fluorophores, échantillon comme référence. Il est également nécessaire d'avoir des fluorophores qui absorbent et émettent dans la même gamme spectrale que l'échantillon à analyser pour que la réponse en longueur d'onde du détecteur n'ait pas d'incidence sur la mesure. Nous avons donc utilisé deux fluorophores organiques qui émettent dans la même gamme spectrale que nos quantum dots : la phtalocyanine de zinc et le vert d'indocyanine (FIG. B.6). Le premier présente une émission autour de 675 nm avec un rendement quantique de 30 % dans le toluène.[277] Le second présente une émission autour de 800 nm avec un rendement de 13 % dans le diméthylsulfoxyde.[62] Nous avons surtout travaillé avec la phtalocyanine de zinc car elle présente un rendement quantique plus élevée (et donc une plus petite erreur sur la mesure) et l'absorbance de nos objets est plus facilement mesurable autour de 700 nm qu' autour de 800 nm.

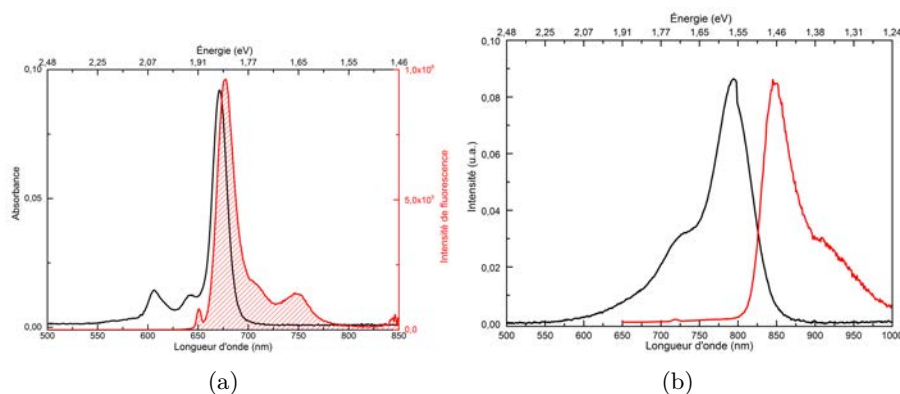


FIGURE B.6 – Spectres d’excitation et d’absorbance de la phtalocyanine de zinc (a) et du vert d’indocyanine (b).

## B.2 Microscopie électronique en transmission

Les images de microscopie électronique en transmission (MET) ont été acquises sur un microscope JEOL 2010F opérant à une tension d’accélération de 200 kV. Pour la préparation des échantillons, on lave les échantillons sont lavés par précipitation/redispersion afin d’éliminer l’excès de ligands. On dépose une goutte de solution (avec une concentration d’environ 3  $\mu\text{M}$  en nanoparticules) sur une grille de cuivre (200 lignes par pouce) recouverte d’une couche de carbone. Après un dégazage pendant une nuit, les images sont acquises avec différents grossissements.

## B.3 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X (DRX) est un outil particulièrement utile pour l’étude de nanocristaux. C’est une technique qui permet non seulement de savoir quelle est la phase cristalline en présence (si les objets étudiés sont cristallins) mais également de déterminer la taille des cristallites et leur composition dans le cas d’alliage. Pour caractériser nos objets, nous utilisons la méthode des poudres. Pour cela, on concentre les nanoparticules à étudier et l’échantillon est déposé sur un substrat, dans notre cas un wafer de silicium. Les diffractogrammes sont acquis en utilisant une anticathode en cuivre (raie  $K_{\alpha}$ ,  $\lambda = 1,054056 \text{ \AA}$ ).

### B.3.1 Détermination de la taille des cristaux

La taille des cristallites ( $D$ ), dans notre cas le diamètre des nanoparticules, peut être déterminée en utilisant la formule de Scherrer qui la relie à la largeur à mi-hauteur

(FWHM) et à la position ( $\theta$ ) des pics de diffraction selon :

$$D = \frac{K\lambda}{FWHM \cos\theta}, \quad (\text{B.3})$$

où  $K$  est un coefficient adimensionné de forme (en première approximation, on prendra  $K=0,9$  ce qui correspond à des nanoparticules sphérique) et  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau incident.

### B.3.2 Détermination de la composition d'un alliage

Pour des alliages, on peut également déterminer la composition en mesurant le paramètre de maille de l'alliage. La loi de Végard relie en effet le paramètre de maille de l'alliage ( $a_{all}$ ) aux paramètres de maille de chacun des constituants ( $a_1$  et  $a_2$ ) et à la proportion de chacun selon :

$$a_{all} = x_1 a_1 + (1 - x_1) a_2, \quad (\text{B.4})$$

avec  $x$  la proportion du composé 1 dans l'alliage. De cette équation, on peut déterminer la proportion  $x_1$  du composé 1 qui est donnée par :

$$x_1 = \frac{a_{all} - a_2}{a_1 - a_2} \quad (\text{B.5})$$

## B.4 Analyse élémentaire

### B.4.1 Analyse dispersive en énergie (EDX)

L'analyse dispersive en énergie est une méthode semi-quantitative qui permet de déterminer la proportion de chaque atome dans un échantillon. Lorsqu'un atome est irradié par un électron de haute énergie, il se forme une lacune par éjection d'un électron secondaire (Fig. B.7(a)). L'atome se désexcite alors en émettant un photon X (Fig. B.7(b)). Les énergies et le nombre de ces photons X sont caractéristiques de chaque élément et on peut remonter à la composition relative.

Les mesures sont réalisées sur un microscope électronique à balayage (Hitachi S-3600N) équipée d'une sonde de rayons X. L'échantillon est préparé en déposant une solution contenant les nanoparticules à étudier sur une pastille en carbone déposée sur

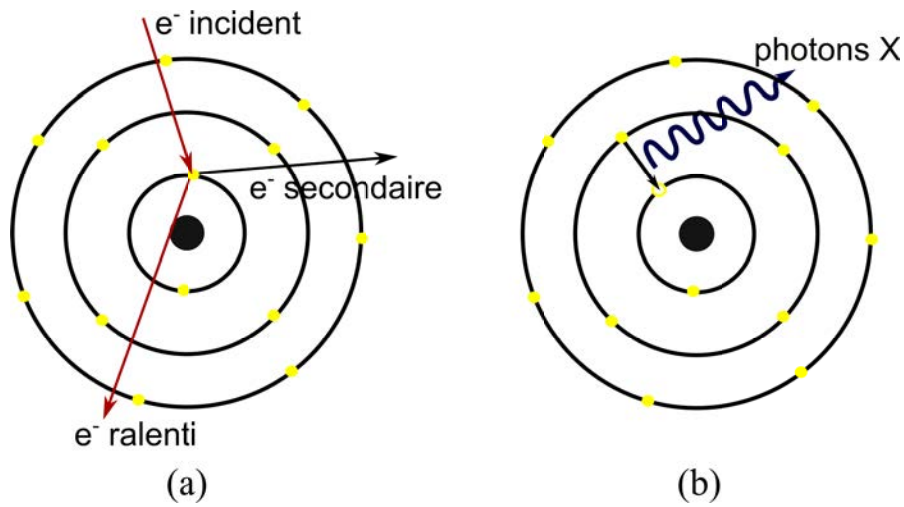


FIGURE B.7 – Principe de l'analyse dispersive en énergie.

un plot en aluminium. L'échantillon est ensuite irradié par un faisceau électronique à 15 keV et on enregistre le spectre des photons X (FIG. B.8).

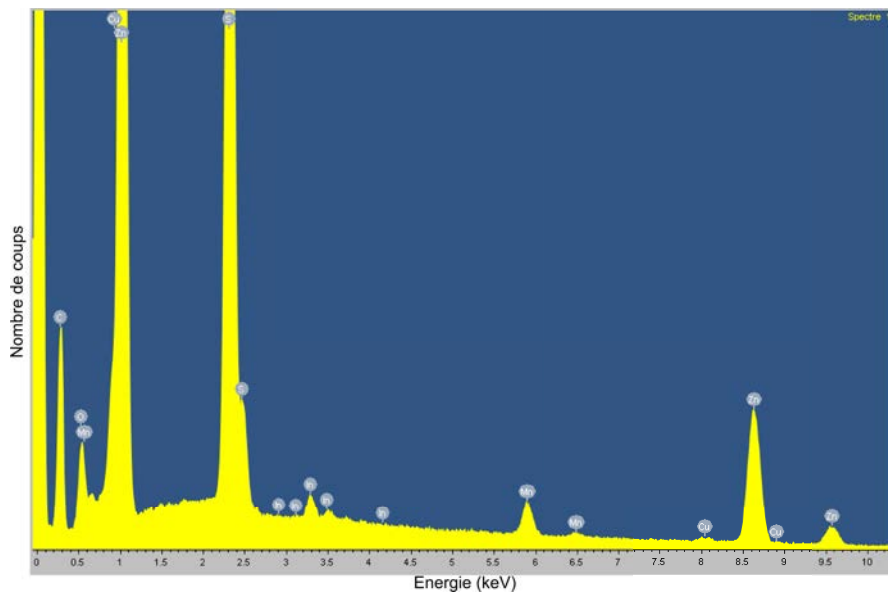


FIGURE B.8 – Exemple de spectre obtenu en EDX avec un échantillon Zn-Cu-In-S/ $Zn_0,8Mn_0,2S$ .

### B.4.2 Spectrométrie par torche à plasma

Les analyses élémentaires sont complétées par des mesures quantitatives réalisées par spectrométrie par torche plasma couplée à une détection par spectroscopie d'absorption ou par spectrométrie de masse. Ces mesures sont faites dans des laboratoires extérieurs. Pour préparer un échantillon, on prélève un volume donné de solution de nanoparticules que l'on transfère dans un pilulier. Après avoir évaporé le solvant, on ajoute un volume connu d'acide nitrique concentré ce qui produit des vapeurs jaunes dans le pilulier indiquant la formation de  $\text{H}_2\text{S}$ . Les échantillons sont ensuite envoyés dans un laboratoire extérieur pour analyse. L'analyse de la concentration en chacun des ions permet alors de remonter à la composition des nanoparticules et à leur concentration à condition de connaître leur taille.

## B.5 Relaxivité

Les relaxivités longitudinales ( $r_1$ ) ont été évaluées à 300 K et 7 T sur un spectromètre RMN Bruker ASX 300 MHz car nous ne disposons pas d'un relaxomètre.

### B.5.1 Principe de la mesure

Les mesures ont été faites en utilisant une séquence d'inversion-récupération (FIG. B.9).

En l'absence de perturbation (FIG. B.9.a), l'aimantation longitudinale  $M_z$  prend sa valeur à l'équilibre  $M_0$ . L'application d'une impulsion radiofréquence  $\pi$  va retourner l'aimantation et l'on aura  $M_z = -M_0$  (FIG. B.9.b). Après un temps de relaxation  $T_r$  (FIG. B.9.c et d), on applique une impulsion radiofréquence de  $\pi/2$  pour permettre la mesure de  $M_z(T_r)$ . Or,  $M_z$  évolue selon (FIG. B.9.e) :

$$M_z(t) = M_0(1 - 2e^{-t/T_1})$$

,

avec  $T_1$  le temps de relaxation longitudinal. En traçant et en ajustant la courbe  $\ln(1/2(1 - M_z(T_r)/M_0))$  en fonction de  $T_r$ , on obtient une droite de pente  $-R_1 = -1/T_1$ , comme on peut le voir sur la figure B.10(a). Pour un même échantillon, cette mesure est faite à différentes concentrations et le tracé de  $R_1$  en fonction de la concentration en nanoparticules donne une droite de pente  $r_1$  (voir la figure B.10(b)). En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, le taux de relaxation  $R_1$  est relié à la relaxivité selon :

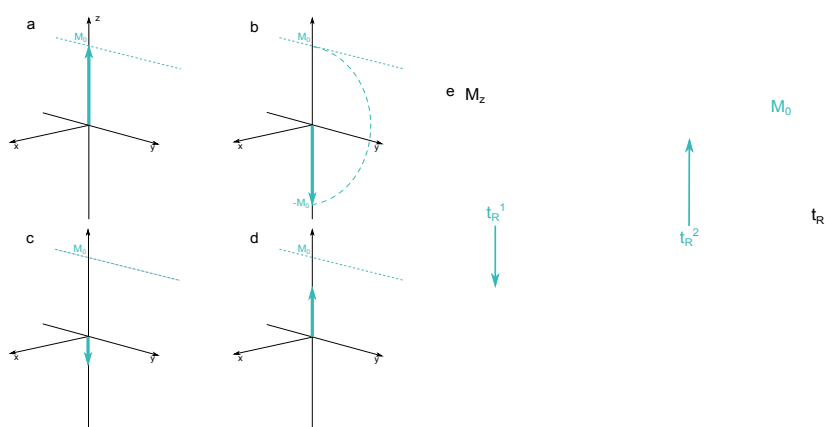


FIGURE B.9 – Schéma de principe d'une mesure du temps de relaxation longitudinale par une séquence d'inversion récupération

$$R_1 = R_1^d + r_1[QD],$$

avec  $R_1^d$  est le taux de relaxation en l'absence d'agent de contraste et  $[QD]$  la concentration en quantum dots.

### B.5.2 Réalisation de la mesure

Les échantillons analysés sont des solutions de quantum dots échangés avec le DHLA-PEG qui sont solubles dans l'eau. Les solutions à analyser sont placés dans un porte échantillon qui est un tube en téflon de 200  $\mu\text{l}$  environ. Lors du remplissage du porte échantillon, il est important de faire attention à ne pas faire de bulles pour ne pas fausser la mesure. Le porte échantillon est alors placé dans le spectromètre et on peut passer à la mesure. Après la mesure sur la solution mère, nous diluons l'échantillon deux fois et on recommence la mesure. L'opération est répétée 5 fois, soit jusqu'à obtenir des concentrations égal à  $1/32$  de la concentration de la solution mère. Il faut faire attention de bien nettoyer le porte échantillon entre deux mesures pour éviter de modifier la concentration en nanoparticules. Les concentrations sont évaluées sur la solution mère par une mesure d'absorbance.

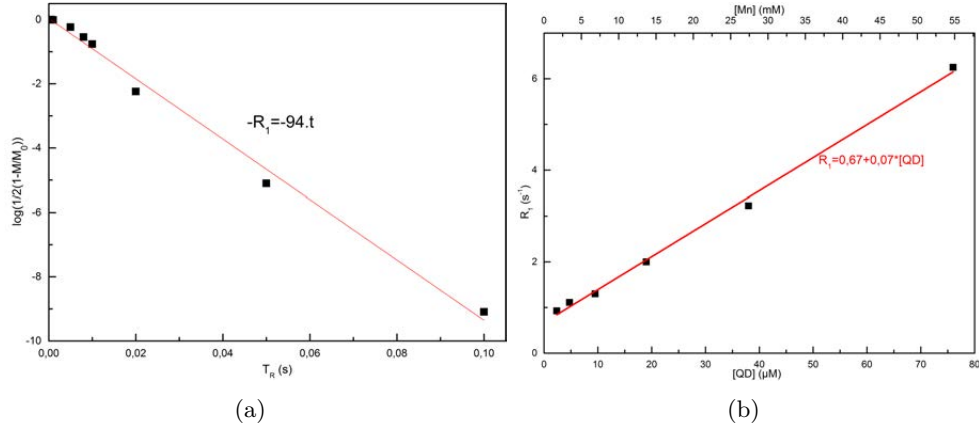


FIGURE B.10 – Mesure de relaxivité pour un échantillon. (a) Tracé de  $\ln(1/2(1 - M_z(T_r)/M_0))$  en fonction de  $T_r$ ; (b) Taux de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en quantum dots et en manganèse.

La première étape de la mesure consiste à trouver la durée d'une impulsion  $\pi/2$ . Pour cela, on applique des impulsions de durée variable et on mesure l'aimantation directement après : l'aimantation est alors maximale pour une impulsion  $\pi/2$ . On trouve typiquement des durées d'impulsion de l'ordre de 3  $\mu\text{s}$ . On utilise alors des séquences d'inversion-récupération : on applique une impulsion  $\pi$  puis on laisse les protons relaxer un certain temps,  $T_R$ , (appelé  $d_7$  dans le logiciel d'acquisition) et on mesure l'aimantation après avoir appliqué une impulsion  $\pi/2$ . On laisse ensuite les spins revenir à l'équilibre en attendant un temps au moins égal à 5  $T_1$  avant de faire la mesure suivante. On réalise 3 mesures pour chaque  $T_R$  et on lance des séquences avec 10 valeurs de  $T_R$  réparties de manière logarithmique pour chaque concentration.

## B.6 Résonance Paramagnétique Électronique

### B.6.1 Principe de la RPE

La résonance paramagnétique électronique est une technique permettant de mettre en évidence la présence d'électrons non appariés dans un échantillon qui dans ce cas présente un spin  $S$  non nul. Cette mesure repose sur l'effet Zeeman : sous l'action d'un champ magnétique  $H_0$ , on a une levée de dégénérescence des états de spins en  $2S+1$  niveaux chacun caractérisé par un nombre quantique de spin  $m_s$  qui prend des valeurs demi-entières comprises entre  $-S$  et  $S$  ( $-S, -S+1, -S+2, \dots, S-1, S$ ). L'énergie de chaque état est alors donnée par  $m_s g \mu_B H_0$  avec  $g$  le facteur de Landé de l'électron ( $g_e = 2,0023$  pour

un électron libre) et  $\mu_B$  est le magnéton de Bohr.

La présence d'un champ radiofréquence de fréquence  $\nu$  permet d'induire des transitions entre deux niveaux à condition que son énergie corresponde à une transition possible (les règles de sélection impose que  $\Delta m_s = \pm 1$ ), ce qui se traduit par :

$$h\nu = g\mu_B H_0, \quad (\text{B.6})$$

avec  $h$  la constante de Planck. On observera donc une transition à condition que :

$$h\nu = \frac{g\mu_B}{h} H_0 = \gamma H_0, \quad (\text{B.7})$$

où  $\gamma$  désigne le rapport gyromagnétique de l'électron.

### B.6.2 Mesure de spectre de RPE

Les mesures sont faites sur des nanoparticules en solution placées dans un tube en quartz qui est ensuite introduit dans le spectromètre. Sur le spectromètre que nous utilisons, un Bruker EMX, on travaille avec une fréquence fixe pour le champ radiofréquence ( $\nu = 9388$  MHz, soit une fréquence appartenant à la bande X) et on fait varier le champ magnétique  $H$  autour d'une valeur centrale  $H_0$  selon :

$$H = H_0 + H_1 \cos(\omega t), \quad (\text{B.8})$$

où  $H_0$  est le champ correspondant à la résonance des électrons libres ( $H_0 \approx 3350$  G),  $H_1$  est l'amplitude de la modulation (typiquement, on prend  $H_1 = 1500$  G) et  $\omega$  la pulsation de la modulation (on prend typiquement une fréquence de modulation de 100 kHz). Le signal alors fournit par le spectromètre est la dérivée de l'absorbance et on obtient des courbes comme celle présentée sur la figure B.11.

## B.7 Propriétés magnétiques

Les propriétés magnétiques ont été obtenues sur un SQUID-VSM Quantum Design MPMS 3 qui permet d'obtenir des champs jusqu'à 7 T et qui permet de travailler en statique (DC) ou en dynamique (AC). Les courbes d'aimantation sont obtenues en faisant un balayage en champ à 300 K et en mesurant pour chaque champ le moment magnétique total de l'échantillon. Le champ est balayé entre 0 et 7 T puis entre 7 et -7 T et enfin entre -7 T et 0 T avec typiquement 1000 points répartis linéairement. Aucune différence n'a été

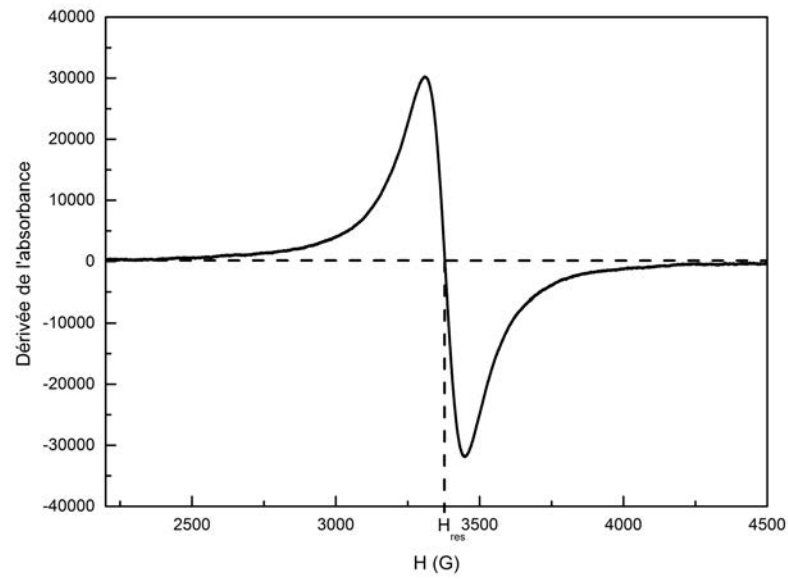


FIGURE B.11 – Exemple typique de spectre obtenu par RPE.

observée entre les mesures d'aimantation en DC et en AC. Les échantillons sont préparés en déposant une goutte de solution concentrée de nanoparticules dans une gélule et en laissant le solvant s'évaporer. L'opération est répétée plusieurs fois de façon à obtenir quelques dizaines de milligrammes de nanoparticules dans le fond de la gélule.

*Annexe C*

## **Publications**

# Multimodal Mn-doped I–III–VI quantum dots for near infrared fluorescence and magnetic resonance imaging: from synthesis to *in vivo* application†

Cite this: *Nanoscale*, 2014, 6, 9264

Gary Sitbon,<sup>abc</sup> Sophie Bouccara,<sup>abc</sup> Mariana Tasso,<sup>abc</sup> Aurélie Francois,<sup>d</sup> Lina Bezdetnaya,<sup>d</sup> Frédéric Marchal,<sup>d</sup> Marine Beaumont<sup>e</sup> and Thomas Pons<sup>\*abc</sup>

The development of sensitive multimodal contrast agents is a key issue to provide better global, multi-scale images for diagnostic or therapeutic purposes. Here we present the synthesis of Zn–Cu–In–(S, Se)/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S core–shell quantum dots (QDs) that can be used as markers for both near-infrared fluorescence imaging and magnetic resonance imaging (MRI). We first present the synthesis of Zn–Cu–In–(S, Se) cores coated with a thick ZnS shell doped with various proportions of Mn. Their emission wavelengths can be tuned over the NIR optical window suitable for deep tissue imaging. The incorporation of manganese ions (up to a few thousand ions per QD) confers them a paramagnetic character, as demonstrated by structural analysis and electron paramagnetic resonance spectroscopy. These QDs maintain their optical properties after transfer to water using ligand exchange. They exhibit T1-relaxivities up to 1400 mM<sup>-1</sup> [QD] s<sup>-1</sup> at 7 T and 300 K. We finally show that these QDs are suitable multimodal *in vivo* probes and demonstrate MRI and NIR fluorescence detection of regional lymph nodes in mice.

Received 25th April 2014  
Accepted 14th June 2014

DOI: 10.1039/c4nr02239d

www.rsc.org/nanoscale

## Introduction

Noninvasive molecular imaging is being increasingly used both as a scientific tool to study biological processes in living organisms and as a diagnostic tool to provide clinicians with an otherwise inaccessible image of a specific marker distribution.<sup>1–3</sup> Each imaging modality presents complementary advantages in terms of sensitivity, spatial resolution, imaging depth and ease of use.<sup>4,5</sup>

Near infrared fluorescence imaging (NIRFI), in particular, is attracting increasing attention due to its high sensitivity, low cost, non-invasiveness and easy implementation. It is however limited to near surface tissues, since its imaging depth does not exceed a few centimeters. Its spatial resolution varies from the micrometer scale using microscopy on cell samples to centimeters in thick tissues, due to light diffusion. Magnetic

resonance imaging (MRI), on the other hand, provides whole body images with a homogeneous millimeter-resolution, albeit with a lower sensitivity. Nanotechnology offers the potential to design probes that offer contrast in both imaging modalities and combine the best of each, therefore providing a more comprehensive picture of the biological markers of interest. In particular, fluorescent semiconductor quantum dots (QDs) represent an attractive platform to integrate different contrast agents.

During the past decade, visible emitting QDs have increasingly been used for cellular imaging due to their unique optical properties such as their high brightness, photo-stability and multiplexing capabilities. They have for example enabled long term tracking of single molecules or simultaneous labeling of many different biomolecular targets.<sup>6,7</sup> QDs are also being increasingly used for *in vivo* imaging to improve detection sensitivities.<sup>8,9</sup> For *in vivo* applications, however, QDs should emit in the NIR range, typically between 700 nm and 1000 nm, in order to minimize light absorption and diffusion and therefore maximize imaging depth.<sup>10</sup> While no signs of acute toxicity have been observed after the injection of large doses of Cd-based QDs,<sup>11</sup> safer, heavy-metal free QDs have been developed in order to minimize toxicity. Recently developed silicon-based QDs,<sup>12,13</sup> as well as QDs based on I–III–VI<sub>2</sub> materials such as CuInS<sub>2</sub> or CuInSe<sub>2</sub> (ref. 14–17) provide attractive fluorescent probes for biomedical applications due to their low toxicity and high detection sensitivities.

<sup>a</sup>LPEM, PSL Research University, ESPCI-ParisTech, 10 rue Vauquelin, F-75231, Paris Cedex 5, France. E-mail: thomas.pons@espci.fr

<sup>b</sup>CNRS, UMR 8213, F-75005, Paris, France

<sup>c</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France

<sup>d</sup>Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), ICL, Université de Lorraine, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

<sup>e</sup>CIC-IT de Nancy, CHU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, rue du Morvan, 54511, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Determination of Mn content; magnetization measurements; additional TEM and spectroscopic data; additional NIR fluorescence image; MTT assay results. See DOI: 10.1039/c4nr02239d

Several strategies have been used to bring together fluorescence and MR contrast into one nanoprobe using I–III–VI QDs. For example, Hsu *et al.* incorporated CuInS<sub>2</sub>/ZnS QDs and superparamagnetic iron oxide nanoparticles in silica beads.<sup>18</sup> However, the resulting size is much larger than the original nanoparticles, which may hinder access to confined spaces. In order to obtain more compact nanoprobe, Cheng *et al.* have encapsulated CuInS<sub>2</sub>/ZnS QDs in an amphiphilic polymer, to which they coupled Gd<sup>3+</sup>-chelates.<sup>19</sup> In addition to the relatively low number of Gd conjugated per QD, leading to a small relaxivity per QD, this strategy may suffer from the weak non-covalent link between the QD and the paramagnetic ion. Indeed, the QD organic surface chemistry may easily detach with time from the QD surface due to its interaction with the complex *in vivo* environment, as has been shown for example for micelle encapsulated QDs.<sup>20</sup> Even relatively strong dithiol-containing ligands have been shown to exhibit a fast desorption rate from the QD surface, on the order of 1 h<sup>-1</sup>.<sup>21</sup> The dissociation between the fluorescent QDs and the magnetic species linked to the surface ligands therefore represents a strong limitation to the use of this type of multimodal probe for *in vivo* imaging.

We have therefore chosen to directly incorporate the paramagnetic ion into the QD inorganic shell to ensure that at all times the fluorescent and magnetic species remain colocalized. Doping of QDs with Mn<sup>2+</sup> ions has been reported earlier in II–VI QDs.<sup>22</sup> Wang *et al.* demonstrated the use of Mn-doped CdSe/ZnS QDs for *in vitro* fluorescence and MR imaging of macrophages.<sup>23</sup> More recently, several groups reported the synthesis of Mn-doped CuInS<sub>2</sub> or AgInS<sub>2</sub> QDs.<sup>24–26</sup> However, none of these QDs emit in the NIR. In addition, they were only able to incorporate a small number of Mn per QD, leading to a low MR sensitivity. These two limitations precluded their use for *in vivo* imaging. Here we report the synthesis and characterization of Zn–Cu–In–(S, Se)/Zn<sub>1–x</sub>Mn<sub>x</sub>S QDs designed for *in vivo* imaging: the emission of these QDs is tunable in the NIR range for optimal fluorescence imaging and they contain up to 3000 Mn atoms. This very high Mn loading leads to relaxivities in the μM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> range and allows QD-based multimodal *in vivo* imaging. As an illustration, we demonstrate *in vivo* MRI and fluorescence detection of regional lymph nodes in mice.

## Materials and Methods

### Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without further purification. Zinc ethylxanthogenate (Zn(EtX)<sub>2</sub>) and zinc oleate (Zn(OA)<sub>2</sub>) were prepared from zinc nitrate, potassium ethylxanthogenate and sodium oleate according to previously reported methods.<sup>16</sup> HeLa cells were obtained from ATCC and cultured using supplemented DMEM medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX, pyruvate, 10 vol% FBS, 1 vol% penicillin–streptomycin) from Gibco.

### Synthetic procedures

**Synthesis of Zn–Cu–In–S cores.** In a typical synthesis of Zn–Cu–In–S cores, 1 mmol of copper(i) iodide (190 mg), 1 mmol of

indium acetate (291 mg) and 0.1 mmol of zinc acetate (Zn(OAc)<sub>2</sub>, 18 mg) were introduced in a three-neck flask with 5 ml of dodecanethiol (DDT) and degassed under vacuum at 40 °C for 30 min. The yellow turbid suspension was then placed under argon flow and heated to 120 °C for 10 min. The resulting clear yellow solution was subsequently further heated to 220 °C. After approximately 15 minutes, the mixture was quickly cooled to room temperature. The obtained 780 nm emitting Zn–Cu–In–S cores were then collected by precipitation with ethanol (EtOH) and washed three times by successive redispersion and precipitation in hexane–EtOH. The final precipitate was redispersed in 10 ml of hexane.

**Synthesis of Zn–Cu–In–Se cores.** In a typical synthesis of Zn–Cu–In–Se cores, 1 mmol of CuCl (99 mg), 1 mmol of InCl<sub>3</sub> (221 mg), 2 mmol of Zn(OAc)<sub>2</sub> (367 mg) and 2 mmol of selenourea (246 mg) were introduced in a 100 ml three-neck flask with 10 ml of trioctylphosphine and 25 ml of octadecene (ODE). After sonicating the suspension for a few minutes, we added 5 ml of DDT and 10 ml of oleylamine (OAm). The resulting pink solution is degassed for 30 minutes at 40 °C. The solution is then heated at 230 °C and turned from pink to black. After 80 minutes of heating, 800 nm emitting Zn–Cu–In–Se cores were obtained and purified as described above. The final black precipitate was redispersed in 10 ml of hexane.

**Growth of a Mn<sub>x</sub>Zn<sub>1–x</sub>S shell.** We used a dropwise injection for the growth of a Mn<sub>x</sub>Zn<sub>1–x</sub>S shell on Zn–Cu–In–E (E = S or Se) cores. The first solution (solution 1) was composed of 2.5 mmol of Zn(EtX)<sub>2</sub> (768 mg), 3 ml of OAm and 7 ml of ODE. It resulted in a white turbid solution. The second solution (solution 2) is prepared in a 100 ml three-neck flask. We introduced 2.5-*x* mmol of Zn(OA)<sub>2</sub>, 2 ml OLA and 8 ml ODE. The solution was degassed under vacuum at 120 °C for 10 minutes. After the solution was cooled to room temperature, we introduced *x* mmol of manganese(II) acetate and the solution was then degassed again under vacuum at 120 °C for 10 minutes. The orange solution is kept under argon prior to the injection.

In a 100 ml three-neck flask, we mixed 1 ml of core QD solution prepared as mentioned above and 10 ml of ODE. The solution was degassed under vacuum at 50 °C for 40 minutes and then heated at 200 °C under argon. Solution 1 and solution 2 were then injected simultaneously in 2 hours. After cooling at room temperature, QDs were purified as described above and redispersed in 10 ml of hexane.

**Water solubilization.** QDs can be transferred in water by cap exchange with polyethylene glycol (PEG) modified-dihydrolipoic acids (DHLA-PEG) prepared according to a literature method with commercially available Jeffamine M-1000 polyetheramine (Huntsman).<sup>27</sup> A two-step surface modification was first performed to facilitate the subsequent water solubilisation. For that, 1 ml of QD solution was precipitated with ethanol and resuspended in chloroform. They were left overnight at 60 °C in the presence of 200 μl OAm. QDs were then precipitated with acetone and redispersed in chloroform. We then added 100 mg Zn(OA)<sub>2</sub> and the solution was heated to 60 °C for 2 hours. After precipitation with acetone to remove excess ligands and redispersion in chloroform, cap exchange and purification were done as reported before.<sup>15</sup>

## Characterization

**Optical characterization.** Absorption spectra were performed using a UV-Visible Varian Cary-5E spectrometer. Photoluminescence excitation spectra were performed using a Horiba Jobin Yvon Fluoromax-3 spectrofluorometer. Photoluminescence spectra and fluorescence lifetime measurements were performed using an Edinburgh Instruments FSP920 spectrofluorometer. The excitation source was either an Edinburgh Instruments EPL375 laser diode with an emission wavelength at 376 nm or a xenon 450 W arc lamp. The detector used for the experiments was a Hamamatsu R2658P side window photomultiplier. Photoluminescence quantum yields (QY) were measured using zinc phthalocyanine as reference, according to a previously reported method.<sup>15</sup>

**Structural characterization.** TEM/HRTEM images were acquired using a JEOL 2010 TEM equipped with a Gatan camera. XRD powder diffraction patterns were acquired using a Philips X'Pert diffractometer with a Cu K<sub>α</sub> source. We determined the size of crystalline domain,  $d$ , using Scherrer's law:

$$d = \frac{K\lambda}{\text{FWHM} \cos \theta},$$

where  $K$  is a dimensionless shape factor (a typical value of 0.9 for spherical objects was used as a first approximation),  $\beta$  is the FWHM of the peak (in radians) and  $\theta$  is the Bragg angle of the corresponding peak.

EPR measurements were performed using a Bruker EMX spectrometer operating at X band frequency (9.7 GHz).

Elemental analysis was performed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) on a Hitachi S-3600N scanning electron microscope operated at 15 keV. ICP-AES analyses were performed by Repsem analytical platform in Strasbourg. Samples are prepared by dissolving dried QDs with nitric acid.

Dynamic light scattering (DLS) was carried out on a CGS-3 goniometer system equipped with HeNe laser illumination at 633 nm and an ALV/LSE-5003 correlator (Malvern). Purified QD solutions are filtered (0.2 μm) and measured at five different angles between 45° and 120°.

Zeta potentials were measured in triplicate in water using a Malvern Zetasizer.

**Manganese ions leaching.** Manganese leaching was measured by colorimetry using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as described by Bosch-Serrat.<sup>28</sup> Purified hydrophilic quantum dots were dispersed in cell culture medium (optiMEM reduced serum, no phenol red medium, Gibco) at a concentration of 1 μM and left at 37 °C. After different incubation times, free manganese ions are separated from QDs by ultrafiltration (100 kDa cutoff), quantified using TMB absorbance at 450 nm and standard calibration solutions.

**Relaxivity characterization.** Spin-lattice relaxivities ( $r_1$ ) were measured at 7 T and room temperature using a Bruker ASX 300 MHz NMR spectrometer. A solution containing QDs was introduced in a 200 μl Teflon sample holder and put in the spectrometer. We then used an inversion recovery protocol with various time delays,  $\tau$ , between the 180°-inversion pulse and the 90°-reading pulse. The NMR signal,  $M$ , for a given time delay  $\tau$ , is given by

$$M(\tau) = M_0 \left( 1 - \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right),$$

where  $M_0$  is the NMR signal before inversion.  $T_1$  is obtained from the above equation (see Fig. S6a in ESI†). Relaxation measurements were performed at different QD concentrations to obtain the relaxivity of each QD sample (Fig. S6b†).

**Cell viability assay.** To assess the cytotoxicity of our probes, we performed a colorimetric MTT assay on HeLa cells. The assay is based upon the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to its purple formazan by viable cells. HeLa cells were seeded on a 96-well plate at a density of 10 000 cells per well. After overnight incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, culture medium was removed and cells were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) solution. Then, 100 μl of culture medium containing QDs at various concentrations were added. These QD solutions were pre-filtered (0.2 μm) for sterilization. After 24 hours of incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, medium was removed and cells were rinsed with PBS. We then added 100 μl of culture medium and 20 μl of a solution of MTT in water (5 mg ml<sup>-1</sup>). After 2 hours incubation, culture medium was removed and cells were rinsed with PBS. 150 μl of a 10% vol Triton X-100 in isopropanol was added to cells. After 30 minutes incubation, absorbance at 550 nm was measured on an absorbance microplate reader. Three replicates for each condition were considered, as well as (i) a blank control with only cell medium, and (ii) a control with the highest evaluated nanoparticle concentration in cell medium. This latter control intended to assess eventual (and parasitic) MTT reagent conversion induced by QD nanoparticles.<sup>29,30</sup> In our assays, such an effect was not observed: the absorbance of the only-QDs control was similar to the one of the blank with only medium. Furthermore, all reported absorbance values are increments relative to the absorbance of the blank.

## In vivo experiments

**Animals and QD administration.** All animal experiments were conducted in agreement with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication no. 86-23, revised 1985) and approved by the regional ethics committee. Female C57/BL6 mice (Janvier, Le Genest-Isle, France) were used in this study and maintained under specific pathogen-free conditions. 300 μl of a 40 μM stock solution of CuInSe<sub>2</sub>/Zn<sub>0.8</sub>Mn<sub>0.2</sub>S QDs was ultrafiltered and the pellet was dissolved in 60 μl of PBS. All experiments were performed under anesthesia using intraperitoneal injection of 0.01 ml g<sup>-1</sup> of body weight of a solution containing 9 mg ml<sup>-1</sup> of ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) and 0.9 mg ml<sup>-1</sup> of xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France). Female C57/BL6 mice (Janvier, France) were injected subcutaneously in the distal part of the left anterior paw with 20 μl of QD solution. After product delivery, the left paw was kneaded to improve product migration. Immediately after injection, animals were placed in the MR scanner, in the same position as before QD injection.

**Magnetic resonance imaging.** MRI was performed on a 3T MR scanner (SIGNA HDxt, General Electric, Milwaukee, WI)

using a four channel volume coil for reception (RAPID Biomedical, Rimpf, Germany). T1-weighted images were acquired using a fast spin-echo sequence with the following parameters: TE/TR = 12/500 ms; acquisition matrix = 480 × 320; field of view = 120 mm<sup>2</sup> and 17 1 mm thick slices. Acquisitions were performed pre and post (20 min) QD injection.

**Near-infrared fluorescence imaging.** *In vivo* optical imaging of QDs was performed using a Fluobeam® (FluoOptics, Grenoble, France) NIR imaging system. A 750 nm longpass emission filter is used. The regions of interest (ROIs) were depilated using a commercial hair removal cream before imaging. The CCD camera shows the specificity to adjust the fluorescence signal on the pixel which presents the strongest fluorescence intensity. Thus, the injection point of QDs was hidden if necessary, allowing thereby a better ROI visualization. *In vivo* fluorescence of axillary lymph nodes and lateral thoracic was acquired after MRI experiments, about 1 h after QD administration.

## Results and discussion

### Growth of thick zinc sulfide shell on Zn–Cu–In–S cores

We first synthesized Zn–Cu–In–S core QDs using a protocol adapted from Li *et al.*<sup>14</sup> We added a small amount of zinc precursors to the core synthesis as this improved the core photoluminescence quantum yield (PL QY),<sup>15</sup> without restricting the tunability of the emission in the NIR region due to the increase of the band gap. The Zn content was indeed typically limited to 25% compared to the Cu content, as estimated from EDS, and the Cu–In ratio was close to one. The obtained Zn–Cu–In–S cores typically emitted at 780 nm, with a FWHM of 100 nm, and a PL QY of 30%. While the size of these cores was difficult to estimate from TEM images due to low contrast, X-ray diffractograms were consistent with a core size of about 3 nm using Scherrer's law (see Materials and methods section).

Our objective was then to grow a thick ZnS shell to be able to incorporate at later stages a maximal number of paramagnetic Mn<sup>2+</sup> ions in the shell. Layer by layer deposition of ZnS on quantum dots following a SILAR protocol<sup>31</sup> required elevated

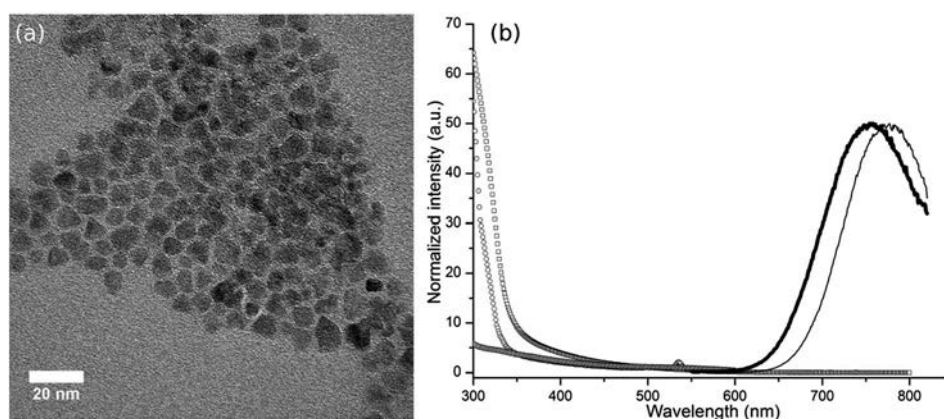
temperatures (>240 °C) to activate low reactivity precursors (zinc oleate and sulfur dissolved in octadecene). At these temperatures however, QD cores were rapidly etched, while lower temperatures resulted in an absence of growth. Previously described protocols were able to yield thin (1 nm) ZnS shell around Zn–Cu–In–S cores using dropwise injection of more reactive zinc ethylxanthate or dithiocarbamate precursors.<sup>14,15</sup> However the injection of additional precursors resulted in secondary nucleation of ZnS nanocrystals without increasing the shell thickness. We found that adjusting (see Materials and methods for details) the amount of oleylamine and the injection speed helped growing thicker monocrystalline shells, in the range of 2–3 nm, corresponding to about 10 ZnS monolayers, as shown in Fig. 1a by TEM (8 ± 2 nm in diameter) and XRD (7 ± 1 nm).

The resulting QDs retained their emission properties in the near infrared (Fig. 1b), with a small blue shift which could be attributed to the incorporation of Zn in the core due to cation exchange and/or Zn interdiffusion.<sup>15,32</sup> Photoluminescence excitation (PLE) spectrum showed a sharp rise below 350 nm, corresponding to the contribution of ZnS. This confirms the growth of a thick ZnS shell on the fluorescent QD cores. Comparison of PLE and absorption spectra indicates a limited secondary nucleation (typically less than 10%). Fluorescence decays showed a long lifetime component around 200 ns (see Fig. S1 in ESI†), which is typical for these I–III–VI QDs.<sup>14,33</sup>

### Incorporation of manganese in the shell

To incorporate manganese in the ZnS shell, we simply replaced zinc oleate with manganese acetate in the injection solution using different ratios of Mn to Zn. To avoid oxidation of manganese, the solution was carefully degassed under vacuum before adding the manganese precursor, as was previously described by Yang *et al.*<sup>34</sup> We thus synthesized samples with 1, 2, 5, 10, 20 and 30% of manganese precursor in the injection of solution.

Incorporation of Mn in the ZnS shell is evidenced by X-ray diffractograms, as shown in Fig. 2. The nanocrystals retain their



**Fig. 1** (a) TEM images of Zn–Cu–In–S/ZnS core–shell QDs; (b) normalized PL spectra of Zn–Cu–In–S core (gray) and Zn–Cu–In–S/ZnS core–shell QDs (black), absorbance spectra of core (triangles) and core–shell (squares), and PLE spectrum of Zn–Cu–In–S/ZnS core–shell QDs (circles).

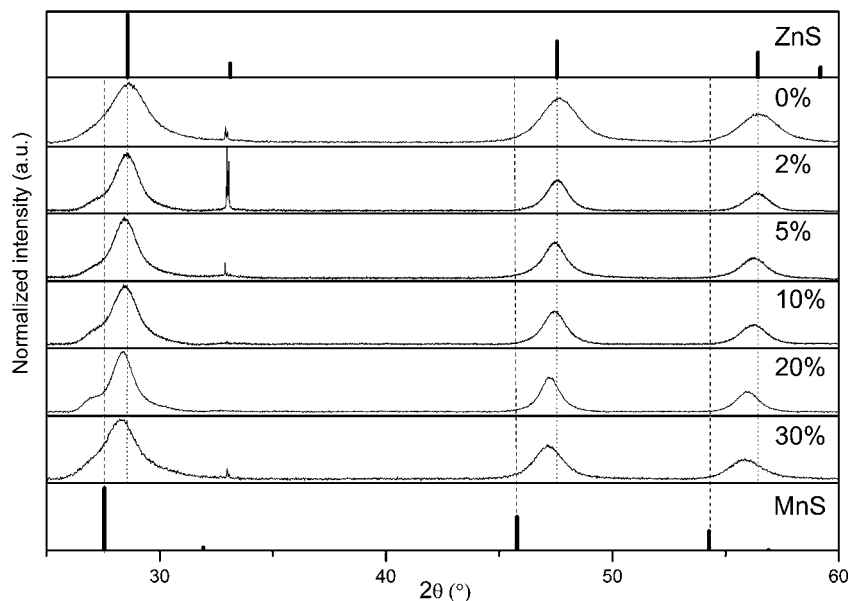


Fig. 2 XRD patterns obtained for different Mn concentrations in the injection solution. Patterns for zinc blende ZnS (JCPDS 03-065-5476) and MnS (JCPDS 03-065-2884) are indicated for reference.

sphalerite structure, with narrow diffraction peaks indicative of large monocrystalline nanoparticles. Using Scherrer's law (see Materials and methods section), the derived crystallite size is around 7 nm for all samples. The diffraction peaks deviate from pure ZnS towards MnS at smaller angles with increasing Mn content in the injection solution. The position of the XRD peaks may be used to determine the final Mn content in the nanocrystals using Vegard's law. In the range of 2% to 30% of Mn compared to the total cation content (Zn + Mn), the Mn proportion measured in the final nanocrystals using XRD closely follows the composition of the injection solution. This was confirmed by elemental analysis using EDS on nanocrystal powders, as shown in Table S1 in ESI.†

In addition, the incorporation of manganese in the ZnS shell is probed using electron paramagnetic resonance (EPR). EPR spectra for samples with different manganese contents are presented in Fig. 3. We observed a classical structure for

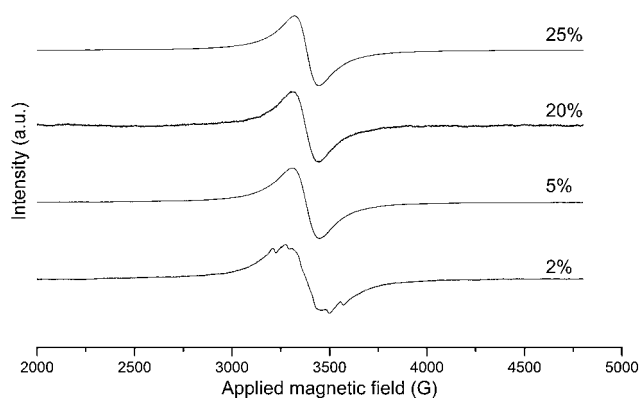


Fig. 3 EPR spectra of Zn-Cu-In-S/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S QDs obtained for various Mn contents.

manganese in zinc sulfide.<sup>35</sup> At very low Mn concentration, up to 2%, these spectra exhibit a six-line hyperfine structure, with a 71 G splitting at 9.7 GHz corresponding to Mn in ZnS.<sup>35</sup> This structure gradually disappears when the manganese content is increased, due to Mn-Mn interactions.<sup>36</sup> Magnetometry measurements at room temperature show a paramagnetic behavior for all samples (see Fig. S2 in ESI.†). This, together with the above results, confirms that Mn is incorporated inside the shell and not only adsorbed at the surface of the QDs.

Incorporation of Mn in the shell did not influence the size or the shape of the nanocrystals: TEM images (Fig. 4a) show nearly spherical nanoparticles of around  $9 \pm 3$  nm in diameter (see Fig. S3(c) in ESI for size distribution†), corresponding to a 2–3 nm Mn<sub>x</sub>Zn<sub>1-x</sub>S shell thickness. Diffraction patterns observed by high resolution TEM confirm the cubic sphalerite crystalline structure of the core-shell nanocrystals (Fig. S3 in ESI.†).

We investigated the influence of Mn : Zn ratio on the optical properties of Zn-Cu-In-S/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S QD. These properties remain quite similar to Zn-Cu-In-S/ZnS QDs, as shown in Fig. 4b and S4 in ESI.† Absorption and photoluminescence excitation spectra show a high absorption at small wavelength, below 350 nm, which reflects the growth of a thick ZnS shell. Similarly to Zn-Cu-In-S/ZnS QDs, the growth of the shell induces a small blue shift due to a limited incorporation of zinc in the core. No systematic additional shift was observed for different Mn content. For these QDs, the bandgap energy is lower than the <sup>4</sup>T<sub>1</sub>-<sup>6</sup>A<sub>1</sub> ligand-field Mn transition,<sup>37</sup> which prescribes energy transfer from the QD bandgap to the Mn centers, so that the QDs retain their core emission properties.<sup>38</sup>

### Relaxivity measurements

There are mainly two strategies to transfer quantum dots into water: encapsulation and ligand exchange.<sup>39</sup> The encapsulation

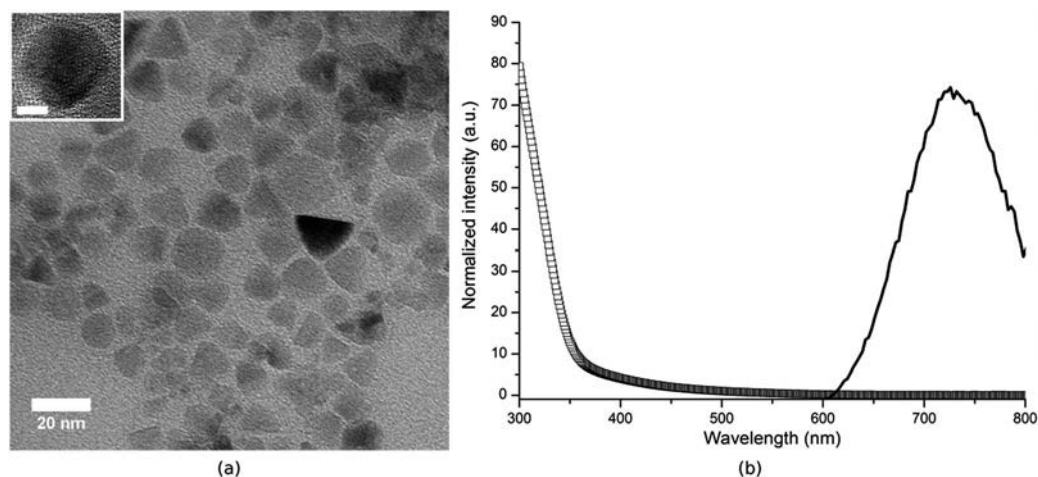


Fig. 4 (a) Typical TEM image (inset: HRTEM image, scale bar: 5 nm), (b) absorbance (squares) and PL (black) spectra of Zn–Cu–In–S–Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S core–shell QDs.

process requires the use of amphiphilic molecules, whose hydrophobic part interacts with the initial hydrophobic ligands of the QD and hydrophilic part ensures water solubility and colloidal stability. This strategy possesses the advantage of an excellent preservation of the fluorescence properties, since the QD surface chemistry is kept unmodified. Their PL stability in water is also superior, as the hydrophobic layer prevents water, ions and small solutes from accessing the QD surface. However, this would potentially limit the MRI response of these probes, as water protons would not be able to reach the close proximity of the paramagnetic Mn ions located in the ZnS shell. In contrast, exchanging the original hydrophobic ligand with new hydrophilic ligands may decrease the PL quantum yields of the QDs due to suboptimal surface passivation and oxidation. However, it enhances proton access to the QD surface, which should translate into better MRI response. Since we expect that the fluorescence sensitivity achieved by our QDs will be higher than for MRI, we chose to use the latter strategy. In addition, ligand exchange generally offers more compact probes compared to encapsulation strategies. We therefore exchanged the original (xanthogenates, oleylamine and/or oleate) ligands by polyethylene glycol (PEG) modified-dihydrolipoic acids (DHLA-PEG).<sup>27</sup> These ligands provide colloidal stability in a wide range of buffers with a reduced non-specific biomolecule adsorption. QDs were then purified using ultrafiltration to remove excess of unbound ligands and possibly desorbed ions, as well as using centrifugation to remove small aggregates. The optical properties remained similar in water (see Fig. S5 in ESI<sup>†</sup>) and we obtained quantum yields up to 20%. The hydrodynamic radius of our QDs capped with DHLA-PEG was measured by DLS and was found to be  $10.8 \pm 0.7$  nm (see Fig. S6 in ESI<sup>†</sup>), consistently with the size of our QDs and of the DHLA-PEG ligands. Zeta potential measurement indicated that our probes were neutral ( $0.5 \pm 0.2$  mV), as expected from PEG-coated nanoparticles.

We then measured the  $r_1$  relaxivity of Zn–Cu–In–S–Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S QDs with different manganese contents using <sup>1</sup>H

NMR in pure water under a 7 T static magnetic field at 300 K. The relaxation rate of water protons increased linearly with the QD concentration for all samples (see Fig. S7 in ESI<sup>†</sup>). We measured the absolute concentration of manganese, indium and zinc using ICP-AES, then normalized by the Mn concentration to derive relaxivity values in  $\text{mM}(\text{Mn})^{-1}\text{s}^{-1}$ , as shown in Fig. 5. At low Mn content, we observe a strong increase in relaxivity with increasing Mn content, from about  $0.01 \text{ mM}(\text{Mn})^{-1}\text{s}^{-1}$  for QDs containing 1% Mn to  $0.5 \text{ mM}(\text{Mn})^{-1}\text{s}^{-1}$  for QDs containing 20% Mn at 7 T. This increase suggests that several Mn participate cooperatively in the relaxation dynamics of water protons diffusing near the surface of the nanoparticle: when the Mn concentration is higher, each Mn participates more efficiently to the water relaxivity. Interestingly, the optimal Mn concentration in ZnS, 20%, is above the solubility of MnS in ZnS at the synthesis temperature (7.5% for bulk materials).<sup>40</sup> It is unclear whether our continuous growth method actually

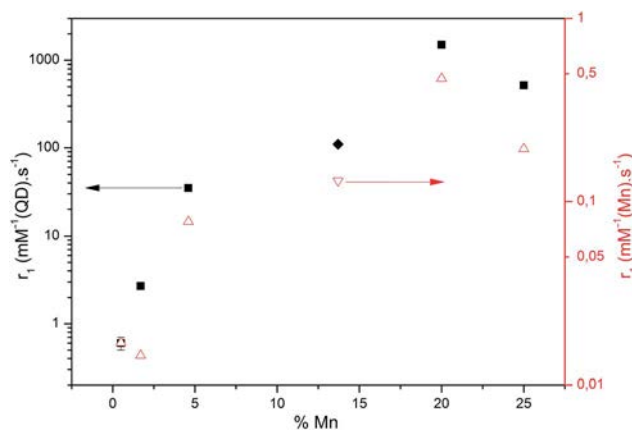


Fig. 5 Longitudinal relaxivity  $r_1$  of Zn–Cu–In–(S, Se)/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S QDs normalized to the Mn (S: triangles; Se: inverted triangles, right axis) or QD (S: squares; Se: diamonds, left axis) concentration as a function of the Mn content in the shell.

leads to epitaxial growth of small MnS nanoclusters or if the Mn ions are dispersed homogeneously in the shell. While bulk MnS is antiferromagnetic,<sup>41</sup> very small MnS clusters may contain uncompensated spins at their boundaries, which could interact with nearby water protons and accelerate their relaxation. With more concentrated samples (such as Zn<sub>0.75</sub>Mn<sub>0.25</sub>S), the effective relaxivity per mmol of manganese decreases. This may be due to the increase of antiferromagnetic coupling between neighbouring manganese atoms.<sup>42</sup>

With respect to the application of our Mn-doped QDs to MRI, it is interesting to consider their “per QD-relaxivity” in mM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, obtained by multiplying the per Mn-relaxivity by the number of Mn per QD, as determined by elemental analysis. This will indeed dictate the local concentration of doped QDs needed to obtain a T1 contrast in a specific tissue. Fig. 5 shows that the per-QD relaxivity first strongly increases with the doping rate, since both the per-Mn relaxivity and the number of Mn per QD increase. The optimal sample, corresponding to a Zn<sub>0.8</sub>Mn<sub>0.2</sub>S shell, presents a  $r_1$  value of 0.5 mM (Mn)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> and 1500 mM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at 7 T. The per-Mn relaxivity is lower than for single ion probes such as Gd-DTPA (3.1 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at 7 T (ref. 43)) and slightly lower than previously reported Mn-doped Si QDs,<sup>44</sup> Zn<sub>0.9</sub>Mn<sub>0.1</sub>S nanocrystals<sup>45</sup> and CdSe/Zn<sub>0.94</sub>Mn<sub>0.06</sub>S QDs.<sup>23</sup> We attribute this difference to the fact that the effect of Mn ions on water protons decreases with the distance to the shell surface, so that Mn ions deeply buried in the shell do not contribute much to the overall relaxivity. On the other hand, our thick shell allows the incorporation of much more Mn ions (3000 Mn/QD for the optimal sample), leading to a maximal relaxivity of 1500 mM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> at 7 T. This high relaxivity should provide a high detection sensitivity for low density biomolecular markers.

Ideally, QDs for *in vivo* imaging should not only emit in the NIR transparency window (700–900 nm) but also be capable to efficiently absorb light in the same region, so that excitation light could efficiently penetrate the tissue and excite the probes. If we select for this purpose an excitation wavelength around 700 nm, optimal NIR QDs should emit further than the 700–750 nm range obtained for our CuInS<sub>2</sub>-based probes in order to optimize their absorption cross-section at 700 nm and be able to efficiently discriminate between excitation back reflection and fluorescence emission. We therefore chose to synthesize Zn–Cu–In–Se/Zn<sub>0.8</sub>Mn<sub>0.2</sub>S core–shell QDs, based on previously reported protocols for cores<sup>16</sup> and protocols similar to those used for Zn–Cu–In–S for the Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S shell. This allowed us to obtain Mn-doped QDs with smaller shell thicknesses (around 1.5 nm) and manganese content (see Table S1 in ESI†), but with an 800 nm centered emission (see Fig. S8 in ESI†), which was better adapted for *in vivo* imaging. The relaxivity of Zn–Cu–In–Se/Zn<sub>0.86</sub>Mn<sub>0.14</sub>S QDs was estimated to be 110 mM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> and 0.13 mM (Mn)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. The relaxivity per Mn atom (Fig. 5, inverted triangle) is comparable with the ones obtained with Zn–Cu–In–S cores. Nonetheless, the per QD relaxivity (Fig. 5, diamond) is lower due to a smaller number of Mn ions incorporated in each QD (around 1000 Mn/QD) and a smaller surface of QDs.

## Mn leaching and cytotoxicity

To ensure a prolonged colocalization of the MRI and fluorescence signals and limit toxicity due to Mn leaching, the paramagnetic Mn dopants must remain inside the QD nanocrystals even after prolonged exposition in a biological medium. Zn–Cu–In–Se/Zn<sub>0.86</sub>Mn<sub>0.14</sub>S QDs were incubated in culture medium at 37 °C and the released Mn ions were quantified by colorimetry. The release of Mn ions was indeed found to be extremely slow: (1.3 ± 0.8)% after 3 days and (2.6 ± 0.9)% after 7 days.

We investigated the cytotoxicity of our probes with or without Mn in the shell using a common colorimetric MTT assay after a 24 h incubation (Fig. S9 in ESI†). Interestingly, the presence of manganese in the QD shell does not increase significantly the cytotoxicity of our QDs, even at millimolar concentrations of Mn. Cellular viability remains above 80% for QD concentrations up to 1 μM, which shows the low toxicity of these QD probes. In comparison, other QDs reported a much stronger toxicity with IC<sub>50</sub> values around 100 nM, such as CdSe/ZnS (45 nM),<sup>46</sup> CdTe/ZnS (100 nM)<sup>47</sup> or InAs/InP/ZnS (≈100 nM).<sup>48</sup> This lower toxicity may be attributable to the large inert ZnS shell and to the virtual absence of released free Mn ions from the QDs at this timescale. We also note that *in vitro* toxicity results cannot be directly extrapolated to *in vivo* toxicity, since it depends on the overall biodistribution and organ specific doses.<sup>49</sup> For example, an absence of acute toxicity has been demonstrated after intravenous injection of relatively high doses of CdSe-based QDs.<sup>11</sup> Since our Cd-free QDs show lower *in vitro* toxicity, we assume that they will also present limited *in vivo* toxicity, even though a comprehensive *in vivo* study is required to fully understand the *in vivo* biological response to our nanoprobables.

## *In vivo* imaging

As a simple proof-of-principle, we chose to demonstrate detection of regional lymph nodes in mice. This required no further functionalization for specific targeting of the QDs, since nanoparticles injected subcutaneously are partly drained through lymph vessels and captured by macrophages in the lymph nodes. In addition, lymph node detection represents a potential clinical application of such probes, as lymph node resection is a common diagnostic procedure in the treatment of breast cancer. A solution containing 4 nmol of Zn–Cu–In–Se/Zn<sub>0.88</sub>Mn<sub>0.12</sub>S QDs emitting at 810 nm and coated with DHLA-PEG was prepared in phosphate buffer saline solution (PBS) and injected in the anterior left paw of a mouse. As previously demonstrated with other PEG-coated NIR emitting QDs, the probes migrated very rapidly to the regional lymph nodes.<sup>15</sup> Using MRI, a strong signal enhancement was clearly visible on T1-weighted images, acquired 20 min after QD injection (Fig. 6), compared to pre-injection images. Near infrared fluorescence images acquired a few minutes later (Fig. 6c) clearly show the two regional lymph nodes previously detected in MRI. Here, the injection point was hidden to increase the contrast. However, the nodes were also visible without hiding it, as shown in Fig. S10 in ESI†. These results demonstrate the good

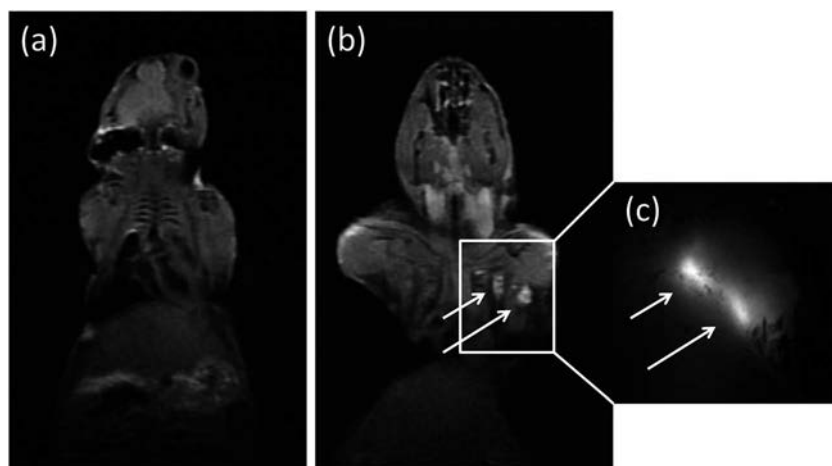


Fig. 6 T1-weighted MRI images of a mouse before (a) and after (b) injection of a solution of Zn–Cu–In–Se/Zn<sub>0.9</sub>Mn<sub>0.1</sub>S QDs and the corresponding NIRF image (c).

colocalization of MR and NIRF contrast in the regional lymph nodes due to the uptake of the Mn-doped QDs.

## Conclusion

In this work, we have described the synthesis of core-shell Zn–Cu–In–(S, Se)/Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S bimodal probes for both near infrared fluorescence imaging and MRI, based on low-toxicity materials. By varying the size and composition of the cores, we were able to tune the emission wavelength of these QDs throughout the “therapeutic window”, the spectral range corresponding to minimum absorption and diffusion of blood and tissues. The growth of a thick shell of Zn<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>S on fluorescent cores not only preserves their fluorescence in water but also confers a paramagnetic character to our probes. Optimization of the nanoparticle size and Mn content leads to  $r_1$  relaxivities in water ranging from 1 to 1500 mM (QD)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, allowing sensitive MR and NIRFI detection. Finally, we have demonstrated the use of these probes *in vivo* for imaging the regional lymph nodes in mice in both NIRFI and MRI. These probes represent promising tools for *in vivo* biological and biomedical imaging due to their high sensitivities and to the well-developed toolbox available for QD functionalization. Further biodistribution and toxicity studies will be required before translating these probes to the medical field.

## Acknowledgements

The authors would like to thank X. Xu for help with TEM, G. Lang for EPR, B. Bresson for NMR and B. Leridon for SQUID. Part of this work was supported by a SESAME grant from Région Ile-de-France and by the Investissement d'avenir project NanoCTC from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (France).

## References

- R. J. Gillies, *J. Cell. Biochem.*, 2002, **87**, 231–238.
- T. F. Massoud and S. S. Gambhir, *Genes Dev.*, 2003, **17**, 545–580.
- R. Weissleder and M. J. Pittet, *Nature*, 2008, **452**, 580–589.
- J. Cheon and J.-H. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1630–1640.
- E. T. Ahrens and J. W. M. Bulte, *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, **13**, 755–763.
- X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538–544.
- H. Mattoussi, G. Palui and H. Bin Na, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 138–166.
- S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 93–97.
- E. Cassette, M. Helle, L. Bezdetnaya, F. Marchal, B. Dubertret and T. Pons, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 719–731.
- J. Mobley and T. Vo-Dinh, in *Biomedical Photonics Handbook*, ed. T. Vo-Dinh, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- L. Ye, K. Yong, L. Liu, I. Roy, R. Hu, J. Zhu, H. Cai, W. Law, J. Liu, K. Wang, J. Liu, Y. Liu, Y. Hu, X. Zhang, M. T. Swihart and P. N. Prasad, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 453–458.
- X. Li, Y. He, S. S. Talukdar and M. T. Swihart, *Langmuir*, 2003, **19**, 8490–8496.
- F. Erogbogbo, K. Yong, I. Roy, R. Hu, W. Law, W. Zhao, H. Ding, F. Wu, R. Kumar, M. T. Swihart and P. N. Prasad, *ACS Nano*, 2011, **5**, 413–423.
- L. Li, T. J. Daou, I. Texier, T. T. Kim Chi, N. Q. Liem and P. Reiss, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 2422–2429.
- T. Pons, E. Pic, N. Lequeux, E. Cassette, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, F. Marchal and B. Dubertret, *ACS Nano*, 2010, **4**, 2531–2538.
- E. Cassette, T. Pons, C. Bouet, M. Helle, L. Bezdetnaya, F. Marchal and B. Dubertret, *Chem. Mater.*, 2010, **22**, 6117–6124.
- K.-T. Yong, I. Roy, R. Hu, H. Ding, H. Cai, J. Zhu, X. Zhang, E. J. Bergey and P. N. Prasad, *Integr. Biol.*, 2010, **2**, 121–129.

- 18 J.-C. Hsu, C.-C. Huang, K.-L. Ou, N. Lu, F.-D. Mai, J.-K. Chen and J.-Y. Chang, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 19257.
- 19 C. Cheng, K. Ou, W. Huang, J. Chen, J. Chang and C. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 4389–4400.
- 20 F. Ducongé, T. Pons, C. Pestourie, L. Hérin, B. Thézé, K. Gombert, B. Mahler, F. Hinnen, B. Kühnast, F. Dollé, B. Dubertret and B. Tavitian, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1921–1926.
- 21 E. Giovanelli, E. Muro, G. Sitbon, M. Hanafi, T. Pons, B. Dubertret and N. Lequeux, *Langmuir*, 2012, **28**, 15177–15184.
- 22 R. Bhargava, D. Gallagher, X. Hong and A. Nurmikko, *Phys. Rev. Lett.*, 1994, **72**, 416–419.
- 23 S. Wang, B. R. Jarrett, S. M. Kauzlarich and A. Y. Louie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3848–3856.
- 24 G. Manna, S. Jana, R. Bose and N. Pradhan, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 2528–2534.
- 25 Q. Liu, R. Deng, X. Ji and D. Pan, *Nanotechnology*, 2012, **23**, 255706.
- 26 B. Lin, X. Yao, Y. Zhu, J. Shen, X. Yang, H. Jiang and X. Zhang, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 3076–3083.
- 27 B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, T. J. Mountziaris and H. Mattoussi, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4949.
- 28 F. B. Serrat, *Mikrochim. Acta*, 1998, **129**, 77–80.
- 29 N. A. Monteiro-Riviere, A. O. Inman and L. W. Zhang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, **234**, 222–235.
- 30 S. Wang, H. Yu and J. K. Wickliffe, *Toxicol. In Vitro*, 2011, **25**, 2147–2151.
- 31 J. J. Li, Y. A. Wang, W. Guo, J. C. Keay, T. D. Mishima, M. B. Johnson and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 12567–12575.
- 32 J. Park and S.-W. Kim, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 3745–3750.
- 33 T. K. C. Tran, Q. P. Le, Q. L. Nguyen, L. Li and P. Reiss, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, **1**, 025007.
- 34 Y. Yang, O. Chen, A. Angerhofer and Y. C. Cao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15649–15661.
- 35 T. Kennedy, E. Glaser, P. Klein and R. Bhargava, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1995, **52**, R14356–R14359.
- 36 Y. Ishikawa, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 1966, **21**, 1473–1481.
- 37 D. Langer and H. Richter, *Phys. Rev.*, 1966, **146**, 554–557.
- 38 R. Beaulac, P. I. Archer, X. Liu, S. Lee, G. M. Salley, M. Dobrowolska, J. K. Furdyna and D. R. Gamelin, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 1197–1201.
- 39 S. B. Brichkin and E. V. Chernykh, *High Energy Chem.*, 2011, **45**, 1–12.
- 40 C. Sombuthawee, S. B. Bonsall and F. A. Hummel, *J. Solid State Chem.*, 1978, **25**, 391–399.
- 41 L. Corliss, N. Elliott and J. Hastings, *Phys. Rev.*, 1956, **104**, 924–928.
- 42 S. H. Koenig and R. D. Brown, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1990, **22**, 487–567.
- 43 C. Kalavagunta, S. Michaeli and G. J. Metzger, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2014, **9**, 169–176.
- 44 C. Tu, X. Ma, P. Pantazis, S. M. Kauzlarich and A. Y. Louie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 2016–2023.
- 45 M. Gaceur, M. Giraud, M. Hemadi, S. Nowak, N. Menguy, J. P. Quisefit, K. David, T. Jahanbin, S. Benderbous, M. Boissière and S. Ammar, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 932–938.
- 46 S. Deka, A. Quarta, M. G. Lupo, A. Falqui, S. Boninelli, C. Giannini, G. Morello, M. De Giorgi, G. Lanzani, C. Spinella, R. Cingolani, T. Pellegrino and L. Manna, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2948–2958.
- 47 Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang and C. Fan, *Biomaterials*, 2009, **30**, 19–25.
- 48 R. Xie, K. Chen, X. Chen and X. Peng, *Nano Res.*, 2008, **1**, 457–464.
- 49 K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman and W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 662–671.

# Time-gated cell imaging using long lifetime near-infrared-emitting quantum dots for autofluorescence rejection

Sophie Bouccara, Alexandra Fragola, Emerson Giovanelli, Gary Sitbon, Nicolas Lequeux, Thomas Pons, and Vincent Loriette\*

Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, UMR 8213, ESPCI Paristech, CNRS, UPMC, 10 rue Vauquelin, Paris, France

**Abstract.** Fluorescence imaging is a promising technique for the detection of individual cell migration. Its sensitivity is, however, limited by a high tissue autofluorescence and a poor visible light penetration depth. In order to solve this problem, the fluorescence signal peak wavelength should lie in an absorption and diffusion free region and should be distinguishable, either spectrally or temporally, from the autofluorescence background. We present, here, the synthesis and characterization of low toxicity Zn–Cu–In–Se/ZnS core/shell quantum dots. Their fluorescence emission wavelength peaks around 800 nm, where the absorption and scattering of tissues are minimal. They are coated with a new ligand, which yields small, stable, and bright individual probes in the live cell cytoplasm, even 48 h after the labeling. Furthermore, these near-infrared-emitting quantum dots have a long fluorescence lifetime component (around 150 ns) compared to autofluorescence (<5 ns). Taking the advantage of this property and coupling these probes to a time-gated detection, we demonstrate efficiently the discrimination between the signal and short lifetime fluorescence such as the autofluorescence. This technique is supported by a method we developed, to massively stain cells that preserves the quantum dot stability and brightness for 48 h. © 2014 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) [DOI: 10.1117/1.JBO.19.5.051208]

Keywords: quantum dots; fluorescence; microscopy; detection; cells.

Paper 130546SSRR received Jul. 31, 2013; revised manuscript received Dec. 5, 2013; accepted for publication Dec. 5, 2013; published online Jan. 6, 2014.

## 1 Introduction

Several *in vivo* cell tracking techniques based on the magnetic resonance imaging or positron emission tomography<sup>1</sup> have been developed but remain challenging for rare and individual cell detection, mainly because of their low-spatial resolution. On contrary, the fluorescence microscopy allows a cell scale detection, but is limited by a low sensitivity. Indeed, absorption and scattering of visible light, as well as tissue autofluorescence degrade image contrast. Time-gated detection has been developed for fluorescence lifetime imaging microscopy measurements<sup>2</sup> and also allows the rejection of short lifetime signals such as tissue autofluorescence.<sup>3–6</sup>

In the last few years, quantum dots have been used as probes for biological applications<sup>7,8</sup> because they combine a high resistance to photobleaching with interesting optical properties: broad absorption cross section, tunable emission wavelength (according to their size and composition) and high fluorescence quantum yields (QY). For fluorescence imaging, there is indeed an “optical therapeutic window” (from 700 to 900 nm), where the absorption and scattering of major tissue chromophores are minimum.<sup>9,10</sup> In this range of wavelengths, *in vivo* fluorescence imaging has been performed due to near-infrared-emitting quantum dots (NIR QDs).<sup>11</sup> Recently, NIR QDs based on I–III–VI materials have emerged<sup>12–14</sup> and exhibit a long fluorescence lifetime (around 150 ns).<sup>15–17</sup> Moreover, unlike other semiconductor nanoparticles emitting in the IR (PbSe, CdTe), they are made of low toxicity materials.<sup>18</sup> Nevertheless, the

current challenge in this range of wavelengths consists of synthesizing probes with high fluorescence QY.<sup>12,15,19–22</sup> Moreover, for cell tracking applications, cells have to be loaded with numerous probes, which have to be equally distributed between the two daughter cells to preserve homogeneous population labeling.

We present here a new synthesis of NIR QDs made of low toxicity materials, emitting at 800 nm, and with fluorescence QY up to 35% in hexane. Their emission wavelength allows an excitation with a red-emitting laser, giving a better light penetration depth in tissues. The quantum dots are coated with a copolymeric ligand we recently developed,<sup>23</sup> which allows one to obtain bright, stable, and homogeneously distributed probes in the cell cytoplasm at least for 48 h. Furthermore, our NIR QDs exhibit a long fluorescence lifetime (around 150 ns) compared to tissue autofluorescence (<5 ns). Due to these unique properties and a time-gated detection on a widefield microscope, these QDs allow significant enhancement of the detection sensitivity of individual cells by efficiently rejecting short fluorescence lifetime signals.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Synthesis of NIR QDs

The synthesis of Zn–Cu–In–Se/ZnS core/shell quantum dots is inspired by Cassette et al.<sup>14</sup> In our core synthesis, all precursors (0.4 mmol of CuCl, 0.4 mmol of InCl<sub>3</sub>, 0.8 mmol of selenourea, and 0.8 mmol of Zn acetate) are introduced in a three-necked

\*Address all correspondence to: Vincent Loriette, E-mail: [sophie.bouccara@espci.fr](mailto:sophie.bouccara@espci.fr)

flask with 10 mL of octadecene (ODE) and 4 mL of trioctylphosphine (TOP), and briefly sonicated. Then, 4 mL of oleylamine (OAm) and 2 mL of dodecanethiol are added. The solution is stirred and degassed for 30 min under vacuum. The flask is then filled with argon and the solution is heated progressively up to 260°C in, typically, 10 min. Heating is stopped immediately after the target temperature is reached and the flask is cooled down to room temperature. The Zn–Cu–In–Se cores are precipitated with ethanol and then dispersed in 10 mL of hexane.

For the shell synthesis, 4 mL of as-prepared cores is dispersed in 4 mL of ODE and 1 mL of OAm into a new three-necked flask. The mixture is degassed under vacuum at 40°C. A solution of zinc ethylxanthate and zinc oleate (respectively, 0.13 mmol and 0.8 mmol) dissolved in ODE (2 mL), TOP (3 mL), and dioctylamine (1 mL) is loaded into an injection syringe. The flask is heated to 190°C and these ZnS precursors are added dropwise in 1 h under argon atmosphere. At the end of the injection, the reaction flask is cooled to room temperature. The resulting Zn–Cu–In–Se/ZnS QDs are finally precipitated with ethanol and redispersed in 10 mL of hexane. Optical spectroscopy characterization is performed using a F900 Edinburgh spectrometer.

## 2.2 Solubilization in Water

The solubilization in water is performed due to a ligand exchange. Four hundreds microliters of the Zn–Cu–In–Se/ZnS QDs are precipitated with ethanol and resuspended in 100  $\mu$ L of mercaptopropionic acid overnight at 60°C. The QDs are dissolved in dimethylformamide (1 mL) and precipitated using potassium *tert*-butoxide. QDs are resuspended in basic water (sodium tetraborate 10 mM, pH 9.2) and mixed with a solution of poly(dithiol-*co*-sulfobetaine) zwitterionic ligands<sup>23</sup> for 12 h at 60°C. After the ligand exchange, the QDs are purified as previously described by Giovanelli et al.

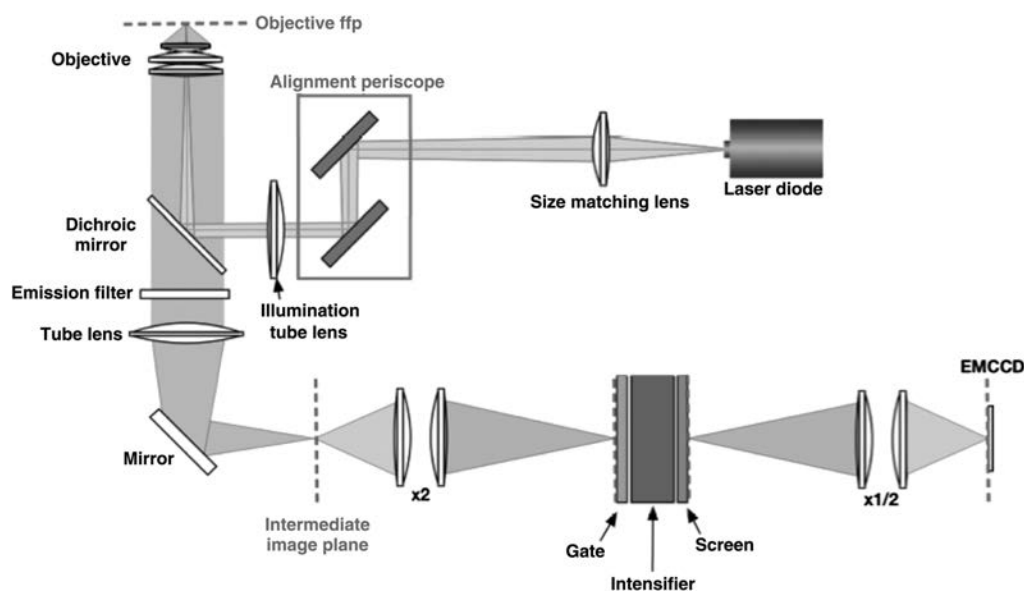
using ultrafiltration and ultracentrifugation. The QDs are finally resuspended in a 20 mM aqueous solution of NaCl.

## 2.3 Cell Labeling

QDs are diluted in Dulbecco's modified Eagle medium enriched with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin antibiotics, later referred to as complete medium. About 500,000 HeLa cells are suspended with 10  $\mu$ M of QDs in a final volume of 100  $\mu$ L in a 2-mm electroporation cuvette. The cuvette is subjected to 0.15 kV for a 30-ms pulse using a Gene Pulser (Biorad, Hercules) electroporator. The cells are rinsed five times with warm complete medium, dispersed in a nonfluorescent imaging medium (OptiMEM® with no phenol red, Life technologies, Carlsbad, California) and deposited on a microscope coverslip (25 mm in diameter). The cells are kept at least for 1 h at 37°C under a 5% of CO<sub>2</sub> atmosphere before imaging.

## 2.4 Optical Setup

The light source used for time-gated imaging (setup shown in Fig. 1) is a picosecond pulsed laser diode (Picoquant PDL 800, Berlin, Germany), emitting at 659 nm, with a 1 or 5 MHz repetition rates injected in the epi-illumination path of a commercial microscope body (Olympus BX51WIF, Shinjuku, Japan). The beam spot size and position on the sample are controlled by an external telescope and periscope. We use a 60 $\times$  water immersion Olympus objective (NA = 1) and a 40 $\times$  Olympus objective (NA = 0.6). We use emission filters to discriminate between the QDs fluorescence and the excitation signal. A relay achromatic pair matches the image size to the intensifier and gate surface (Picostar HRI, LaVision, Goettingen, Germany). The same relay system is placed head to tail between the intensifier and the electron multiplying charge-coupled device (EMCCD) camera (Roper QuantEM 512 C, Photometrics, Tucson, Arizona) to preserve the nominal microscope magnification factor. The laser



**Fig. 1** Optical setup. The sample is illuminated by a pulsed laser diode with a 1 or 5 MHz repetition rate and emitting at 659 nm. The laser and the intensifier are synchronized by two phase-locked function generators.

diode and the intensifier are synchronized by two phase-locked function generators (Agilent 33120A and Agilent 33220A).

## 2.5 Photoluminescence Intensity Decay Measurements

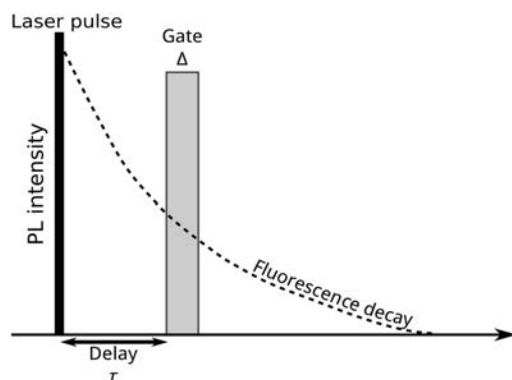
The system described above can be used to carry out photoluminescence (PL) intensity decay measurements. The intensifier is used in a mode in which the gate is driven by a waveform synthesizer. This mode is suited to perform time-gated detection as well as fluorescence intensity decay measurements. PL intensity decays are measured by acquiring a sequence of images, while phase shifting a 200-ns width gate trigger signal with respect to the laser trigger, as illustrated in Fig. 2. This introduces a controllable time delay,  $\tau$ , between the laser excitation and the beginning of the detection gate. Thus, for each gate position, an image is acquired. A common region of interest (ROI) for all images is selected and for each image, the average intensity of the ROI pixels is measured. The image offset, induced by the camera or by the external light sources, is eliminated by recording a sequence without laser excitation and subtracting the average of the pixel intensity of the same ROI from the original sequence. The results are then normalized to the measure obtained after the laser pulse. For fluorescence decay measurements, we typically use radio frequency gain at 30% and Micro Channel Plate gain at 700 V and an input driving peak to peak voltage of 2 V.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 NIR QDs as Stable Probes for Cell Imaging

#### 3.1.1 Spectroscopic characterization of NIR QDs

We have developed and optimized the synthesis of NIR emitting Zn–Cu–In–Se/ZnS core/shell QDs. Compared to the previously reported Cu–In–Se/ZnS QDs,<sup>14,24</sup> we note that the incorporation of zinc during the core synthesis improves their fluorescence QY, and provided us with brighter core/shell QDs, as already noted with Zn–Cu–In–S QDs.<sup>13,20,25</sup> This has been putatively attributed to defect passivation and filling of vacancy sites by Zn atoms inside the QD cores. The QD size is estimated at typically 3 nm by electron microscopy and x-ray diffraction (data not shown). The initially hydrophobic QDs are solubilized

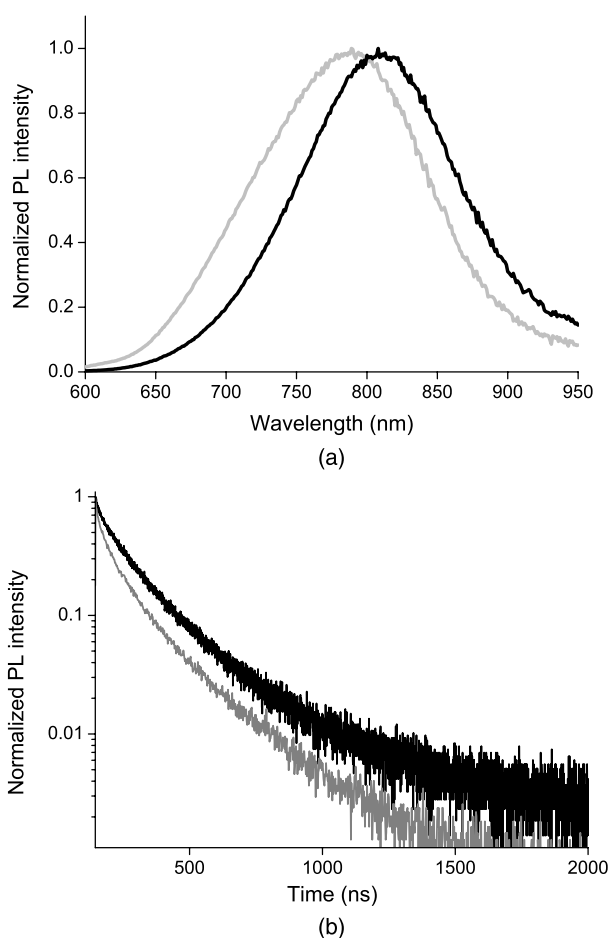


**Fig. 2** Principle of photoluminescence intensity decay measurements. For each gate position, an image is acquired and the intensity of a region of interest is measured.

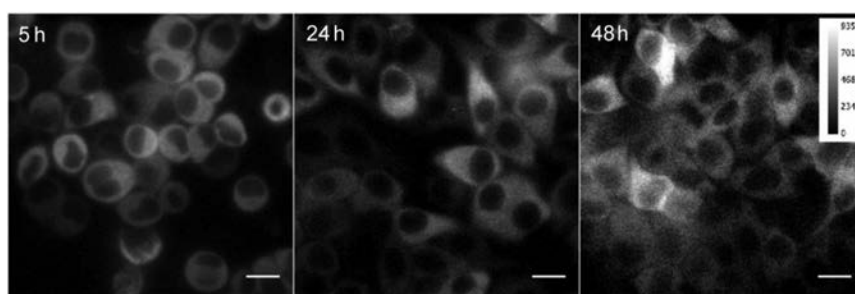
in water as described in Sec. 2. These ligands provide suitable long-term colloidal and intracellular stability for our NIR QDs as will be demonstrated below.

Figure 3 presents the emission spectra of our NIR QDs in hexane and water, as well as the PL intensity decays. The emission (with an FWHM of around 130 nm) is centered around 800 nm, which corresponds to the “optical therapeutic window” for *in vivo* fluorescence imaging, in which the tissue penetration is maximal.<sup>9,10</sup> Fluorescence QY measurements gave typical values of 35% for QDs in hexane and 20% for QDs in aqueous solution after ligand exchange. We have observed that the emission is slightly blue shifted after ligand exchange, which could be attributed to a slight etching of the QD surface, or to better PL QY preservation of bluer-emitting QDs during the ligand exchange.

PL decays are multiexponential with a slow component, typically from 150 to 200 ns, compared to II–VI QDs, which usually decay in <20 ns.<sup>4,26</sup> This slow component is dominant. It can be related to a donor–acceptor transition and defect recombination. In fact, the localization of the exciton electron on Cu atoms strongly reduces the exciton overlap in these QDs and yields longer excitonic lifetimes.<sup>15</sup> This type of recombination also explains the broad emission spectra compared to II–VI QDs.<sup>16</sup> A shorter component between 10 and 60 ns is



**Fig. 3** (a) Normalized photoluminescence spectra. (b) Normalized photoluminescence intensity decays of near-infrared-emitting quantum dots (NIR QDs) in hexane (black) and water (gray).



**Fig. 4** Fluorescence microscopy images of HeLa cells electroporated with NIR QDs at different times after the electroporation: 5, 24, and 48 h (scale bar: 16  $\mu\text{m}$ ).

mainly due to intrinsic recombination of initially populated core states or surface states.<sup>16</sup>

### 3.1.2 Labeling of live cells and NIR QDs stability

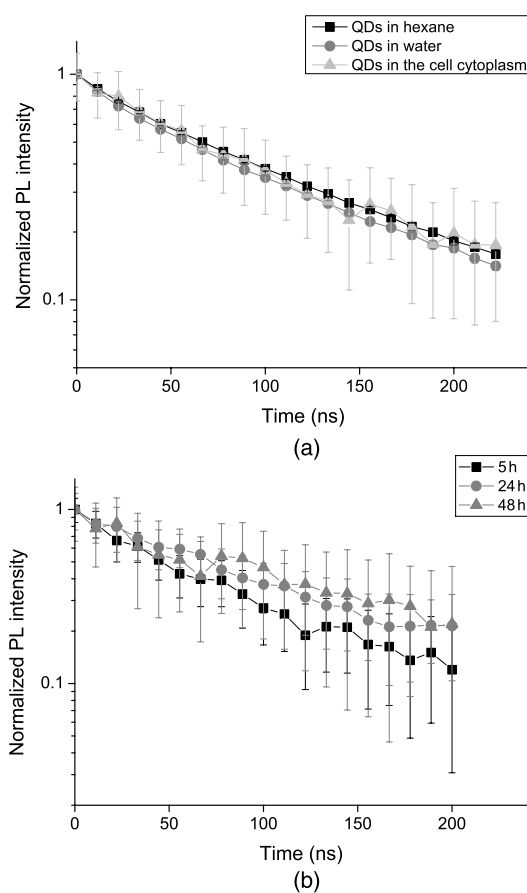
As we aim to track cells over a few days, they need to be stained with a very high concentration of probes. Indeed, the cell division leads to a QDs dilution between two daughter cells. For this reason, we choose electroporation within the several techniques<sup>27</sup> because it allows one to obtain cells which are massively loaded with QDs in their cytoplasm.

Moreover, cell tracking experiments require highly stable intracellular probes. QDs have to remain individual and freely diffusing in order to be equally distributed in two daughter cells. Muro et al.<sup>28</sup> observed that the cytoplasmic aggregation kinetics depend strongly on the nanoparticle surface chemistry. Consequently, we have chosen to coat our quantum dots with a multidentate ligand which allows a high stability in cells for visible emitting quantum dots during several days.<sup>23</sup> Figure 4 shows images of living HeLa cells electroporated with NIR QDs, obtained at different times after the electroporation (5, 24, and 48 h). In order to visually compensate for the diminution of the fluorescence signal induced by QD dilution after each cell division, the intensity level of the middle image (24 h) was doubled and the level of the last image (48 h) was quadrupled according to the number of cell divisions. The original images exhibit average levels compatible with one and two division stages and no leaking of QDs. The images in Fig. 4 show that NIR QDs coated with this surface chemistry stay bright and homogeneously distributed in the cell cytoplasm for several days. Moreover, while initial free-floating cells are round (Fig. 4, 5 h), they become adherent on the coverslip the day after the electroporation (Fig. 4, 24 h). This, together with their preserved mitotic activity, is coherent with an expected low level of toxicity.<sup>29</sup>

As we intend to couple these probes to a time-gated detection, we have to verify that they keep their long fluorescence lifetime in different media and in the cell cytoplasm with time. We have measured the fluorescence intensity decays on three different samples in order to observe the influence of the QDs surrounding medium on their fluorescence lifetime. The lifetime measurements have been performed as described above in Sec. 2.5. Figure 5(a) shows fluorescence intensity decays obtained for three NIR QD samples: in hexane, in water (after ligand exchange), and in the cytoplasm of living cells. We performed the same experiment to measure fluorescence decays in the cell cytoplasm at different times after the

electroporation (5, 24, and 48 h). We have fitted the fluorescence decay curves by a multiexponential curve with two major components and presented the different parameters in Table 1. The corresponding values of each parameter  $\tau_1$  and  $\tau_2$  are equatable from one curve to the other, taking into account the standard deviations.

The decay kinetics remain unchanged not only in different media [Fig. 5(a)] but also in the cell cytoplasm even after



**Fig. 5** (a) Normalized fluorescence intensity decay measurements of NIR QDs in different media (hexane, water, and cell cytoplasm). (b) Normalized fluorescence intensity decay of NIR QDs in the cell cytoplasm at different times after the electroporation (5, 24, and 48 h).

**Table 1** Numerical values of  $\tau_1$  and  $\tau_2$  used to fit our fluorescence decay curves in Fig. 5 and their respective weights,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ .

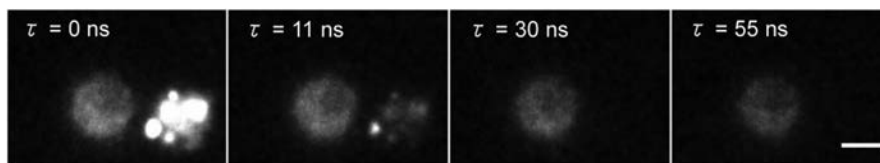
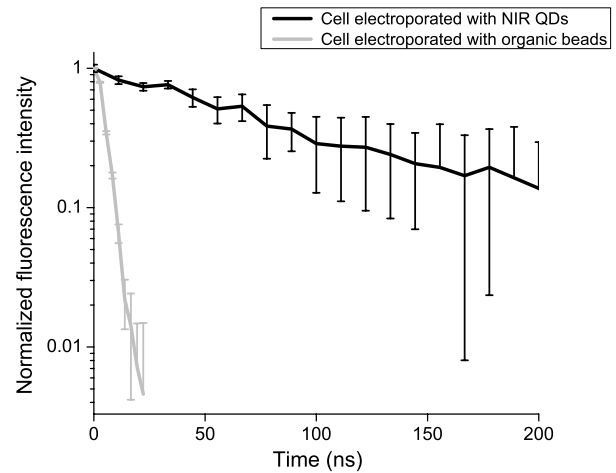
| Sample                | $\alpha_1$ | $\tau_1$ (ns) | $\alpha_2$ | $\tau_2$ (ns) |
|-----------------------|------------|---------------|------------|---------------|
| QDs in hexane         | 0.05       | $28 \pm 1.8$  | 0.95       | $138 \pm 2$   |
| QDs in water          | 0.05       | $25 \pm 1.8$  | 0.95       | $134 \pm 2.7$ |
| QDs in cell cytoplasm | 0.15       | $60 \pm 25$   | 0.85       | $177 \pm 78$  |
| 5 h                   | 0.2        | $39 \pm 10$   | 0.8        | $142 \pm 35$  |
| 24 h                  | 0.15       | $60 \pm 25$   | 0.85       | $177 \pm 78$  |
| 48 h                  | 0.05       | $31 \pm 11$   | 0.95       | $197 \pm 37$  |

3 days [Fig. 5(b)], reflecting the long-term stability of QDs in the cytoplasmic medium, and confirming the possibility to use them to label cells for tracking applications.

### 3.2 NIR QDs Coupled to Time-Gated Detection for Short Lifetime Autofluorescence Rejection

#### 3.2.1 Proof of principle

We demonstrate the increase of sensitivity by combining time-gated fluorescence detection with cells labeled with our long PL lifetime NIR QDs. To this end, we have imaged simultaneously cells electroporated with NIR QDs and cells electroporated with NIR fluorescent beads (beads coated with NIR organic fluorophores, F8783, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, California) with a very short fluorescence lifetime ( $\tau < 5$  ns). The cells have been rinsed, mixed together, and deposited on the same coverslip. As described in Sec. 2, we have illuminated the cells with the pulsed laser source at 1 MHz and imaged them through 200-ns gate. For this study, we did not investigate the influence of these two parameters that have been fixed arbitrarily. Each image has been acquired using a different delay  $\tau$ , between the laser pulse excitation and the opening of the gate. We have varied this delay between 0 and 200 ns with 2.7 ns steps. The camera exposure duration was fixed to 150 ms. Figure 6 shows examples of time-gated images of two cells taken at delay 0, 11, 30, and 50 ns. The left cell was stained with NIR QDs and the right one with fluorescent beads. The progressive disappearance of the cell stained with the fluorescent beads (right) clearly illustrates the rejection of the short lifetime signal as the delay increases. Figure 7 is a plot of the fluorescence intensity decay of the two cells shown in Fig. 6. The signal was averaged over the central  $10 \times 10$  pixels area of each cell. At zero delay, the ratio between the fluorescent beads signal and the QD signal is 2.5. At a delay of  $27 \pm 2.7$  ns, the fluorescent beads signal goes below the noise level. This is thus the optimal delay for opening the gate. We

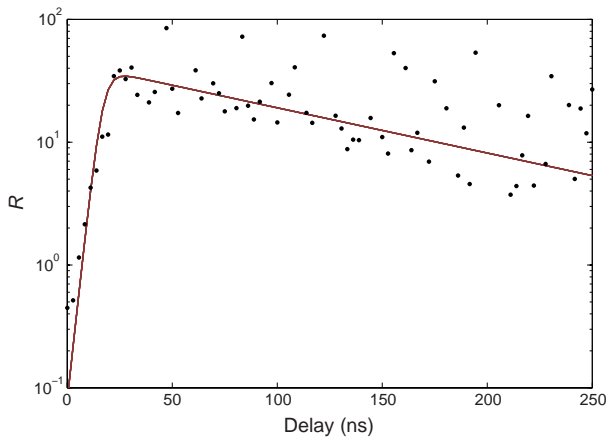

**Fig. 6** Images of HeLa cells labeled with NIR QDs (cell on the left) or beads containing NIR fluorescent organic dyes (cell on the right) at different delays  $\tau$  after the laser pulse. (scale bar:  $10 \mu\text{m}$ ).

**Fig. 7** Fluorescence intensity decay measurements of NIR QDs and fluorescent beads in cells.

characterized the efficiency of the gated detection by defining a parameter  $R(\tau)$  which corresponds to the ratio of the signal from NIR QDs on the background noise and the spurious fluorescence signal corresponding to short lifetime signal. It can be written as

$$R(\tau) = \frac{S_{\text{QD}}(0) \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_{\text{QD}}}\right)}{N + S_{\text{fluor}}(0) \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_{\text{fluor}}}\right)}, \quad (1)$$

where  $S_{\text{QD}}(0)$  and  $S_{\text{fluor}}(0)$  are, respectively, the signal from the quantum dots and fluorescent beads at zero delay,  $N$  is the background noise level, and  $\tau$  is the gate delay.  $N$  depends on the gate width but not on the delay.  $\tau_{\text{QD}}$  and  $\tau_{\text{fluor}}$  are the fluorescence lifetimes of QDs and short lifetime fluorophores, respectively. As long as the denominator in Eq. (1) is dominated by the spurious fluorescence, the  $R(\tau)$  ratio increases as  $\exp[\tau(1/\tau_{\text{fluor}} - 1/\tau_{\text{QD}})]$ . If, on the contrary, the background noise is dominant, the  $R(\tau)$  ratio decreases as  $\exp(-\tau/\tau_{\text{QD}})$ . This behavior is illustrated in Fig. 8, where we plotted  $R$  measured on the images presented in Fig. 6, as a function of the delay. The solid gray curve is a fit of the data with the function of Eq. (1). The fit allowed us to estimate the fluorescence lifetimes: we found  $\tau_{\text{fluor}} = 2.7 \pm 0.3$  ns and  $\tau_{\text{QD}} = 120 \pm 30$  ns and a maximum  $R(\tau)$  ratio obtained at  $\tau = 28$  ns. The  $R(\tau)$  ratio increases by two orders of magnitude: at  $R(\tau = 0 \text{ ns}) = 0.44$  and  $R(\tau = 28 \text{ ns}) = 40$ .

In order to quantify the time-gated detection efficiency, we define a fluorescence rejection factor as the ratio between the QD signal and the spurious fluorescence signal, normalized by the same ratio without time-gated detection. It can be written as



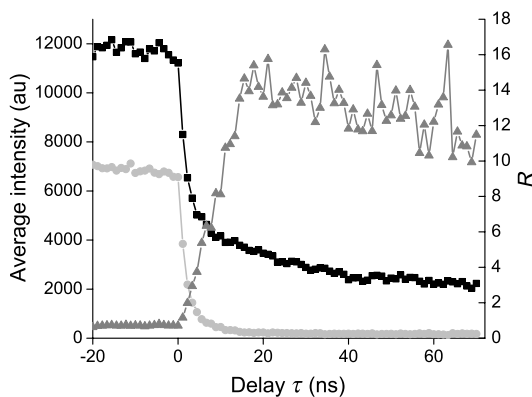
**Fig. 8** Ratio  $R$  for our data (dots) and best (gray curve) fit using Eq. (1) as the fitting function.

$$G(\tau) = \frac{1 - \exp\left(-\frac{\Delta}{\tau_{\text{fluo}}}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{QD}}}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{\Delta}{\tau_{\text{QD}}}\right) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{fluo}}}\right)}, \quad (2)$$

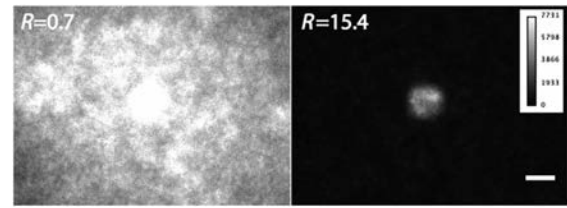
with  $\Delta$  the gate width. Using the estimated values of the lifetimes, we obtain  $G(\tau = 28 \text{ ns}) = 3.4 \times 10^4$ . The high value of the rejection factor is obtained due to the long fluorescence lifetime of NIR QDs in the cell cytoplasm. The optimal gate delay is fixed by spurious fluorescence level and lifetime and by the background noise level. It depends only weakly on the QDs' lifetime and can be optimized independently on the QD characteristics.

### 3.2.2 Ex vivo experiment

We have deposited HeLa cells previously electroporated with NIR QDs on a thin slice of *ex vivo* tissue of beef muscle. This corresponds to a situation where the QDs' signal is superimposed to the autofluorescence one, compared to the previous experiments where both the signals were spatially decorrelated. We have illuminated the sample with the pulsed laser source at 5 MHz and imaged it through a 160 ns gate width. All images have been acquired with an exposure time of 100 ms and each



**Fig. 9** Average intensity at the cell location (black squares), average intensity of the autofluorescence (gray circles), and ratio  $R$  (dark gray triangles).



**Fig. 10** Images of NIR QDs stained cell for different positions of the gate detection (scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ).

image corresponds to an open gate position relative to the laser pulse at the zero delay  $\tau = 0$ .

Figure 9 is a plot of the average intensity at the cell location (NIR QDs and tissue autofluorescence and noise) (black curve), the average intensity next to the cell location (tissue autofluorescence and noise) (gray curve) and the ratio  $R(\tau)$  as defined in the previous section.

For  $\tau < 0$  ns, which corresponds to a gate that is open when the laser pulse illuminates the sample, the autofluorescence signal dominates the NIR QDs one. Thus, both the signals are nearly constant and we mainly detect signal from tissue autofluorescence. For positive values of  $\tau$ , since autofluorescence has a short fluorescence lifetime ( $< 5$  ns), its contribution falls rapidly. At  $\tau = 17.7$  ns, when the autofluorescence signal falls below the noise level,  $R$  reaches its highest value:  $R(\tau = 17.7) = 15.4$ . This maximum represents an increase by more than an order of magnitude compared to zero delay [ $R(\tau = 0) = 0.6$ ], demonstrating the important benefit of our system. Then,  $R$  decreases following the QDs' fluorescence decay.

Figure 10 shows images of the sample for two different time delays. On the left image, the gate opens before the laser impulsion, and both fluorescence from the cell and fluorescence from the tissue (autofluorescence) contribute to the signal. On the right image, the gate opens with a delay  $\tau = 17.7$  ns after the laser pulse.

This experiment demonstrates that autofluorescence rejection through time-gated detection of long lifetime NIR-QDs exhibits performances and gain in sensitivity when a single cell is embedded within a strongly autofluorescent environment.

## 4 Summary

We have synthesized and characterized new biocompatible NIR QDs for *in vivo* fluorescence imaging. These probes remain stable, bright, and homogeneously distributed in the cell cytoplasm. They also keep their long fluorescence decay in different media, including in the cell cytoplasm of living cells, at least for 48 h. Due to these properties, we demonstrated that we could couple these probes to a widefield time-gated imaging and efficiently discriminate between NIR QDs emission and spurious short lifetime signals, such as autofluorescence in an *ex vivo* sample. This combination of probes and widefield time-gated detections could be functional for *in vivo* cell tracking, where the autofluorescence is the main limitation.

### Acknowledgments

Part of this work was funded by "les Laboratoires Servier" and the "Investissement d'Avenir project Nano-CTC." We would like to thank Anne Simon for her help on cell culture and Aurore Bournigault-Nuquet for her help on the instrument characterization.

## References

- H. Hong et al., "Non-invasive cell tracking in cancer and cancer therapy," *Curr. Top. Med.* **10**(12), 1237–1248 (2010).
- D. Elson et al., "Biomedical applications of fluorescence lifetime imaging," *Opt. Photonics News* **13**(11), 36–32 (2002).
- R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis," *Ann. Rev. Phys. Chem.* **47**, 555–606 (1996).
- M. Dahan et al., "Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots," *Opt. Lett.* **26**(11), 825–827 (2001).
- A. May et al., "Whole-body, real-time preclinical imaging of quantum dot fluorescence with time-gated detection," *J. Biomed. Opt.* **14**(6), 060504 (2009).
- G. Mandal et al., "Cadmium-free quantum dots as time-gated bio-imaging probes in highly-autofluorescent human breast cancer cells," *Chem. Commun.* **49**(6), 624–626 (2013).
- X. Michalet et al., "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," *Science* **307**(5709), 538–544 (2005).
- M. Bruchez, Jr. et al., "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," *Science* **281**(5385), 2013–2016 (1998).
- Q. Ma and X. Su, "Near-infrared quantum dots: synthesis, functionalization and analytical applications," *Analyst* **135**(8), 1867–1877 (2010).
- J. Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging," *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**(5), 626–634 (2003).
- S. Kim et al., "Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping," *Nat. Biotechnol.* **22**(1), 93–97 (2004).
- L. Li et al., "Highly luminescent CuInS<sub>2</sub>/ZnS core/shell nanocrystals: cadmium-free quantum dots for in vivo imaging," *Chem. Mater.* **21**(12), 2422–2429 (2009).
- T. Pons et al., "Cadmium-free CuInS<sub>2</sub>/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity," *ACS Nano* **4**(5), 2531–2538 (2010).
- E. Cassette et al., "Synthesis and characterization of near-infrared Cu–In–Se/ZnS core/shell quantum dots for in vivo imaging," *Chem. Mater.* **22**(22), 6117–6124 (2010).
- L. Li et al., "Efficient synthesis of highly luminescent copper indium sulfide-based core/shell nanocrystals with surprisingly long-lived emission," *J. Am. Chem. Soc.* **133**(5), 1176–1179 (2011).
- H. Zhong et al., "Controlled synthesis and optical properties of colloidal ternary chalcogenide CuInS<sub>2</sub> nanocrystals," *Chem. Mater.* **20**(20), 6434–6443 (2008).
- T. K. C. Tran et al., "Time-resolved photoluminescence study of CuInS<sub>2</sub>/ZnS nanocrystals," *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **1**(2), 025007 (2010).
- A. L. Rogach et al., "Infrared-emitting colloidal nanocrystals: synthesis, assembly, spectroscopy, and applications," *Small* **3**(4), 536–557 (2007).
- B. Chen et al., "Highly emissive and color-tunable CuInS<sub>2</sub>-based colloidal semiconductor nanocrystals: off-stoichiometry effects and improved electroluminescence performance," *Adv. Funct. Mater.* **22**(10), 2081–2088 (2012).
- J. Zhang, R. Xie, and W. Yang, "A simple route for highly luminescent quaternary Cu–Zn–In–S nanocrystal emitters," *Chem. Mater.* **23**(14), 3357–3361 (2011).
- H. Nakamura et al., "Tunable photoluminescence wavelength of chalcopyrite CuInS<sub>2</sub>-based semiconductor nanocrystals synthesized in a colloidal system," *Chem. Mater.* **18**(14), 3330–3335 (2006).
- P. M. Allen and M. G. Bawendi, "Ternary I–III–VI quantum dots luminescent in the red to near-infrared," *J. Am. Chem. Soc.* **130**(29), 9240–9241 (2008).
- E. Giovannelli et al., "Highly enhanced affinity of multidentate versus bidentate zwitterionic ligands for long-term quantum dot bioimaging," *Langmuir* **28**(43), 15177–15184 (2012).
- J. Park et al., "CuInSe/ZnS core/shell NIR quantum dots for biomedical imaging," *Small* **7**(22), 3148–3152 (2011).
- L. De Trizio et al., "Strongly fluorescent quaternary CuIn–Zn–S nanocrystals prepared from Cu<sub>1-x</sub>InS<sub>2</sub> nanocrystals by partial cation exchange," *Chem. Mater.* **24**(12), 2400–2406 (2012).
- J. A. Kloepfer, S. E. Bradforth, and J. L. Nadeau, "Photophysical properties of biologically compatible CdSe quantum dot structures," *J. Phys. Chem. B* **109**(20), 9996–10003 (2005).
- A. Derfus, W. Chan, and S. Bhatia, "Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking," *Adv. Mater.* **16**(12), 961–966 (2004).
- E. Muro et al., "Comparing intracellular stability and targeting of sulfobetaine quantum dots with other surface chemistries in live cells," *Small* **8**(7), 1029–1037 (2012).
- M. Helle et al., "Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model," *PLoS One* **7**(8), e44433 (2012).

**Sophie Bouccara** is currently a PhD student at the Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux. She received her MSc in optics for biomedical applications from the Université Pierre et Marie Curie in 2011. Her research focuses on the combination of the synthesis of near-infrared fluorescent biological probes with time resolved widefield microscopy in order to follow metastatic cells migration *in vivo*.

**Alexandra Fragola** is an assistant professor at Pierre et Marie Curie University, where she obtained a PhD in 2003 under the supervision of Claude Bouccara and Lionel Aigouy in near-field microscopy. At the Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux, she is currently developing super-resolution fluorescence microscopes for live cell and *in vivo* imaging, using time-gated detection, structured illumination techniques, and adaptive optics.

**Emerson Giovannelli** is currently a teaching assistant in the quantum dot group of the Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux at ESPCI ParisTech. He graduated from the French Grande Ecole Chimie ParisTech, together with a MSc in organic chemistry from University of Paris VI (2003), and received his PhD from University of Paris XI (2008). His research focuses on quantum dots' surface chemistry and functionalization for water solubilization and *in vivo* applications.

**Gary Sitbon** is currently a PhD student at the Physics and Materials Study Laboratory, Paris. He received his Msc in nanomaterials science from Pierre and Marie Curie University, Paris, in 2011. His current research focuses on the synthesis of magnetic and fluorescent nanocrystals for biomedical applications in order to guide the surgical intervention.

**Nicolas Lequeux** is a professor of solid chemistry at the Ecole Supérieure de Chimie et Physique Industrielles de Paris. He received a PhD degree from University Paris-Sud (1990) and has been at ESPCI since 1991. His research focuses on chemistry of materials (ceramics and cements) and more recently on inorganic nanoparticle synthesis and functionalization.

**Thomas Pons** is a research scientist at the Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux. He received his PhD in 2004 from Université Pierre et Marie Curie under the supervision of Jerome Mertz. After a postdoctoral fellowship at the Naval Research Laboratory under the direction of Hedi Mattoussi, he joined the LPEM where he is currently developing multifunctional quantum dot and nanoparticle probes for biological applications, including cellular and *in vivo* imaging.

**Vincent Loriette** is a research scientist at the Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux. He received his PhD in astrophysics in 1995 from Université Denis Diderot under the supervision of Claude Bouccara. Until 2007, he was developing the optical metrology instruments for the Virgo project (gravitational wave detector). He is currently developing fluorescence microscopes with the extended spatial resolution or wide field optical sectioning properties.

## Highly Enhanced Affinity of Multidentate versus Bidentate Zwitterionic Ligands for Long-Term Quantum Dot Bioimaging

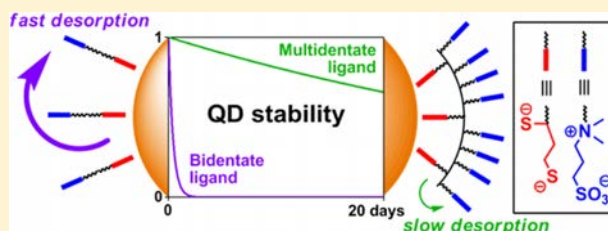
Emerson Giovanelli,<sup>†</sup> Eleonora Muro,<sup>†</sup> Gary Sitbon,<sup>†</sup> Mohamed Hanafi,<sup>‡</sup> Thomas Pons,<sup>†</sup> Benoît Dubertret,<sup>†</sup> and Nicolas Lequeux<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 8213, Université Pierre et Marie Curie, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

<sup>‡</sup>Laboratoire Physico-chimie des Polymères et Milieux Dispersés—Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 7615, Université Pierre et Marie Curie, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

### Supporting Information

**ABSTRACT:** High colloidal stability in aqueous conditions is a prerequisite for fluorescent nanocrystals, otherwise known as “quantum dots”, intended to be used in any long-term bioimaging experiment. This essential property implies a strong affinity between the nanoparticles themselves and the ligands they are coated with. To further improve the properties of the bidentate monozwitterionic ligand previously developed in our team, we synthesized a multidentate polyzwitterionic ligand, issued from the copolymerization of a bidentate monomer and a monozwitterionic one. The nanocrystals passivated by this polymeric ligand showed an exceptional colloidal stability, regardless of the medium conditions (pH, salinity, dilution, and biological environment), and we demonstrated the affinity of the polymer exceeded by 3 orders of magnitude that of the bidentate ligand (desorption rates assessed by a competition experiment). The synthesis of the multidentate polyzwitterionic ligand proved also to be easily tunable and allowed facile functionalization of the corresponding quantum dots, which led to successful specific biomolecules targeting.



## INTRODUCTION

Colloidal semiconductor nanoparticles, named “quantum dots” (QDs), are crystalline objects that exhibit specific fluorescence properties. Their absorption cross section is very large, they are bright, and their emission spectra have a small full width half-maximum and a peak wavelength that is tunable as a function of their composition and their size (in the range of a few nanometers). They are also far more resistant to photo-bleaching than traditional organic dyes. These unique features make them very attractive for diverse applications in the field of medical and biological imaging, such as individual proteins monitoring, multicolor immunostaining, stem cells tracking, or optically assisted surgery.<sup>1,2</sup>

However, typical QD syntheses provide colloidal solutions of fluorescent nanocrystals capped with hydrophobic ligands, whereas the use of QDs in live-cell imaging requires their complete solubility in water as well as an excellent compatibility with biological media. To make the QDs water-soluble, two major methods exist:<sup>3</sup> either the encapsulation of as-synthesized QDs with amphiphilic molecules into micelle-like structures<sup>4,5</sup> or a cap exchange, consisting in the replacement of original ligands by hydrophilic ones, bearing a chemical function able to bind to the nanocrystal surface.<sup>6,7</sup> Encapsulation is a very mild method, leading to the brighter nanoparticles, whereas cap exchange results in much smaller and more stable QDs. For both techniques, the nonspecific interactions of the QD with cell membranes or with

biomolecules in general depend mainly on the moieties that are adsorbed on the QD surface. In comparison to encapsulation, ligand exchange provides a versatile method to control the size, the nature of the ligand, as well as its affinity for the QD surface (ligands that are too strong can indeed dissolve the QD, while ligands that are not strong enough can detach from the QD surface). This versatility explains why cap exchange is by far the most common technique to make the QDs water-soluble.

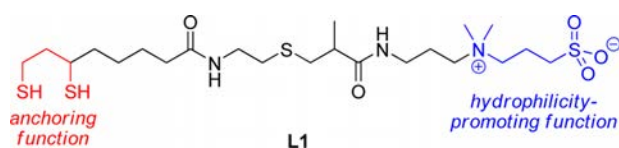
Ligand desorption is a strong limitation for the use of QDs in bioimaging. In high diluted conditions, this desorption causes indeed a loss of colloidal stability and functionality, as well as an increase in aggregation and nonspecific adsorption. As a consequence, continued efforts have been made to improve the affinity of passivating ligands for the QD surface. For this purpose, many types of ligands have been developed so far, and most of them include a thiol as anchoring function,<sup>6,8</sup> due to the particularly strong affinity of sulfur for the metallic cations that form the surface of QDs. In this series, previous studies have made out that dithiol ligands offered a better grip on the nanoparticles than those based on a single thiol group.<sup>9,10</sup> To further enhance this effect, many groups have achieved polythiols syntheses.<sup>11–13</sup> Nevertheless these developments

Received: July 18, 2012

Revised: September 24, 2012

suffer from a lack of systematic studies to appreciate the actual benefit of such a multiplication of the anchoring groups. The design of these replacing ligands is also guided by further needs for biological applications of quantum dots, namely: small size; stability over a large pH range, at elevated salt concentrations and in a cellular medium; low nonspecific adsorption; and possible functionalization afterward. To match the above-mentioned criteria, we used the cap exchange method and we first developed a zwitterionic ligand **L1** connecting a dithiol, as bidentate linking function, to a sulfobetaine part, as aqueous solubility promoter (Scheme 1).<sup>14</sup> Note that this particular

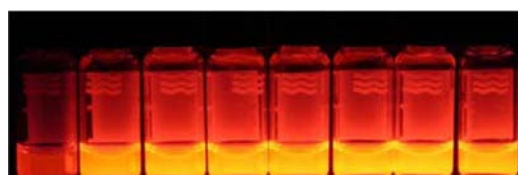
### Scheme 1. Chemical Structure of Ligand L1



hydrophilic group exhibits similar antibiofouling properties as the usually employed long poly(ethylene glycol) chains, with the advantage that it results in QDs with smaller size that are soluble in a wide range of pH and salinity.<sup>15</sup> CdSe/CdS/ZnS core/shell quantum dots covered with this ligand exhibited all of the expected properties, but they suffered from a lack of colloidal stability, mainly at high nanoparticle dilutions, due to ligand desorption. This highlights that ligand stability onto QDs, which is closely related to its affinity for the surface of the nanocrystals, is a key point to improve QD colloidal stability. We report here the synthesis of a new polymeric ligand and quantitative measurements of its anchoring properties to demonstrate that multiplication of anchoring groups on polymeric ligands leads to a greatly enhanced stability on the QD surface, allowing an extension of QD-based live cell observation times.

## RESULTS AND DISCUSSION

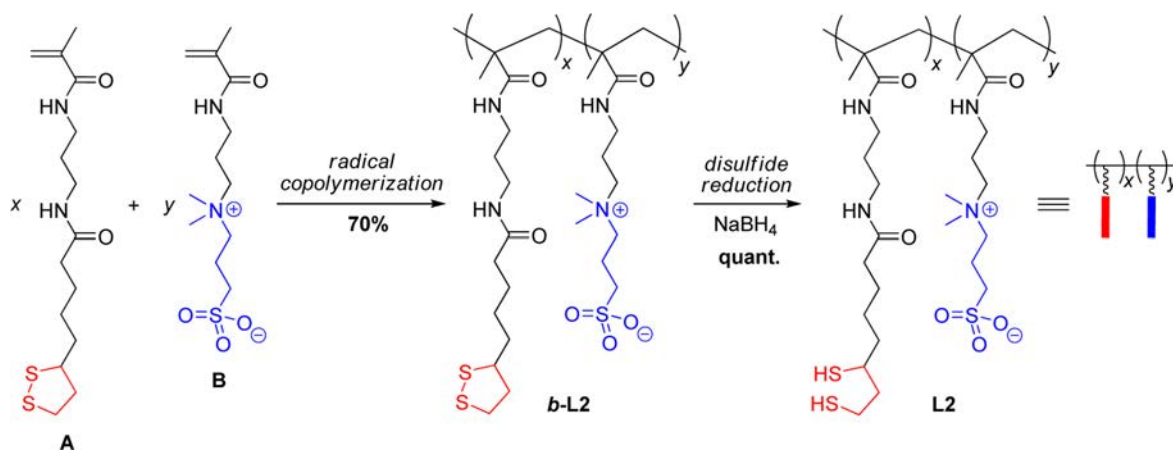
**Ligand Design and Synthesis.** To answer the need of increasing ligand affinity for the nanocrystal surface, we directed our efforts toward the synthesis of ligands exhibiting several attachment points. This has been achieved in two main ways: condensation reactions leading to branched molecules (dendrimers)<sup>12</sup> or polymerizations (with a possible control of chain



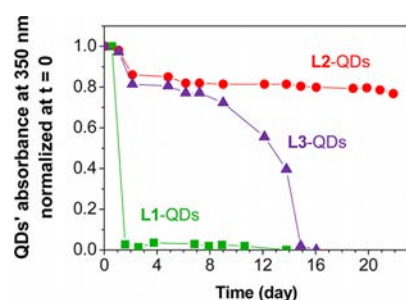
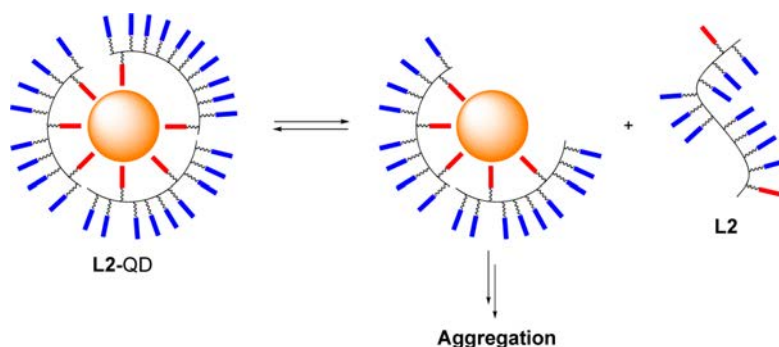
**Figure 1.** L2-QDs in pH 2, 3, 5, 7, 9, 11, and 13 and saturated NaCl aqueous solutions (from left to right) under a 302-nm UV light (>12 months).

lengths).<sup>11</sup> Although branched molecules provide a well-defined number of anchoring and solubilizing functions, their synthesis and purification may become a lengthy and tedious process, especially for higher order dendrimers. On the other hand, polymeric ligands may be quite easily synthesized, either from a preformed polymer backbone and subsequent grafting of different functions or by direct copolymerization of different monomers responsible for anchoring to the QD surface, solubilization and additional functionality. Both of these routes allow tuning polymer length and composition. However, it often proves difficult to ensure that all of the polymer backbone functions have been modified with the desired reactants. This leaves unreacted groups that may be detrimental to the final polymer-coated nanoparticles properties. Our concern to provide a quick, simple and effective synthesis thus turned us logically to classical radical polymerization. We thus synthesized a hydrophilic polymer, **L2**, derived from the small molecule **L1** presented above and resulting from a two-step process (Scheme 2). The first step consisted of the radical random copolymerization of two methacrylamides: one containing the precursor of the dithiol anchoring function (monomer **A**, obtained from the peptidic coupling between thioctic acid and *N*-(3-aminopropyl)methacrylamide), the other including the sulfobetaine group (monomer **B**, commercially available). Due to mismatching monomer solubilities, the solvent had to be adjusted to THF/water 1/1 (v/v). The A/B molar ratio was in turn optimized to a maximum of 20/80 to provide a water-soluble polymer. Above this value (A/B ratio = 30/70 for example), the polymer obtained became indeed poorly soluble in water, probably due to the marked hydrophobic properties of monomer **A**. Polythiol bridging may also account for this limitation.

### Scheme 2. Ligand L2 Synthesis



## Scheme 3. Principle of the Dilution Experiment to Test L2-QD Colloidal Stability



**Figure 2.** Influence of the capping ligand on QD colloidal stability (exchange conditions: 65 °C/overnight; dilution experiment conditions: 0.3  $\mu\text{M}$  in 20 mM aqueous NaCl).

Note also that the amounts of initiating (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, V50) and terminating (3-mercaptopropionic acid, MPA) agents were both chosen equal to 10% molar equivalents relative to the total amount of monomers, in order to prevent the formation of too long chains, thus keeping a small ligand size. The reaction led thereby to bipolymer *b*-L2 (for "bridged-L2") in 70% yield.

Then, in a second step, *b*-L2 was treated by sodium borohydride in water to reduce its disulfide bridges and free the anchoring thiol groups, giving the corresponding polymer L2 (initial A/B ratio = 20/80).

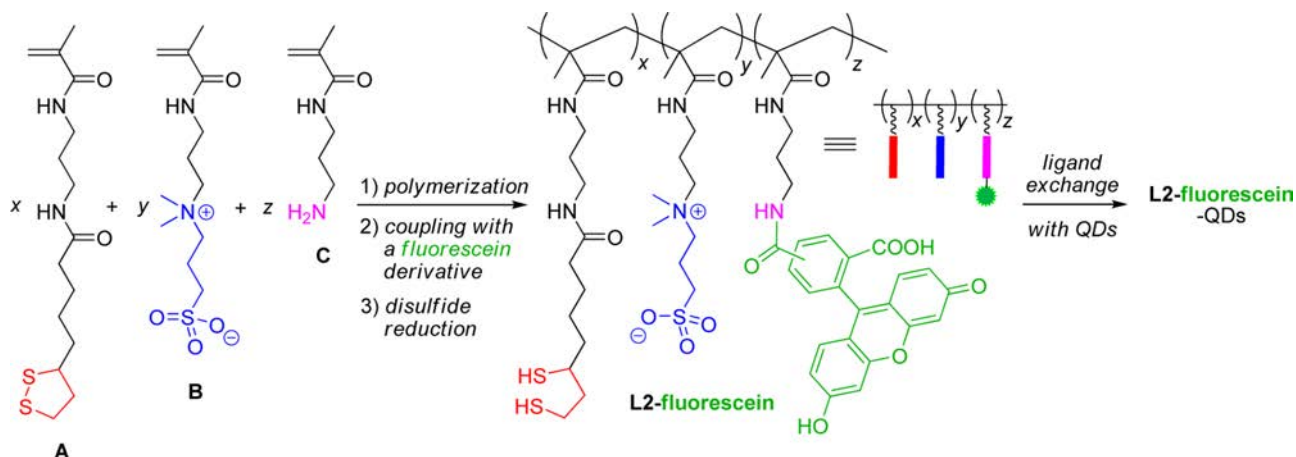
Another polymer, L3, was synthesized this way, using an initial A/B molar ratio equal to 10/90.

Characterization of the products by gel permeation chromatography in water (Viscotek GPCmax, triple detection) confirmed the expected low number average molecular weights ( $M_n \approx 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , i.e.  $\sim 16$ – $17$  monomers per chain, for all synthesized polymers) and showed polydispersity indexes ( $\text{PDI} = M_w/M_n$ ) close to 2. The dosage of the dithiol functions using Ellman's method<sup>16–18</sup> allowed, in turn, an estimation of the effective, average, A/B molar ratio in the polydisperse polymeric samples: 7/93 for L2 and 2/98 for L3. This estimation was further confirmed by measuring the absorbance of the dithiolane rings (data not shown). These A/B ratios are quite different from the initial ratios, probably due to differences in reactivity between the two monomers. Note that, in the particular case of polymers L2 and L3 (and on the contrary to what occurs with bipolymers resulting from a dithiol-bearing monomer and a PEG-based solubilizing monomer),<sup>13</sup> signals which are specific to each monomer have similar <sup>1</sup>H NMR chemical shifts and are consequently superimposed. This prevented us from estimating the fraction of dithiol groups in the polymers using this technique.

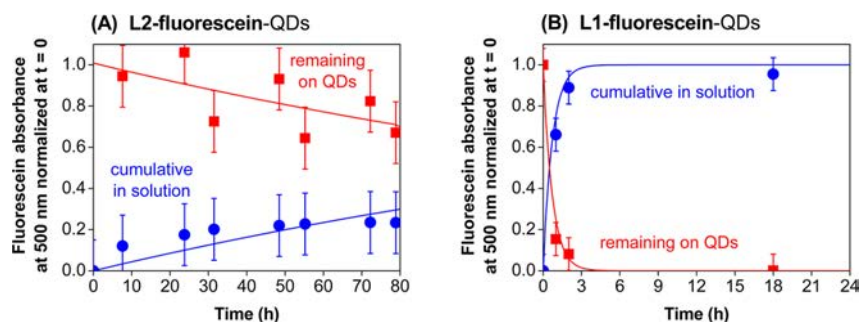
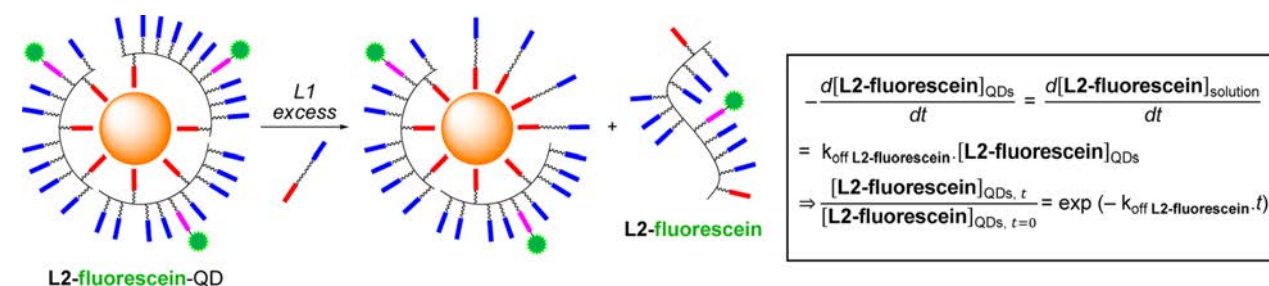
The bipolymers were stored under their oxidized bridged form (*b*-L2 and *b*-L3), and their reduction was carried out just before any ligand exchange procedure.

**Ligand Exchange.** The synthesized polymers were then dissolved in water and tested in a "classical" biphasic cap exchange with CdSe/CdS/ZnS core/shell QDs solubilized in chloroform.<sup>14</sup> Surprisingly, the nanoparticles were extracted from the organic phase but did not get into water, remaining at

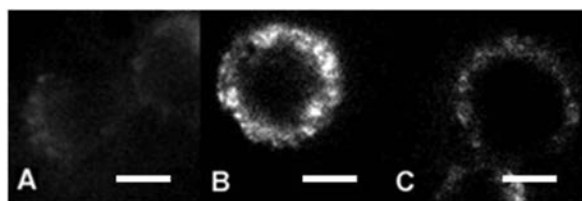
## Scheme 4. Synthesis of Ligand L2-fluorescein and QD Functionalization



## Scheme 5. Principle of the L2 vs L1 Competition Experiment



**Figure 3.** Monitoring of fluorescein absorbance remaining on **L2-fluorescein-QDs** (red squares) and accumulated in the surrounding solution (blue circles), during the exchange experiment between competing ligand **L1** and adsorbed (capping) ligands **L2-fluorescein** (A) or **L1-fluorescein** (B).



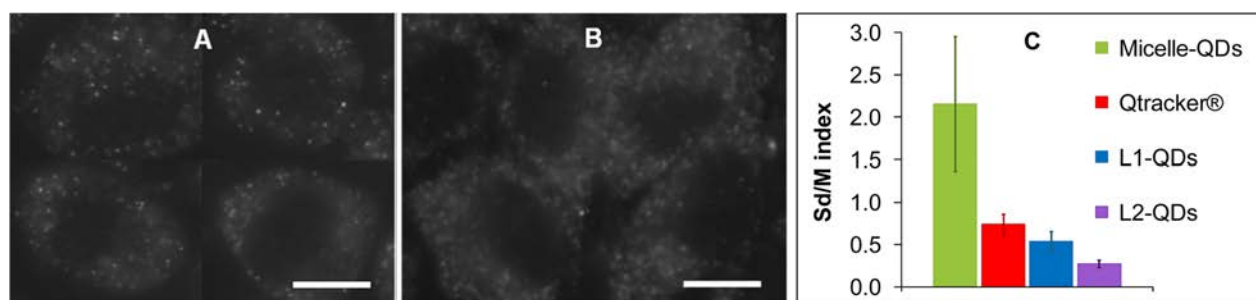
**Figure 4.** Fluorescence microscopy images of HeLa cells, after incubating with **L2-QDs** (A) or **L1-QDs** (B) and washing, compared to cellular autofluorescence (C). Scale bars 5  $\mu\text{m}$ .

the interface. We attributed this observation to the poor solubility of the polymer in chloroform: it implies a low partition coefficient between the two solvents and a difficult phase transfer of the QDs. To overcome this problem, we moved to a two-step process.<sup>19–21</sup> A first monophasic exchange using a small monodentate hydrophilic ligand, namely MPA, on as-synthesized QDs in basic chloroform, led to the precipitation of MPA-QDs and allowed the solubilization of the QDs into

water at room temperature. Then, a second step, still monophasic, consisted of the removal of the weak intermediate ligand MPA from the QDs and its replacement by our polymer in an aqueous medium at 65 °C overnight.

After purification of polymer **L2**-capped QDs by ultrafiltration then ultracentrifugation in an aqueous sucrose gradient, the effectiveness of the different exchange steps has been ascertained by IR spectroscopy. The spectra were in accordance with a complete replacement of native organic ligands by MPA, followed by a full displacement of MPA ligands by polymer **L2** (see Figure S7, SI). In particular, upon ligand exchange with the polymer, we observed the disappearance of the pair of carbonyl characteristic stretching bands at 1550  $\text{cm}^{-1}$  (antisymmetric)<sup>22</sup> and 1400  $\text{cm}^{-1}$  (symmetric), specific of basic MPA and MPA-capped QDs, and the appearance of a strong new band at 1645  $\text{cm}^{-1}$ , specific of the amide groups included in the polymer.

The physical properties of the nanoparticles were subsequently characterized by fluorescence spectroscopy and DLS. The nanocrystals showed a slightly reduced quantum yield in



**Figure 5.** Fluorescence microscopy images of HeLa cells, 54 h after electroporation (Scale bars 5  $\mu\text{m}$ ) and corresponding aggregation quantification. (A) **L1-QDs** tend to form aggregates (bright spots and heaps); (B) **L2-QDs** are still individual and move around freely within the cell; (C) quantification of QDs' aggregation using Sd/M index for different surface chemistries.

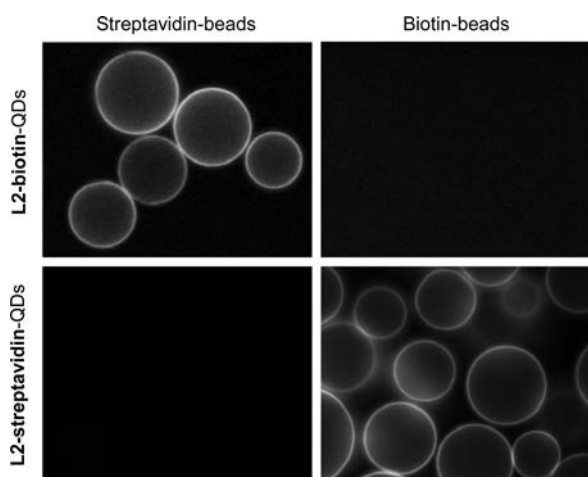
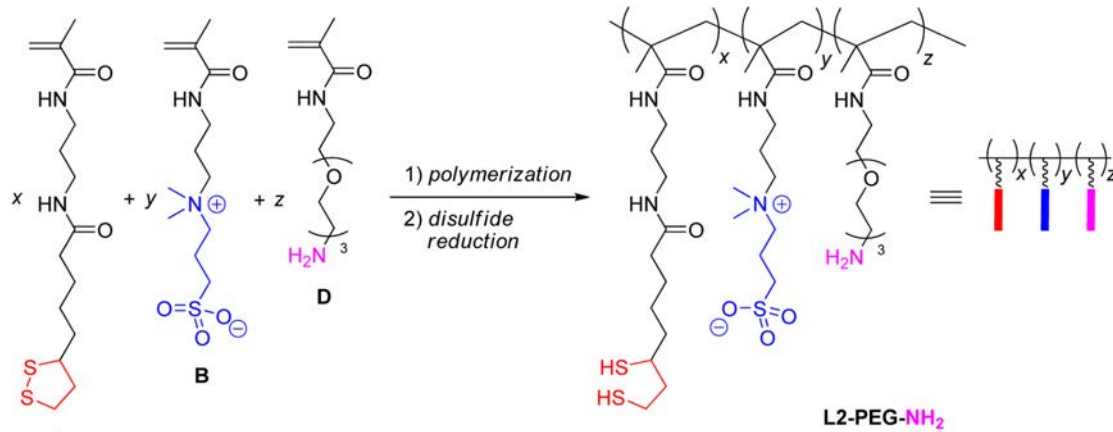
Scheme 6. Synthesis of Terpolymer L2-PEG-NH<sub>2</sub>

Figure 6. Specificity of bioconjugated QDs. L2-biotin-QDs specifically bind to streptavidin-beads, whereas L2-streptavidin-QDs specifically bind to biotin-beads.

the range of 30–40%, compared to 50–60% before cap exchange. They also exhibited a suitable small size of 15–18 nm as hydrodynamic diameter, for a core/shell diameter of 6–7 nm. This hydrodynamic diameter is slightly higher than the value of 12 nm reported by our group for L1-coated QDs,<sup>14</sup> mainly due to the polymeric structure of ligand L2 and the statistical distribution of dithiol anchoring groups. Such a hydrodynamic size remains however smaller than those obtained for PEG-coated QDs (26–30 nm) having smaller (~3 nm) core/shell diameters.<sup>11</sup>

L2-QDs were then subjected to a series of stability experiments to confirm the multiplication of anchoring and hydrophilic functions has a significant influence on the ligand stability onto the QDs itself as well as on the nanoparticle colloidal stability.

**Colloidal Stability versus pH and Salinity.** First, saline L2-QDs aqueous solutions (~0.6  $\mu$ M in 3 M aqueous NaCl) proved to be very stable over a large pH range, more precisely from pH 3 to 13, during several months and at 4 °C (>12 months, Figure 1). The charges of the pending sulfobetaine groups of polymer L2, responsible for its hydrophilicity and for the colloidal stability of the corresponding QDs in water, are indeed insensitive to pH. Moreover, they could stand high

salinity conditions, up to a saturated aqueous NaCl solution (~6 M), indefinitely. These properties are explained by the zwitterionic nature of the sulfobetaine groups whose charges are screened by ionic species, so that the attractive interaction between zwitterions is masked and the solvation of the corresponding polymer increases with the ionic strength.<sup>23</sup> Accordingly, taken together with the stability results, this specific feature indicates solubilizing zwitterionic QDs in highly saline or even saturated solutions can be a very convenient long-time storage method, even if the samples are diluted.

Such a test is very common in the literature discussing QD surface chemistry, since stable samples are evidences of a good surface passivation. However, it is only a prerequisite, and it is far from being enough to demonstrate QD stability in the conditions of a bioimaging experiment, which are not only highly diluted but also less saline and much warmer (37 °C), i.e. much less favorable than those used in this experiment.

**Colloidal Stability and Ligand Affinity versus Dilution.** Hence the affinity of the ligands for the QDs was tested through dilution experiments. QD samples were diluted to concentrations being in the range of 0.3  $\mu$ M in 20 mM aqueous NaCl and left at room temperature. In such conditions, the adsorption/desorption equilibrium existing between the capping ligand and the surface of QDs is shifted toward ligand desorption, so that ligand concentration in solution is homogenized (moderation principle). QDs lose their colloidal stability consequently and begin to aggregate (Scheme 3).

Aggregation kinetics can therefore be monitored by the measurement of QDs' remaining absorbance in solution. Practically, the samples were centrifuged (16,000 g, 5 min) to remove aggregates, and the absorbance at 350 nm of the corresponding supernatant was measured, this procedure being repeated over time. Our results underlined the influence of the type of capping ligand (L1, L2, and L3) on diluted QD colloidal stability (Figure 2).

To counter the desorption process, QD-ligand affinity must be as strong as possible. Figure 2 seems indeed to confirm that an increasing number of anchoring functions per ligand prevents the aggregation of the nanoparticles (absorbance decrease with time slows down in the series L1, L3, and L2), thus improving QD colloidal stability. Note that the absorbance of the QDs coated with polymer L2 remained above 75% of the initial absorbance, even after a 20-day experiment under diluted conditions. This demonstrates a remarkable improvement of

the colloidal stability over time, compared to L3-QDs, which lost their stability after 15 days, and especially compared to bidentate-ligand-L1-coated QDs, which precipitated in less than 2 days.

These experiments were repeated on several QD and polymer syntheses batches and proved to be highly reproducible. Nevertheless, some slight variations in stability can occur, but only after very long times of experiment (>1 month).

After these dilution experiments, one could still attribute L2-QD improved colloidal stability to both the effect of the polyzwitterionic nature of the ligands (better surface coverage) and the effect of the number of anchoring dithiol functions (slower desorption of the ligands from the surface of the nanoparticles). Nevertheless, two observations seem to indicate that the multidentate effect is predominant in L2-QDs colloidal stability: (i) all of the QD samples (L1-, L2-, and L3-QDs) were stable (>10 months) in concentrated conditions ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) and (ii) L3-QDs showed lower stability than L2-QDs, yet L3 includes a higher zwitterion and a lower dithiol (average) proportion than L2. To discriminate definitely between both effects and to verify to which extent the colloidal stability could be ascribed to the affinity of ligand L2 for the surface of the QDs, we turned to ligand competition experiments.

**Ligand Affinity: Competition Experiments.** To further test the stability of L2 onto QDs and demonstrate the adaptability of the polymeric synthesis to diverse applications, we introduced a monomer including a functional group during the polymerization process. Monomer C, bearing a reactive amine end function, was added to and copolymerized with methacrylamides A and B, in an A/B/C ratio equal to 20/70/10, to give, after disulfide reduction, terpolymer L2-NH<sub>2</sub>. As an illustration, this functionalizable polymer could be coupled to a fluorescein carboxylic derivative and then, exchanged with QDs (Scheme 4). Absorbance measurements on these L2-fluorescein-QDs let us estimate a number of ten functionalizable amines per nanoparticle, after subtraction of QD characteristic absorbance.

These functionalized QDs proved to be particularly useful in the determination of L2-fluorescein, which is a modified L2-type ligand, stability at the surface of QDs. To L2-fluorescein-QDs was opposed a 10,000-fold molar excess of competing ligand L1 (Scheme 5). In these conditions and due to ligand adsorption/desorption dynamic equilibrium, readsorption of desorbed L2 was highly disfavored. Desorption of L2-fluorescein could be followed by the measurement of remaining fluorescein absorbance on QDs over time. As this measurement required the separation of the QDs from the surrounding solution (performed by ultrafiltration), cumulative fluorescein absorbance in solution could be monitored in parallel (Figure 3A).

The same type of experiment was carried out with L1-fluorescein-QDs versus L1 (Figure 3B). In that case, the so-called L1-fluorescein-QDs were QDs covered with a mixture of L1 and a fluorescein-PEG-dithiol bidentate ligand, which were also subjected to a 10,000-fold molar excess of L1. From the modeling of absorption data by an exponential decay, we were able to estimate the corresponding desorption rate constants in the presence of competing L1, namely  $k_{\text{off,L2-fluorescein}} \approx 0.0045 \text{ h}^{-1}$  and  $k_{\text{off,L1-fluorescein}} \approx 1.5 \text{ h}^{-1}$ .

These results demonstrate undoubtedly the overwhelming stability of L2-type ligands on the surface of QDs, compared to that of L1-type bidentate ligands, thus implying the enhanced

colloidal stability of L2-QDs can only be due to the multidentate character of ligand L2.

More accurately, we can assume that the actual amount of dithiol functions per ligand bound to the QDs must be much greater than suggested by Ellman's assay. On one hand, the proportion of dithiols determined by Ellman's test on the polymeric sample before ligand exchange is only an average value. This implies that some polymers will contain a higher proportion of dithiol groups than others. On the other hand, the PDI is higher than 1, reflecting the dispersity in size of the polymers. Consequently, a sorting of the ligands is likely to occur during the exchange step, to the benefit of the chains including the largest number of dithiols, which are therefore more stable, in a thermodynamically controlled process (large excess of polymer, high temperature and extended exchange time). We estimate that less than 3% of the polymers present during the cap exchange are finally adsorbed on the QDs, due to the large excess of ligands. Furthermore, considering the size distribution measured by GPC and assuming a statistical distribution of monomers, we note that 17% of the L2 ligands contain 4 dithiol functions or more, and that 10% of the L2 ligands contain 5 dithiol functions or more. We may therefore safely assume that QDs are finally capped with polymers containing multiple anchoring groups, despite the low average dithiol proportion. Using reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization could reduce the polymer size polydispersity, however the number of thiol functions per chain would still present a distribution, due to the statistical nature of the polymerization. Additionally, presenting QDs with (slightly) polydisperse polymeric ligand samples may actually favor optimal surface coverage.

**Intracellular Stability.** To conclude the study of L2-QD stability, their behavior in an intracellular environment was examined and compared to L1-QDs. First, HeLa cells were incubated with 1  $\mu\text{M}$  L1- or L2-QD solutions for 10 min. After washing, the fluorescence microscopy image of L2-QD-incubated cells (Figure 4A) showed no significant difference regarding cellular autofluorescence (Figure 4C), whereas cells treated with L1-QDs had a slightly higher fluorescence level (Figure 4B). Even though this level can be considered as low on an absolute scale, this is indicative of a small amount of nonspecific adsorption in the case of L1-QDs. As for L2-QDs, they do not present any detectable nonspecific adsorption on cell membranes, which represents again a worthwhile improvement.

Intracellular stability was checked, in turn, using electroporation as internalization process: via an electric shock, 1  $\mu\text{M}$  solutions of L1- or L2-QDs were incorporated in HeLa cells. The monitoring of QD fluorescence showed that, 54 h after incorporation, L1-QDs begin to aggregate (bright spots, Figure 5A), while L2-QDs remain individualized, mobile and well distributed throughout cell cytoplasm (Figure 5B and movie in the SI). Quantification of QD aggregation was realized using a previously developed method.<sup>24</sup> This method consists in estimating the standard deviation (Sd) of pixel fluorescence intensities normalized by their mean (average, M) value over the whole cytoplasm (Sd/M index). Briefly, highly dispersed QDs yield uniform cytoplasm labeling and low Sd/M, while bright aggregates spots yield high Sd/M. This index makes a clear difference in favor of L2-QDs, not only compared to L1-QDs, but also to other QDs with various surface chemistries, including QDs encapsulated into poly(ethylene glycol)-phospholipid micelles (Micelle-QDs) and Qtracker, commer-

cial QDs encapsulated into an amphiphilic copolymer (Figure 5C).<sup>24</sup> L2-QD stability properties over time are thus definitely confirmed and meet all the relevant conditions for an application in long-term bioimaging.

**Toward Biotargeting.** The possibility of L2-QD functionalization has already been demonstrated by the incorporation of a fluorescent dye in a L2-type polymer before the ligand exchange. To further develop the opportunities for functionalization and tend to biotargeting, we designed and synthesized terpolymer L2-PEG-NH<sub>2</sub> bearing a more reachable amine reactive group (longer spacer arm) than in terpolymer L2-NH<sub>2</sub> (Scheme 6). The synthesis of the amine-containing monomer D was achieved using a previously described protocol.<sup>11</sup>

The experiment of specific binding relied on the strong noncovalent affinity ( $K_a \approx 10^{14} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>25</sup> between biotin (a small biomolecule) and streptavidin (a 60 kDa protein). After ligand exchange, L2-PEG-NH<sub>2</sub>-capped QDs were bioconjugated, via their amine function, with either biotin or streptavidin, using respectively a classical peptidic coupling based on the reagents DCC (dicyclohexylcarbodiimide) and NHS (*N*-hydroxysuccinimide), or a thiol/maleimide reaction. Bioconjugated QDs, when reacted with either biotin- or streptavidin-functionalized agarose beads, bound specifically to the beads bearing the complementary biomolecule. No nonspecific binding could be pointed out (Figure 6).

## CONCLUSION

Whatever the extreme conditions opposed to our new polymeric ligand (pH, salinity, dilution, or adsorption competition), the different experiments reported in this paper confirmed the outclassing stability of multidentate polyzwitterion L2 at the surface of CdSe/CdS/ZnS QDs, compared to bidentate monozwitterion L1. Moreover, this work led us, for the first time to our knowledge, to display some quantitative information about ligand desorption rates and to better argue about the improved ligand anchoring the poly(dithiol)s are responsible for, with respect to single dithiol. Finally, L2 excellent properties resulted also in an increased colloidal and intracellular stability of the corresponding L2-coated quantum dots, making this polymer a remarkable ligand for long-term live-cell imaging experiments based on fluorescent nanocrystals.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Full synthesis and experimental details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [nicolas.lequeux@espci.fr](mailto:nicolas.lequeux@espci.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Dr. Alexandra Fragola is gratefully acknowledged for help with fluorescence cell microscopy and Dr. Yannick de Wilde for help with the FTIR measurements.

## REFERENCES

(1) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Quantum

Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* **2005**, *307*, 538–544.

(2) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.

(3) Brichkin, S. B.; Chernykh, E. V. Hydrophilic semiconductor quantum dots. *High Energy Chem.* **2011**, *45*, 1–12.

(4) Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science* **2002**, *298*, 1759–1762.

(5) Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera-Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J. Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments. *Small* **2011**, *7*, 3113–3127.

(6) Chan, W. C. W.; Nie, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.

(7) Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V. C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. Self-Assembly of CdSe–ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.

(8) Liu, W.; Choi, H. S.; Zimmer, J. P.; Tanaka, E.; Frangioni, J. V.; Bawendi, M. Compact Cysteine-Coated CdSe(ZnCdS) Quantum Dots for in Vivo Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14530–14531.

(9) Mei, B. C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Effects of Ligand Coordination Number and Surface Curvature on the Stability of Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2009**, *25*, 10604–10611.

(10) Liu, L.; Guo, X.; Li, Y.; Zhong, X. Bifunctional Multidentate Ligand Modified Highly Stable Water-Soluble Quantum Dots. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3768–3775.

(11) Yildiz, I.; Deniz, E.; McCaughan, B.; Cruickshank, S. F.; Callan, J. F.; Raymo, F. M. Hydrophilic CdSe–ZnS Core–Shell Quantum Dots with Reactive Functional Groups on Their Surface. *Langmuir* **2010**, *26*, 11503–11511.

(12) Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Multidentate Poly(ethylene glycol) Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804–9813.

(13) Palui, G.; Na, H. B.; Mattoussi, H. Poly(ethylene glycol)-Based Multidentate Oligomers for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals. *Langmuir* **2012**, *28*, 2761–2772.

(14) Muro, E.; Pons, T.; Lequeux, N.; Fragola, A.; Sanson, N.; Lenkei, Z.; Dubertret, B. Small and Stable Sulfobetaine Zwitterionic Quantum Dots for Functional Live-Cell Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4556–4557.

(15) Breus, V. V.; Heyes, C. D.; Tron, K.; Nienhaus, G. U. Zwitterionic Biocompatible Quantum Dots for Wide pH Stability and Weak Nonspecific Binding to Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2573–2580.

(16) Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.

(17) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) – a reexamination. *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 75–81.

(18) Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. Reassessment of Ellman's reagent. In *Methods in Enzymology*; Hirs, C. H. W., Timasheff, S. N., Eds.; Academic Press: New York, 1983; Vol. 91, pp 49–60.

(19) Pong, B.-K.; Trout, B. L.; Lee, J.-Y. Modified Ligand-Exchange for Efficient Solubilization of CdSe/ZnS Quantum Dots in Water: A Procedure Guided by Computational Studies. *Langmuir* **2008**, *24*, 5270–5276.

(20) Wilson, R.; Spiller, D. G.; Beckett, A.; Prior, I. A.; Sée, V. Highly Stable Dextran-Coated Quantum Dots for Biomolecular Detection and Cellular Imaging. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6361–6369.

(21) Yeh, Y.-C.; Patra, D.; Yan, B.; Saha, K.; Miranda, O. R.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Synthesis of cationic quantum dots via a two-step ligand exchange process. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3069–3071.

(22) MPA ligands are effectively totally removed after the final step, due to the disappearance of the strong symmetric C=O stretching

band at  $1400\text{ cm}^{-1}$  in the FTIR spectrum of L2-QDs. This implies both C=O strong stretching bands (symmetric, at  $1400\text{ cm}^{-1}$ , and antisymmetric at  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) due to MPA carboxylate function have disappeared. The absorption band at  $1550\text{ cm}^{-1}$  in the FTIR spectrum of L2-QDs is a new band, due to the strong deformation vibration  $\delta_{\text{NH}}$  specific of the N–H bonds included in the numerous secondary amide functions of polymer L2.

(23) Mary, P.; Bendejacq, D. D.; Labeau, M.-P.; Dupuis, P. Reconciling Low- and High-Salt Solution Behavior of Sulfobetaine Polyzwitterions. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7767–7777.

(24) Muro, E.; Fragola, A.; Pons, T.; Lequeux, N.; Ioannou, A.; Skourides, P.; Dubertret, B. Comparing Intracellular Stability and Targeting of Sulfobetaine Quantum Dots with Other Surface Chemistries in Live Cells. *Small* **2012**, *8*, 1029–1037.

(25) Green, N. M. Avidin. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M., Eds.; Academic Press: New York, 1975; Vol. 29, pp 85–133.



# Bibliographie

- [1] Thomas Pons, Emilie Pic, Nicolas Lequeux, Elsa Cassette, Lina Bezdetnaya, François Guillemin, Frédéric Marchal, and Benoit Dubertret. Cadmium-free CuInS<sub>2</sub>/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS nano*, 4(5) :2531–2538, 2010.
- [2] E. Cassette, T. Pons, C. Bouet, M. Helle, L. Bezdetnaya, F. Marchal, and B. Dubertret. Synthesis and characterization of near-infrared Cu-In-Se/ZnS core/shell quantum dots for *in vivo* imaging. *Chemistry of Materials*, 22(22) :6117–6124, 2010.
- [3] P Sabbah, C Lévèque, and G Dutertre. Application clinique de l’IRM fonctionnelle : Aide à la strategie neurochirurgicale. *Journal of Neuroradiology*, 27 :226–232, 2000.
- [4] Felix Eckstein, Deborah Burstein, and Thomas M Link. Quantitative MRI of cartilage and bone : degenerative changes in osteoarthritis. *NMR in biomedicine*, 19(7) :822–54, 2006.
- [5] Michel D Crema, Frank W Roemer, Monica D Marra, Deborah Burstein, Garry E Gold, Felix Eckstein, Thomas Baum, Timothy J Mosher, John A Carrino, and Ali Guermazi. Articular cartilage in the knee : current MR imaging techniques and applications in clinical practice and research. *Radiographics*, 31(1) :37–61, 2011.
- [6] K a Buckwalter, J Rydberg, K K Kopecky, K Crow, and E L Yang. Musculoskeletal imaging with multislice CT. *American Journal of Roentgenology*, 176(4) :979–86, 2001.
- [7] Michael K Gould, James Fletcher, Mark D Iannettoni, William R Lynch, David E Midthun, David P Naidich, and David E Ost. Evaluation of patients with pulmonary nodules : when is it lung cancer ? *Chest*, 132(3 Suppl) :108S–130S, 2007.

- [8] R. U. Kothari, T. Brott, J. P. Broderick, W. G. Barsan, L. R. Sauerbeck, M. Zuccarello, and J. Khoury. The ABCs of Measuring Intracerebral Hemorrhage Volumes. *Stroke*, 27(8) :1304–1305, 1996.
- [9] T. Brott, J. Broderick, R. Kothari, W. Barsan, T. Tomsick, L. Sauerbeck, J. Spilker, J. Duldner, and J. Khoury. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 28(1) :1–5, 1997.
- [10] D Delbeke. Oncological applications of FDG PET imaging : brain tumors, colorectal cancer, lymphoma and melanoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(4) :591–603, 1999.
- [11] Orazio Schillaci. Hybrid SPECT/CT : a new era for SPECT imaging? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(5) :521–524, 2005.
- [12] Sandra J Rosenbaum, Thomas Lind, Gerald Antoch, and Andreas Bockisch. False-positive FDG PET uptake—the role of PET/CT. *European Radiology*, 16(5) :1054–1065, 2006.
- [13] David W Townsend. Combined Positron Emission Tomography-Computed Tomography : the historical perspective. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 29(4) :232–235, 2008.
- [14] Simon R Cherry. Multimodality imaging : beyond PET/CT and SPECT/CT. *Seminars in Nuclear Medicine*, 39(5) :348–53, 2009.
- [15] Martin S Judenhofer, Hans F Wehrl, Danny F Newport, Ciprian Catana, Stefan B Siegel, Markus Becker, Axel Thielscher, Manfred Kneilling, Matthias P Lichy, Martin Eichner, Karin Klingel, Gerald Reischl, Stefan Widmaier, Martin Röcken, Robert E Nutt, Hans-Jürgen Machulla, Kamil Uludag, Simon R Cherry, Claus D Claussen, and Bernd J Pichler. Simultaneous PET-MRI : a new approach for functional and morphological imaging. *Nature Medicine*, 14(4) :459–465, 2008.
- [16] Gerald Antoch and Andreas Bockisch. Combined PET/MRI : a new dimension in whole-body oncology imaging? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36 Suppl 1 :S113–S120, 2009.
- [17] Gustav K von Schulthess and Heinz-Peter W Schlemmer. A look ahead : PET/MR versus PET/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(Suppl 1) :S3–9, 2009.

- [18] Meike L Schipper, Zhen Cheng, Sheen-Woo Lee, Laurent a Bentolila, Gopal Iyer, Jianghong Rao, Xiaoyuan Chen, Anna M Wu, Shimon Weiss, and Sanjiv S Gambhir. microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(9) :1511–1518, 2007.
- [19] Frédéric Ducongé, Thomas Pons, Carine Pestourie, Laurence Hérin, Benoît Thézé, Karine Gombert, Benoit Mahler, Françoise Hinnen, Bertrand Kühnast, Frédéric Dollé, Benoit Dubertret, and Bertrand Tavitian. Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for *in vivo* multimodal imaging from whole body to cellular scales. *Bioconjugate Chemistry*, 19(9) :1921–6, 2008.
- [20] Nicolas Mackiewicz, Edmond Gravel, Anikitos Garofalakis, Julien Ogier, Jubi John, Daniel Miotto Dupont, Karine Gombert, Bertrand Tavitian, Eric Doris, and Frédéric Ducongé. Tumor-targeted polydiacetylene micelles for *in vivo* imaging and drug delivery. *Small*, 7(19) :2786–92, 2011.
- [21] Michel Modo, Diana Cash, Karen Mellodew, Steven C.R Williams, Scott E Fraser, Thomas J Meade, Jack Price, and Helen Hodges. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeuroImage*, 17(2) :803–811, 2002.
- [22] Tarik F Massoud and Sanjiv S Gambhir. Molecular imaging in living subjects : seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development*, 17(5) :545–580, 2003.
- [23] Ralph Weissleder and Mikael J Pittet. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452(7187) :580–589, 2008.
- [24] Eric T Ahrens and Jeff W M Bulte. Tracking immune cells *in vivo* using magnetic resonance imaging. *Nature reviews. Immunology*, 13(10) :755–763, 2013.
- [25] Hyon Bin Na, Jung Hee Lee, Kwangjin An, Yong Il Park, Mihyun Park, In Su Lee, Do-hyun Nam, Sung Tae Kim, Seung-Hoon Kim, Sang-Wook Kim, Keun-Ho Lim, Ki-Soo Kim, Sun-Ok Kim, and Taeghwan Hyeon. Development of a T<sub>1</sub> contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(28) :5397–5401, 2007.
- [26] S H Koenig and R D Brown. Relaxation of solvent protons by paramagnetic ions and its dependence on magnetic field and chemical environment : implications for NMR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1(4) :478–95, 1984.

- [27] Randall B. Lauffer. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging : theory and design. *Chemical Reviews*, 87(5) :901–927, 1987.
- [28] P Caravan, J J Ellison, T J McMurry, and R B Lauffer. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents : structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews*, 99(9) :2293–352, 1999.
- [29] Seymour H. Koenig and Kenneth E. Kellar. Theory of  $1/T_1$  and  $1/T_2$  NMRD profiles of solutions of magnetic nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(2) :227–233, 1995.
- [30] Yves Gossuin, Pierre Gillis, Aline Hocq, Quoc L Vuong, and Alain Roch. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 1(3) :299–310, 2009.
- [31] Guannan Wang, Xuanjun Zhang, Andreas Skallberg, Yaxu Liu, Zhangjun Hu, Xifan Mei, and Kajsa Uvdal. One-step synthesis of water-dispersible ultra-small  $Fe_3O_4$  nanoparticles as contrast agents for  $T_1$  and  $T_2$  magnetic resonance imaging. *Nanoscale*, 6(5) :2953–2963, 2014.
- [32] Jeffrey S Troughton, Matthew T Greenfield, Jaclyn M Greenwood, Stéphane Dumas, Andrea J Wiethoff, Jufeng Wang, Marga Spiller, Thomas J McMurry, and Peter Caravan. Synthesis and evaluation of a high relaxivity manganese(II)-based MRI contrast agent. *Inorganic Chemistry*, 43(20) :6313–6323, 2004.
- [33] Peter Caravan. Protein-targeted gadolinium-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents : design and mechanism of action. *Accounts of chemical research*, 42(7) :851–62, 2009.
- [34] Hua Ai. Layer-by-layer capsules for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63(9) :772–88, 2011.
- [35] J M Caillé, B Lemanceau, and B Bonnemain. Gadolinium as a contrast agent for NMR. *American Journal of Neuroradiology*, 4(5) :1041–2, 1983.
- [36] Kenneth N Raymond and Valérie C Pierre. Next generation, high relaxivity gadolinium MRI agents. *Bioconjugate Chemistry*, 16(1) :3–8, 2005.
- [37] Peter Caravan. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 35(6) :512–23, 2006.

- [38] Thomas Grobner. Gadolinium—a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 21(4) :1104–1108, 2006.
- [39] Jeffrey G Penfield and Robert F Reilly. What nephrologists need to know about gadolinium. *Nature Clinical Practice. Nephrology*, 3(12) :654–668, 2007.
- [40] Mark A Perazella. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(2) :461–9, 2009.
- [41] M. Gaceur, M. Giraud, M. Hemadi, S. Nowak, N. Menguy, J. P. Quisefit, K. David, T. Jahanbin, S. Benderbous, M. Boissière, and S. Ammar. Polyol-synthesized  $Zn_{0.9}Mn_{0.1}S$  nanoparticles as potential luminescent and magnetic bimodal imaging probes : synthesis, characterization, and toxicity study. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(7) :932–938, 2012.
- [42] Myung Ju Baek, Ja Young Park, Wenlong Xu, Krishna Kattel, Han Gyeol Kim, Eun Jung Lee, Anilkumar Kantilal Patel, Jae Jun Lee, Yongmin Chang, Tae Jeong Kim, Ji Eun Bae, Kwon Seok Chae, and Gang Ho Lee. Water-soluble MnO nanocolloid for a molecular  $T_1$  MR imaging : a facile one-pot synthesis, *in vivo*  $T_1$  MR images, and account for relaxivities. *ACS applied materials & interfaces*, 2(10) :2949–55, 2010.
- [43] Chih-chia Huang, Ngee-huat Khu, and Chen-sheng Yeh. The characteristics of sub 10 nm manganese oxide  $T_1$  contrast agents of different nanostructured morphologies. *Biomaterials*, 31(14) :4073–8, 2010.
- [44] Juan Gallo, Israt S. Alam, Ioannis Lavdas, Marzena Wylezinska-Arridge, Eric O Aboagye, and Nicholas J. Long. RGD-targeted MnO nanoparticles as  $T_1$  contrast agents for cancer imaging - the effect of PEG length in vivo. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(7) :868, 2014.
- [45] Zhi-jun Liu, Xiao-xia Song, and Qun Tang. Development of PEGylated  $KMnF_3$  nanoparticles as a  $T_1$ -weighted contrast agent : chemical synthesis, *in vivo* brain MR imaging, and accounting for high relaxivity. *Nanoscale*, 5(11) :5073–9, 2013.
- [46] Gabriella Paul, Yoann Prado, Nada Dia, Eric Rivière, Sophie Laurent, Mathieu Roch, Luce Vander Elst, Robert N Muller, Lucie Sancey, Pascal Perriat, Olivier

- Tillement, Talal Mallah, and Laure Catala. Mn<sup>II</sup>-containing coordination nanoparticles as highly efficient T<sub>1</sub> contrast agents for magnetic resonance imaging. *Chemical Communications*, 50(51) :6740–6743, 2014.
- [47] Wenlong Xu, Krishna Kattel, Ja Young Park, Yongmin Chang, Tae Jeong Kim, and Gang Ho Lee. Paramagnetic nanoparticle T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> MRI contrast agents. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(37) :12687–12700, 2012.
- [48] Ajay Kumar Gupta and Stephen Wells. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery : preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 3(1) :66–73, 2004.
- [49] Ajay Kumar Gupta and Mona Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18) :3995–4021, 2005.
- [50] Fong-Yu Cheng, Chia-Hao Su, Yu-Sheng Yang, Chen-Sheng Yeh, Chiau-Yuang Tsai, Chao-Liang Wu, Ming-Ting Wu, and Dar-Bin Shieh. Characterization of aqueous dispersions of Fe(3)O(4) nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials*, 26(7) :729–38, 2005.
- [51] Yuri Matsumoto and Alan Jasanoff. T<sub>2</sub> relaxation induced by clusters of superparamagnetic nanoparticles : Monte Carlo simulations. *Magnetic Resonance Imaging*, 26(7) :994–998, 2008.
- [52] Esben K U Larsen, Thomas Nielsen, Thomas Wittenborn, Henrik Birkedal, Thomas Vorup-Jensen, Mogens H Jakobsen, Leif Ostergaard, Michael R Horsman, Flemming Besenbacher, Kenneth a Howard, and Jørgen Kjems. Size-dependent accumulation of PEGylated silane-coated magnetic iron oxide nanoparticles in murine tumors. *ACS nano*, 3(7) :1947–51, 2009.
- [53] Forrest M Kievit, Zachary R Stephen, Omid Veisheh, Hamed Arami, Tingzhong Wang, Vy P Lai, James O Park, Richard G Ellenbogen, Mary L Disis, and Miqin Zhang. Targeting of primary breast cancers and metastases in a transgenic mouse model using rationally designed multifunctional SPIONs. *ACS nano*, 6(3) :2591–2601, 2012.
- [54] Ying Lin, Wei Yao, Yuan Cheng, Hanqing Qian, Xin Wang, Yin Ding, Wei Wu, and Xiqun Jiang. Multifold enhanced T<sub>2</sub> relaxation of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles

- by jamming them inside chitosan nanospheres. *Journal of Materials Chemistry*, 22(12) :5684–5693, 2012.
- [55] Qing Song and Z John Zhang. Controlled synthesis and magnetic properties of bimagnetic spinel ferrite  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocrystals with core-shell architecture. *Journal of the American Chemical Society*, 134(24) :10182–10190, 2012.
- [56] Julie Bolley, Yoann Lalatonne, Oualid Haddad, Didier Letourneur, Michael Sossan, Joelle Pérard-Viret, and Laurence Motte. Optimized multimodal nanoplatforms for targeting  $\alpha_v\beta_3$  integrins. *Nanoscale*, 5(23) :11478–89, 2013.
- [57] Ulrich I Tromsdorf, Oliver T Bruns, Sunhild C Salmen, Ulrike Beisiegel, and Horst Weller. A highly effective, nontoxic  $T_1$  MR contrast agent based on ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles. *Nano letters*, 9(12) :4434–4440, 2009.
- [58] Byung Hyo Kim, Nohyun Lee, Hyoungsu Kim, Kwangjin An, Yong Il Park, Yoonseok Choi, Kwangsoo Shin, Youjin Lee, Soon Gu Kwon, Hyon Bin Na, Je-Geun Park, Tae-Young Ahn, Young-Woon Kim, Woo Kyung Moon, Seung Hong Choi, and Taeghwan Hyeon. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution  $T_1$  magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of the American Chemical Society*, 133(32) :12624–12631, 2011.
- [59] Jinwoo Cheon and Jae-Hyun Lee. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Accounts of chemical research*, 41(12) :1630–40, 2008.
- [60] Tuan Vo-Dinh, editor. *Biomedical photonics handbook*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- [61] JV Frangioni. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5) :626–634, 2003.
- [62] Richard C. Benson and Henry A. Kues. Absorption and fluorescence properties of cyanine dyes. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 22(4) :379–383, 1977.
- [63] W Matthew Leevy, Seth T Gammon, Hua Jiang, James R Johnson, Dustin J Maxwell, Erin N Jackson, Manuel Marquez, David Piwnica-Worms, and Bradley D Smith. Optical imaging of bacterial infection in living mice using a fluorescent near-infrared molecular probe. *Journal of the American Chemical Society*, 128(51) :16476–16477, 2006.

- [64] Hisataka Kobayashi, Mikako Ogawa, Raphael Alford, Peter L Choyke, and Yasuteru Urano. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chemical Reviews*, 110(5) :2620–40, 2010.
- [65] Irina V Nesterova, Vera T Verdree, Serhii Pakhomov, Karen L Strickler, Michael W Allen, Robert P Hammer, and Steven a Soper. Metallo-phthalocyanine near-IR fluorophores : oligonucleotide conjugates and their applications in PCR assays. *Bioconjugate Chemistry*, 18(6) :2159–2168, 2007.
- [66] P Peter Ghoroghchian, Paul R Frail, Kimihiro Susumu, Tae-Hong Park, Sophia P Wu, H Tetsuo Uyeda, Daniel a Hammer, and Michael J Therien. Broad spectral domain fluorescence wavelength modulation of visible and near-infrared emissive polymersomes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(44) :15388–90, 2005.
- [67] Weili Zhao and Erick M Carreira. Conformationally restricted aza-BODIPY : highly fluorescent, stable near-infrared absorbing dyes. *Chemistry - A European Journal*, 12(27) :7254–7263, 2006.
- [68] J.V. Frangioni. An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. *Technology in cancer research & treatment*, 2(6) :1–10, 2003.
- [69] Jarmo T Alander, Ilkka Kaartinen, Aki Laakso, Tommi Pätilä, Thomas Spillmann, Valery V Tuchin, Maarit Venermo, and Petri Välisuo. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *International journal of biomedical imaging*, 2012 :940585, 2012.
- [70] R C Benson and H a Kues. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Physics in medicine and biology*, 23(1) :159–63, 1978.
- [71] Feng Wang and Xiaogang Liu. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chemical Society Reviews*, 38(4) :976–989, 2009.
- [72] Dev K Chatterjee, Abdul J Rufaihah, and Yong Zhang. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*, 29(7) :937–43, 2008.
- [73] Zhen-Ling Wang, Jianhua Hao, Helen L W Chan, Ga-Lai Law, Wing-Tak Wong, Ka-Leung Wong, Margaret B Murphy, T Su, Z H Zhang, and S Q Zeng. Simulta-

- neous synthesis and functionalization of water-soluble up-conversion nanoparticles for *in vitro* cell and nude mouse imaging. *Nanoscale*, 3(5) :2175–2181, 2011.
- [74] Feng Wang and Xiaogang Liu. Upconversion multicolor fine-tuning : visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 130(17) :5642–5643, 2008.
- [75] Yongsheng Liu, Datao Tu, Haomiao Zhu, Renfu Li, Wenqin Luo, and Xueyuan Chen. A strategy to achieve efficient dual-mode luminescence of Eu<sup>3+</sup> in lanthanides doped multifunctional NaGdF<sub>4</sub> nanocrystals. *Advanced Materials*, 22(30) :3266–71, 2010.
- [76] Noah J J Johnson, Neralagatta M Sangeetha, John-Christopher Boyer, and Frank C J M van Veggel. Facile ligand-exchange with polyvinylpyrrolidone and subsequent silica coating of hydrophobic upconverting  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> :Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> nanoparticles. *Nanoscale*, 2(5) :771–7, 2010.
- [77] Gan Tian, Zhanjun Gu, Liangjun Zhou, Wenyan Yin, Xiaoxiao Liu, Liang Yan, Shan Jin, Wenlu Ren, Gengmei Xing, Shoujian Li, and Yuliang Zhao. Mn<sup>2+</sup> dopant-controlled synthesis of NaYF<sub>4</sub> :Yb/Er upconversion nanoparticles for *in vivo* imaging and drug delivery. *Advanced Materials*, 24(9) :1226–1231, 2012.
- [78] Xiaojun Wei, Wei Wang, and Kezheng Chen. Preparation and characterization of ZnS :Tb,Gd and ZnS :Er,Yb,Gd nanoparticles for bimodal magnetic-fluorescent imaging. *Dalton Transactions*, 42(5) :1752–1759, 2013.
- [79] Taejong Paik, Thomas R Gordon, Andrew M Prantner, Hongseok Yun, and Christopher B Murray. Designing tripodal and triangular gadolinium oxide nanoplates and self-assembled nanofibrils as potential multimodal bioimaging probes. *ACS nano*, 7(3) :2850–9, 2013.
- [80] Marcin Nyk, Rajiv Kumar, Tymish Y Ohulchanskyy, Earl J Bergey, and Paras N Prasad. High contrast *in vitro* and *in vivo* photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm<sup>3+</sup> and Yb<sup>3+</sup> doped fluoride nanophosphors. *Nano letters*, 8(11) :3834–3838, 2008.
- [81] Ding-Sheng Wang, Ting Xie, Qing Peng, Shao-Yan Zhang, Jun Chen, and Ya-Dong Li. Direct thermal decomposition of metal nitrates in octadecylamine to metal oxide nanocrystals. *Chemistry - A European Journal*, 14(8) :2507–13, 2008.

- [82] Jing Zhou, Yun Sun, Xiaoxia Du, Liqin Xiong, He Hu, and Fuyou Li. Dual-modality *in vivo* imaging using rare-earth nanocrystals with near-infrared to near-infrared (NIR-to-NIR) upconversion luminescence and magnetic resonance properties. *Biomaterials*, 31(12) :3287–3295, 2010.
- [83] Jiayin Zhang, Hua Zhao, Xitian Zhang, Xuan-Zhang Wang, Hong Gao, Zhiguo Zhang, and Wenwu Cao. Monochromatic Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion Nanoparticles for High-Contrast Fluorescence Imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(5) :2820–2825, 2014.
- [84] Yang Wei, Fengqi Lu, Xinrong Zhang, and Depu Chen. Synthesis and characterization of efficient near-infrared upconversion Yb and Tm codoped NaYF<sub>4</sub> nanocrystal reporter. *Journal of Alloys and Compounds*, 427(1-2) :333–340, 2007.
- [85] M. Pokhrel, L. C. Mimun, B. Yust, G. a. Kumar, a. Dhanale, L. Tang, and D. K. Sardar. Stokes emission in GdF<sub>3</sub> :Nd<sup>3+</sup> nanoparticles for bioimaging probes. *Nanoscale*, 6(3) :1667–74, 2014.
- [86] Chao Wang, Huiquan Tao, Liang Cheng, and Zhuang Liu. Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, 32(26) :6145–6154, 2011.
- [87] Hui Liu, Zhengguo Jin, Weidong Wang, and Jia Li. Monodispersed sphalerite CuInSe<sub>2</sub> nanoplates and highly (112) oriented chalcopyrite thin films by nanoplates ink coating. *CrystEngComm*, 13(24) :7198–7201, 2011.
- [88] Yun Sun, Xingjun Zhu, Juanjuan Peng, and Fuyou Li. Core-shell lanthanide upconversion nanophosphors as four-modal probes for tumor angiogenesis imaging. *ACS nano*, 7(12) :11290–11300, 2013.
- [89] Quentin le Masne de Chermont, Corinne Chanéac, Johanne Seguin, Fabienne Pellé, Serge Maîtrejean, Jean-Pierre Jolivet, Didier Gourier, Michel Bessodes, and Daniel Scherman. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22) :9266–9271, 2007.
- [90] Xiaogang Peng, Michael C. Schlamp, Andreas V. Kadavanich, and A Paul Alivisatos. Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility. *Journal of the American Chemical Society*, 119(30) :7019–7029, 1997.

- [91] Nicolas Charvet, Peter Reiss, André Roget, Alain Dupuis, Didier Grünwald, Sophie Carayon, Frédéric Chandezon, and Thierry Livache. Biotinylated CdSe/ZnSe nanocrystals for specific fluorescent labeling. *Journal of Materials Chemistry*, 14(17) :2638–2642, 2004.
- [92] Yongan Andrew Yang, Huimeng Wu, Kathryn R Williams, and Y Charles Cao. Synthesis of CdSe and CdTe nanocrystals without precursor injection. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(41) :6712–6715, 2005.
- [93] Renguo Xie, Ute Kolb, Jixue Li, Thomas Basché, and Alf Mews. Synthesis and characterization of highly luminescent CdSe-core CdS/Zn<sub>0.5</sub>Cd<sub>0.5</sub>S/ZnS multishell nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 127(20) :7480–7488, 2005.
- [94] AJ Nozik and OI Mičić. Colloidal quantum dots of III-V semiconductors. *MRS Bulletin*, 23 :24–30, 1998.
- [95] John P Zimmer, Sang-Wook Kim, Shunsuke Ohnishi, Eichii Tanaka, John V Frangioni, and Mounqi G Bawendi. Size series of small indium arsenide-zinc selenide core-shell nanocrystals and their application to *in vivo* imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 128(8) :2526–2527, 2006.
- [96] Renguo Xie, Kai Chen, Xiaoyuan Chen, and Xiaogang Peng. InAs/InP/ZnSe core/shell/shell quantum dots as near-infrared emitters : Bright, narrow-band, non-cadmium containing, and biocompatible. *Nano Research*, 1(6) :457–464, 2008.
- [97] Héloïse Virieux, Marianne Le Troedec, Arnaud Cros-Gagneux, Wilfried-Solo Ojo, Fabien Delpech, Céline Nayral, Hervé Martinez, and Bruno Chaudret. InP/ZnS nanocrystals : coupling NMR and XPS for fine surface and interface description. *Journal of the American Chemical Society*, 134(48) :19701–19708, 2012.
- [98] Xuyong Yang, Dewei Zhao, Kheng Swee Leck, Swee Tiam Tan, Yu Xin Tang, Junliang Zhao, Hilmi Volkan Demir, and Xiao Wei Sun. Full visible range covering InP/ZnS nanocrystals with high photometric performance and their application to white quantum dot light-emitting diodes. *Advanced Materials*, 24(30) :4180–4185, 2012.
- [99] Tianhao Ji, Wen-Bin Jian, and Jiye Fang. The first synthesis of Pb<sub>1-x</sub>Mn<sub>x</sub>Se nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 125(28) :8448–9, 2003.

- [100] Ding-Sheng Wang, Wen Zheng, Chen-Hui Hao, Qing Peng, and Ya-Dong Li. A synthetic method for transition-metal chalcogenide nanocrystals. *Chemistry - A European Journal*, 15(8) :1870–1875, 2009.
- [101] Zewei Quan, Zhiping Luo, Welley Siu Loc, Jun Zhang, Yuxuan Wang, Kaikun Yang, Nathan Porter, Jun Lin, Howard Wang, and Jiye Fang. Synthesis of PbSeTe single ternary alloy and core/shell heterostructured nanocubes. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44) :17590–3, 2011.
- [102] Nima Parsi Benekohal, Victoria González-Pedro, Pablo P. Boix, Sudam Chavhan, Ramón Tena-Zaera, George P. Demopoulos, and Iván Mora-Seró. Colloidal PbS and PbSeS quantum dot sensitized solar cells prepared by electrophoretic deposition. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(31) :16391–16397, 2012.
- [103] Masato Uehara, Kosuke Watanabe, Yasuyuki Tajiri, Hiroyuki Nakamura, and Hideaki Maeda. Synthesis of CuInS<sub>2</sub> fluorescent nanocrystals and enhancement of fluorescence by controlling crystal defect. *The Journal of Chemical Physics*, 129(13) :134709, 2008.
- [104] Mounji G Bawendi, Michael L. Steigerwald, and Louis E. Brus. The quantum mechanics of larger semiconductor clusters (“Quantum Dots”). *Annual Review of Physical Chemistry*, 41(1) :477–496, 1990.
- [105] A Paul Alivisatos. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*, 271(5251) :933, 1996.
- [106] Peter Reiss, Myriam Protière, and Liang Li. Core/Shell semiconductor nanocrystals. *Small*, 5(2) :154–168, 2009.
- [107] Daniel R Larson, Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Stephen W Clark, Marcel P Bruchez, Frank W Wise, and Watt W Webb. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science*, 300(5624) :1434–6, 2003.
- [108] Xingyong Wu, Hongjian Liu, Jianquan Liu, Kari N Haley, Joseph A Treadway, J Peter Larson, Nianfeng Ge, Frank Peale, and Marcel P Bruchez. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*, 21(1) :41–46, 2003.
- [109] Marcel Bruchez Jr., Mario Moronne, Peter Gin, Shimon Weiss, and A Paul Alivisatos. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*, 281(5385) :2013–2016, 1998.

- [110] Benoit Dubertret, Paris Skourides, David J Norris, Vincent Noireaux, Ali H Brivanlou, and Albert Libchaber. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 298(5599) :1759–62, 2002.
- [111] Hisataka Kobayashi, Yukihiro Hama, Yoshinori Koyama, Tristan Barrett, Celeste a S Regino, Yasuteru Urano, and Peter L Choyke. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano letters*, 7(6) :1711–6, 2007.
- [112] Andrey L Rogach, Alexander Eychmüller, Stephen G Hickey, and Stephen V Kershaw. Infrared-emitting colloidal nanocrystals : synthesis, assembly, spectroscopy, and applications. *Small*, 3(4) :536–57, 2007.
- [113] Lise-Marie Lacroix, Fabien Delpech, Céline Nayral, Sébastien Lachaize, and Bruno Chaudret. New generation of magnetic and luminescent nanoparticles for *in vivo* real-time imaging. *Interface Focus*, 3(3) :20120103, 2013.
- [114] Hiroyuki Nakamura, Wataru Kato, Masato Uehara, Katsuhiro Nose, Takahisa Omata, Shinya Otsuka-Yao-Matsuo, Masaya Miyazaki, and Hideaki Maeda. Tunable photoluminescence wavelength of chalcopyrite CuInS<sub>2</sub>-based semiconductor nanocrystals synthesized in a colloidal system. *Chemistry of Materials*, 18(14) :3330–3335, 2006.
- [115] Justin J Nairn, Pamela J Shapiro, Brendan Twamley, Tyler Pounds, Ray von Wandruszka, T Rick Fletcher, Mark Williams, Chongmin Wang, and M Grant Norton. Preparation of ultrafine chalcopyrite nanoparticles via the photochemical decomposition of molecular single-source precursors. *Nano letters*, 6(6) :1218–23, 2006.
- [116] Joseph S. Gardner, Endrit Shurdha, Chongmin Wang, Lisa D. Lau, René G. Rodriguez, and Joshua J. Pak. Rapid synthesis and size control of CuInS<sub>2</sub> semiconductor nanoparticles using microwave irradiation. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4) :633–641, 2007.
- [117] Peter M Allen and Mounsi G Bawendi. Ternary I-III-VI quantum dots luminescent in the red to near-infrared. *Journal of the American Chemical Society*, 130(29) :9240–1, 2008.

- [118] Jiang Tang, Sean Hinds, Shana O. Kelley, and Edward H. Sargent. Synthesis of Colloidal CuGaSe<sub>2</sub>, CuInSe<sub>2</sub>, and Cu(InGa)Se<sub>2</sub> Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 20(22) :6906–6910, 2008.
- [119] J. Jaffe and Alex Zunger. Theory of the band-gap anomaly in ABC<sub>2</sub> chalcopyrite semiconductors. *Physical Review B*, 29(4) :1882–1906, 1984.
- [120] K G Li, J T Chen, S S Bai, X Wen, S Y Song, Q Yu, J Li, and Y Q Wang. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. *Toxicology in vitro*, 23(6) :1007–13, 2009.
- [121] Weisheng Guo, Na Chen, Yu Tu, Chunhong Dong, Bingbo Zhang, Chunhong Hu, and Jin Chang. Synthesis of Zn-Cu-In-S/ZnS core/shell quantum dots with inhibited blue-shift photoluminescence and applications for tumor targeted bioimaging. *Theranostics*, 3(2) :99–108, 2013.
- [122] Rolf Koole, Willem J M Mulder, Matti M van Schooneveld, Gustav J Strijkers, Andries Meijerink, and Klaas Nicolay. Magnetic quantum dots for multimodal imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 1(5) :475–91, 2009.
- [123] Serena A. Corr, Yury P. Rakovich, and Yurii K. Gun'ko. Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications. *Nanoscale Research Letters*, 3(3) :87–104, 2008.
- [124] Hyungrak Kim, Marc Achermann, Laurent P Balet, Jennifer a Hollingsworth, and Victor I Klimov. Synthesis and characterization of Co/CdSe core/shell nanocomposites : bifunctional magnetic-optical nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 127(2) :544–6, 2005.
- [125] Hongwei Gu, Rongkun Zheng, XiXiang Zhang, and Bing Xu. Facile one-pot synthesis of bifunctional heterodimers of nanoparticles : a conjugate of quantum dot and magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(18) :5664–5, 2004.
- [126] Hunter McDaniel and Moonsub Shim. Size and growth rate dependent structural diversification of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CdS anisotropic nanocrystal heterostructures. *ACS nano*, 3(2) :434–440, 2009.

- [127] Jinhao Gao, Wei Zhang, Pingbo Huang, Bei Zhang, Xixiang Zhang, and Bing Xu. Intracellular spatial control of fluorescent magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 130(12) :3710–1, 2008.
- [128] Shizhong Wang, Benjamin R Jarrett, Susan M Kauzlarich, and Angelique Y Louie. Core/shell quantum dots with high relaxivity and photoluminescence for multimodality imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129(13) :3848–3856, 2007.
- [129] Ajoy Kumar Saha, Parvesh Sharma, Han-Byul Sohn, Siddhartha Ghosh, Ritesh K. Das, Arthur F. Hebard, Huadong Zeng, Celine Baligand, Glenn A. Walter, and Brij M. Moudgil. Fe doped CdTeS magnetic quantum dots for bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(45) :6312–6320, 2013.
- [130] Narendra Singh, Shobhit Charan, Kumar Sanjiv, Shih-Hsin Huang, Yu-Chu Hsiao, Chiung-Wen Kuo, Fan-Ching Chien, Te-Chang Lee, and Peilin Chen. Synthesis of tunable and multifunctional Ni-doped near-infrared QDs for cancer cell targeting and cellular sorting. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3) :421–430, 2012.
- [131] Y Sahoo, P Poddar, H Srikanth, D W Lucey, and P N Prasad. Chemically fabricated magnetic quantum dots of InP :Mn. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(32) :15221–15225, 2005.
- [132] Q. Zhang, Xianyu Chen, Yuxue Zhou, Guobing Zhang, and Shu-hong Yu. Synthesis of ZnWO<sub>4</sub>@MWO<sub>4</sub> (M = Mn, Fe) core-shell nanorods with optical and antiferromagnetic property by oriented attachment mechanism. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(10) :3927–3933, 2007.
- [133] Chuqiao Tu, Xuchu Ma, Periklis Pantazis, Susan M Kauzlarich, and Angelique Y Louie. Paramagnetic, silicon quantum dots for magnetic resonance and two-photon imaging of macrophages. *Journal of the American Chemical Society*, 132(6) :2016–2023, 2010.
- [134] Lyudmila Turyanska, Fabrizio Moro, Andrew N. Knott, Michael W. Fay, Tracey D. Bradshaw, and Amalia Patanè. Paramagnetic, Near-Infrared Fluorescent Mn-Doped PbS Colloidal Nanocrystals. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(11) :945–949, 2013.
- [135] Chaohui Zhou, Hui Wu, Chusen Huang, Mingliang Wang, and Nengqin Jia. Facile Synthesis of Single-Phase Mesoporous Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> :Eu Nanorods and Their Applica-

- tion for Drug Delivery and Multimodal Imaging. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(6) :675–684, 2014.
- [136] Yan Zhang, Jing Dong Lin, Vimalan Vijayaragavan, Kishore K Bhakoo, and Timothy Thatt Yang Tan. Tuning sub-10 nm single-phase NaMnF<sub>3</sub> nanocrystals as ultrasensitive hosts for pure intense fluorescence and excellent T<sub>1</sub> magnetic resonance imaging. *Chemical Communications*, 48(83) :10322–4, 2012.
- [137] Dong Kee Yi, S Tamil Selvan, Su Seong Lee, Georgia C Papaefthymiou, Darshan Kundaliya, and Jackie Y Ying. Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*, 127(14) :4990–4991, 2005.
- [138] Verónica Salgueiriño Maceira, Miguel A. Correa-Duarte, Marina Spasova, Luis M. Liz-Marzán, and Michael Farle. Composite Silica Spheres with Magnetic and Luminescent Functionalities. *Advanced Functional Materials*, 16(4) :509–514, 2006.
- [139] Xia Hong, Jun Li, Meijia Wang, Jinjie Xu, Wei Guo, Jinghong Li, Yubai Bai, and Tiejun Li. Fabrication of Magnetic Luminescent Nanocomposites by a Layer-by-Layer Self-assembly Approach. *Chemistry of Materials*, 16(21) :4022–4027, 2004.
- [140] M M Hüber, a B Staubli, K Kustedjo, M H Gray, J Shih, S E Fraser, R E Jacobs, and T J Meade. Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents. *Bioconjugate Chemistry*, 9(2) :242–9, 1998.
- [141] Heesun Yang, Swadeshmukul Santra, Glenn A. Walter, and Paul H Holloway. Gd<sup>III</sup>-functionalized fluorescent quantum dots as multimodal imaging probes. *Advanced Materials*, 18(21) :2890–2894, 2006.
- [142] Graeme J Stasiuk, Sudarsan Tamang, Daniel Imbert, Cathy Poillot, Marco Giardiello, Céline Tisseyre, Emmanuel L Barbier, Pascal Henry Fries, Michel de Waard, Peter Reiss, and Marinella Mazzanti. Cell-permeable Ln(III) chelate-functionalized InP quantum dots as multimodal imaging agents. *ACS nano*, 5(10) :8193–8201, 2011.
- [143] Graeme J Stasiuk, Sudarsan Tamang, Daniel Imbert, Christelle Gateau, Peter Reiss, Pascal Fries, and Marinella Mazzanti. Optimizing the relaxivity of Gd(III) complexes appended to InP/ZnS quantum dots by linker tuning. *Dalton Transactions*, 42(23) :8197–8200, 2013.

- [144] Xiaoyu Sun, Ke Ding, Yi Hou, Zhenyu Gao, Wensheng Yang, Lihong Jing, and Mingyuan Gao. Bifunctional superparticles achieved by assembling fluorescent  $\text{CuInS}_2@ZnS$  quantum dots and amphibious  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(40) :21014–21020, 2013.
- [145] Babao Lin, Xiuzhong Yao, Yihua Zhu, Jianhua Shen, Xiaoling Yang, and Chunzhong Li. Multifunctional gadolinium-labeled silica-coated core/shell quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging of cancer cells. *RSC Advances*, 4(40) :20641–20648, 2014.
- [146] Chun-yi Cheng, Keng-liang Ou, Wei-ting Huang, Jem-kun Chen, Jia-yaw Chang, and Cheng-hsien Yang. Gadolinium-based  $\text{CuInS}_2/ZnS$  nanoprobe for dual-modality magnetic resonance/optical imaging. *ACS applied materials & interfaces*, 5(10) :4389–4400, 2013.
- [147] Goutam Manna, Santanu Jana, Riya Bose, and Narayan Pradhan. Mn-Doped Multinary CIZS and AIZS Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(18) :2528–2534, 2012.
- [148] Babao Lin, Xiuzhong Yao, Yihua Zhu, Jianhua Shen, Xiaoling Yang, Hongliang Jiang, and Xiaoqing Zhang. Multifunctional manganese-doped core-shell quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging of cancer cells. *New Journal of Chemistry*, 37(10) :3076–3083, 2013.
- [149] Ke Ding, Lihong Jing, Chunyan Liu, Yi Hou, and Mingyuan Gao. Magnetically engineered Cd-free quantum dots as dual-modality probes for fluorescence/magnetic resonance imaging of tumors. *Biomaterials*, 35(5) :1608–17, 2014.
- [150] Austin M. Derfus, Warren C. W. Chan, and Sangeeta N. Bhatia. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4(1) :11–18, 2004.
- [151] Ron Hardman. A Toxicologic Review of Quantum Dots : Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives*, 114(2) :165–172, 2006.
- [152] Marion Helle, Elsa Cassette, Lina Bezdetnaya, Thomas Pons, Agnès Leroux, François Plénat, François Guillemin, Benoit Dubertret, and Frédéric Marchal. Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model. *PLoS ONE*, 7(8) :e44433, 2012.

- [153] Qiang Li, Lanlan Zhai, Chao Zou, Xusheng Huang, Lijie Zhang, Yun Yang, Xi'an Chen, and Shaoming Huang. Wurtzite CuInS<sub>2</sub> and CuIn<sub>x</sub>Ga<sub>1-x</sub>S<sub>2</sub> nanoribbons : synthesis, optical and photoelectrical properties. *Nanoscale*, 5(4) :1638–48, 2013.
- [154] J. L. Shay, Sigurd Wagner, and H. M. Kasper. Efficient CuInSe<sub>2</sub>/CdS solar cells. *Applied Physics Letters*, 27(2) :89–90, 1975.
- [155] L. L. Kazmerski, F. R. White, and G. K. Morgan. Thin-film CuInSe<sub>2</sub>/CdS heterojunction solar cells. *Applied Physics Letters*, 29(4) :268, 1976.
- [156] Qijie Guo, Suk Jun Kim, Mahaprasad Kar, William N Shafarman, Robert W Birkmire, Eric A Stach, Rakesh Agrawal, and Hugh W Hillhouse. Development of CuInSe<sub>2</sub> nanocrystal and nanoring inks for low-cost solar cells. *Nano letters*, 8(9) :2982–7, 2008.
- [157] Renguo Xie, Michael Rutherford, and Xiaogang Peng. Formation of high-quality I-III-VI semiconductor nanocrystals by tuning relative reactivity of cationic precursors. *Journal of the American Chemical Society*, 131(15) :5691–5697, 2009.
- [158] Stephanie L. Castro, Sheila G. Bailey, Ryne P. Raffaele, Kulbinder K. Banger, and Aloysius F. Hepp. Synthesis and characterization of colloidal CuInS<sub>2</sub> nanoparticles from a molecular single-source precursor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(33) :12429–12435, 2004.
- [159] JJM Binsma, LJ Giling, and J Bloem. Luminescence of CuInS<sub>2</sub> : II. Exciton and near edge emission. *Journal of Luminescence*, 27 :55–72, 1982.
- [160] JJM Binsma, LJ Giling, and J Bloem. Luminescence of CuInS<sub>2</sub> : I. The broad band emission and its dependence on the defect chemistry. *Journal of Luminescence*, 27 :35–53, 1982.
- [161] Liang Li, Anshu Pandey, Donald J Werder, Bishnu P Khanal, Jeffrey M Pietryga, Victor I Klimov, and Los Alamos. Efficient synthesis of highly luminescent copper indium sulfide-based core/shell nanocrystals with surprisingly long-lived emission. *Journal of the American Chemical Society*, 133(5) :1176–1179, 2011.
- [162] SB Zhang, Su-huai Wei, Alex Zunger, and H. Katayama-Yoshida. Defect physics of the CuInSe<sub>2</sub> chalcopyrite semiconductor. *Physical Review B*, 57(16) :9642–9656, 1998.

- [163] Takahisa Omata, Katsuhiko Nose, and Shinya Otsuka-Yao-Matsuo. Size dependent optical band gap of ternary I-III-VI<sub>2</sub> semiconductor nanocrystals. *Journal of Applied Physics*, 105(7) :073106, 2009.
- [164] Bingkun Chen, Haizheng Zhong, Wenqing Zhang, Zhan'ao Tan, Yongfang Li, Cairan Yu, Tianyou Zhai, Yoshio Bando, Shengyi Yang, and Bingsuo Zou. Highly emissive and color-tunable CuInS<sub>2</sub>-based colloidal semiconductor nanocrystals : off-stoichiometry effects and improved electroluminescence performance. *Advanced Functional Materials*, 22(10) :2081–2088, 2012.
- [165] Woo-Seuk Song and Heesun Yang. Fabrication of white light-emitting diodes based on solvothermally synthesized copper indium sulfide quantum dots as color converters. *Applied Physics Letters*, 100(18) :183104, 2012.
- [166] Woo-Seuk Song, Eun-Pyo Jang, Jong-Hoon Kim, Ho Seong Jang, and Heesun Yang. Unique oxide overcoating of CuInS<sub>2</sub>/ZnS core/shell quantum dots with ZnGa<sub>2</sub>O<sub>4</sub> for fabrication of white light-emitting diode with improved operational stability. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(2) :1462, 2013.
- [167] Jiang Tang, Gerasimos Konstantatos, Sean Hinds, Stefan Myrskog, Andras G Pattantyus-Abraham, Jason Clifford, and Edward H Sargent. Heavy-metal-free solution-processed nanoparticle-based photodetectors : doping of intrinsic vacancies enables engineering of sensitivity and speed. *ACS nano*, 3(2) :331–338, 2009.
- [168] Stephanie L. Castro, Sheila G. Bailey, Ryne P. Raffaele, Kulbinder K. Banger, and Aloysius F. Hepp. Nanocrystalline chalcopyrite materials (CuInS<sub>2</sub> and CuInSe<sub>2</sub>) via low-temperature pyrolysis of molecular single-source precursors. *Chemistry of Materials*, 15(16) :3142–3147, 2003.
- [169] Chivin Sun, Joseph S. Gardner, Endrit Shurdha, Kelsey R. Margulieux, Richard D. Westover, Lisa Lau, Gary Long, Cyril Bajracharya, Chongmin Wang, Aaron Thuber, Alex Punnoose, Rene G. Rodriguez, and Joshua J. Pak. A high-yield synthesis of chalcopyrite CuInS<sub>2</sub> nanoparticles with exceptional size control. *Journal of Nanomaterials*, 2009 :748567, 2009.
- [170] Gui Huan Du, Zu Li Liu, Qiang Hua Lu, Xing Xia, Li Hui Jia, Kai Lun Yao, Qian Chu, and Su Ming Zhang. Fe<sub>3</sub> O<sub>4</sub>/CdSe/ZnS magnetic fluorescent bifunctional nanocomposites. *Nanotechnology*, 17(12) :2850–2854, 2006.

- [171] Daocheng Pan, Xiaolei Wang, Z. Hong Zhou, Wei Chen, Chuanlai Xu, and Yunfeng Lu. Synthesis of Quaternary Semiconductor Nanocrystals with Tunable Band Gaps. *Chemistry of Materials*, 21(12) :2489–2493, 2009.
- [172] Shiyong Yu, Xuechuan Gao, Hui Jing, Renfei Zhang, Xiaolong Gao, and Haiquan Su. Fabrication and characterization of novel magnetic/luminescent multifunctional nanocomposites for controlled drug release. *CrystEngComm*, 16(29) :6645–6653, 2014.
- [173] M. A. Malik, P. O’Brien, and N. Revaprasadu. A Novel Route for the Preparation of CuSe and CuInSe<sub>2</sub> Nanoparticles. *Advanced Materials*, 11(17) :1441–1444, 1999.
- [174] Liang Li, T. Jean Daou, Isabelle Texier, Tran Thi Kim Chi, Nguyen Quang Liem, and Peter Reiss. Highly luminescent CuInS<sub>2</sub>/ZnS core/shell nanocrystals : cadmium-free quantum dots for *in vivo* imaging. *Chemistry of Materials*, 21(12) :2422–2429, 2009.
- [175] Bonil Koo, Reken N Patel, and Brian A Korgel. Synthesis of CuInSe<sub>2</sub> nanocrystals with trigonal pyramidal shape. *Journal of the American Chemical Society*, 131(9) :3134–5, 2009.
- [176] S. Schorr, V. Riede, D. Spemann, and Th. Doering. Electronic band gap of Zn<sub>2x</sub>(CuIn)<sub>1-x</sub>X<sub>2</sub> solid solution series (X=S, Se, Te). *Journal of Alloys and Compounds*, 414(1-2) :26–30, 2006.
- [177] Haizheng Zhong, Yi Zhou, Mingfu Ye, Youjun He, Jianping Ye, Chang He, Chunhe Yang, and Yongfang Li. Controlled synthesis and optical properties of colloidal ternary chalcogenide CuInS<sub>2</sub> nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 20(20) :6434–6443, 2008.
- [178] C Javaux, B Mahler, B Dubertret, A Shabaev, A V Rodina, Alexander L L Efros, D R Yakovlev, F Liu, M Bayer, G Camps, L Biadala, S Buil, X Quelin, and J-P Hermier. Thermal activation of non-radiative Auger recombination in charged colloidal nanocrystals. *Nature nanotechnology*, 8(3) :206–12, 2013.
- [179] Sungjee Kim, Brent Fisher, Hans-Jürgen Eisler, and Mounqi Bawendi. Type-II quantum dots : CdTe/CdSe(core/shell) and CdSe/ZnTe(core/shell) heterostructures. *Journal of the American Chemical Society*, 125(38) :11466–7, 2003.
- [180] Mingye Sun, Dehua Zhu, Wenyu Ji, Pengtao Jing, Xiuying Wang, Weidong Xiang, and Jialong Zhao. Exploring the effect of band alignment and surface states on

- photoinduced electron transfer from CuInS<sub>2</sub>/CdS core/shell quantum dots to TiO<sub>2</sub> electrodes. *ACS applied materials & interfaces*, 5(23) :12681–12688, 2013.
- [181] Yu-Xiang Yu, Wei-Xin Ouyang, Zhou-Ting Liao, Bin-Bin Du, and Wei-De Zhang. Construction of ZnO/ZnS/CdS/CuInS<sub>2</sub> core-shell nanowire arrays via ion exchange : p-n junction photoanode with enhanced photoelectrochemical activity under visible light. *ACS applied materials & interfaces*, 6(11) :8467–8474, 2014.
- [182] Leshuai W Zhang, William W Yu, Vicki L Colvin, and Nancy a Monteiro-Riviere. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 228(2) :200–211, 2008.
- [183] Jung Ho Yu, Seung-Hae Kwon, Zdeněk Petrášek, Ok Kyu Park, Samuel Woojoo Jun, Kwangsoo Shin, Moonkee Choi, Yong Il Park, Kyeongsoon Park, Hyon Bin Na, Nohyun Lee, Dong Won Lee, Jeong Hyun Kim, Petra Schwille, and Taeghwan Hyeon. High-resolution three-photon biomedical imaging using doped ZnS nanocrystals. *Nature materials*, 12(4) :359–366, 2013.
- [184] Boon-Kin Pong, Bernhardt L Trout, and Jim-Yang Lee. Modified ligand-exchange for efficient solubilization of CdSe/ZnS quantum dots in water : a procedure guided by computational studies. *Langmuir*, 24(10) :5270–6, 2008.
- [185] S B Zhang, Su-huai Wei, and Alex Zunger. A phenomenological model for systematization and prediction of doping limits in II-VI and I-III-VI<sub>2</sub> compounds. *Journal of Applied Physics*, 83(6) :3192–3196, 1998.
- [186] J Jack Li, Y Andrew Wang, Wenzhuo Guo, Joel C Keay, Tetsuya D Mishima, Matthew B Johnson, and Xiaogang Peng. Large-scale synthesis of nearly monodisperse CdSe/CdS core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41) :12567–12575, 2003.
- [187] David Battaglia, Jack J Li, Yunjun Wang, and Xiaogang Peng. Colloidal two-dimensional systems : CdSe quantum shells and wells. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(41) :5035–9, 2003.
- [188] Yongan Yang, Ou Chen, Alexander Angerhofer, and Y Charles Cao. Radial-position-controlled doping in CdS/ZnS core/shell nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 128(38) :12428–12429, 2006.

- [189] C. A. Leatherdale, WK Woo, F. V. Mikulec, and Mounji G Bawendi. On the Absorption Cross Section of CdSe Nanocrystal Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(31) :7619–7622, 2002.
- [190] W. William Yu, Lianhua Qu, Wenzhuo Guo, and Xiaogang Peng. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 15(14) :2854–2860, 2003.
- [191] Matthew Booth, Andrew P Brown, Stephen D Evans, and Kevin Critchley. Determining the concentration of CuInS<sub>2</sub> quantum dots from the size-dependent molar extinction coefficient. *Chemistry of Materials*, 24(11) :2064–2070, 2012.
- [192] Lei Qin, Dongze Li, Zhuolei Zhang, Kefei Wang, Hong Ding, Renguo Xie, and Wensheng Yang. The determination of extinction coefficient of CuInS<sub>2</sub>, and ZnCuInS<sub>3</sub> multinary nanocrystals. *Nanoscale*, 4(20) :6360–6364, 2012.
- [193] Margaret a. Hines and Philippe Guyot-Sionnest. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(2) :468–471, 1996.
- [194] B O Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F V Mikulec, J R Heine, H Mattoussi, R Ober, K F Jensen, and M G Bawendi. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots : synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(46) :9463–9475, 1997.
- [195] Shinae Jun and Eunjoo Jang. Interfused semiconductor nanocrystals : brilliant blue photoluminescence and electroluminescence. *Chemical Communications*, 1(36) :4616–4618, 2005.
- [196] Shinae Jun, Eunjoo Jang, and Jung Eun Lim. Synthesis of multi-shell nanocrystals by a single step coating process. *Nanotechnology*, 17(15) :3892–3896, 2006.
- [197] Myriam Protière and Peter Reiss. Facile synthesis of monodisperse ZnS capped CdS nanocrystals exhibiting efficient blue emission. *Nanoscale Research Letters*, 1(1) :62–67, 2006.
- [198] Benoit Mahler, Brice Nadal, Cecile Bouet, Gilles Patriarche, and Benoit Dubertret. Core/shell colloidal semiconductor nanoplatelets. *Journal of the American Chemical Society*, 134(45) :18591–8, 2012.

- [199] Sandrine Ithurria and Dmitri V Talapin. Colloidal atomic layer deposition (c-ALD) using self-limiting reactions at nanocrystal surface coupled to phase transfer between polar and nonpolar media. *Journal of the American Chemical Society*, 134(45) :18585–90, 2012.
- [200] Wenjin Zhang and Xinhua Zhong. Facile synthesis of ZnS-CuInS<sub>2</sub>-alloyed nanocrystals for a color-tunable fluorochrome and photocatalyst. *Inorganic Chemistry*, 50(9) :4065–4072, 2011.
- [201] Luca De Trizio, Mirko Prato, Alessandro Genovese, Alberto Casu, Mauro Povia, Roberto Simonutti, Marcelo J P Alcocer, Cosimo D'Andrea, Francesco Tascone, and Liberato Manna. Strongly fluorescent quaternary Cu-In-Zn-S nanocrystals prepared from Cu<sub>1-x</sub>InS<sub>2</sub> nanocrystals by partial cation exchange. *Chemistry of Materials*, 24(12) :2400–2406, 2012.
- [202] Jaehyun Park and Sang-Wook Kim. CuInS<sub>2</sub>/ZnS core/shell quantum dots by cation exchange and their blue-shifted photoluminescence. *Journal of Materials Chemistry*, 21(11) :3745–3750, 2011.
- [203] Zhanao Tan, Yu Zhang, Chuang Xie, Huaipeng Su, Jie Liu, Chunfeng Zhang, Nicholas Dellas, Suzanne E Mohny, Yongqiang Wang, Jingkang Wang, and Jian Xu. Near-band-edge electroluminescence from heavy-metal-free colloidal quantum dots. *Advanced Materials*, 23(31) :3553–3558, 2011.
- [204] C Sombuthawee, S.B. Bonsall, and F.A. Hummel. Phase equilibria in the systems ZnS-MnS, ZnS-CuInS<sub>2</sub>, and MnS-CuInS<sub>2</sub>. *Journal of Solid State Chemistry*, 25(4) :391–399, 1978.
- [205] Lihong Jing, Ke Ding, Sergii Kalytchuk, Yu Wang, Ruirui Qiao, Stephen V Kershaw, Andrey L Rogach, and Mingyuan Gao. Aqueous manganese-doped core/shell CdTe/ZnS quantum dots with strong fluorescence and high relaxivity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(36) :18752–18761, 2013.
- [206] Kwangjin An, Mihyun Park, Jung Ho Yu, Hyon Bin Na, Nohyun Lee, Jongnam Park, Seung Hong Choi, In Chan Song, Woo Kyung Moon, and Taeghwan Hyeon. Synthesis of uniformly sized manganese oxide nanocrystals with various sizes and shapes and characterization of their T<sub>1</sub> magnetic resonance relaxivity. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012(12) :2148–2155, 2012.

- [207] Thomas D. Schladt, Tanja Graf, and Wolfgang Tremel. Synthesis and characterization of monodisperse manganese oxide nanoparticles-Evaluation of the nucleation and growth mechanism. *Chemistry of Materials*, 21(14) :3183–3190, 2009.
- [208] Alessandra Puglisi, Sara Mondini, Simone Cenedese, Anna M. Ferretti, Nadia Santo, and Alessandro Ponti. Monodisperse Octahedral  $\alpha$ -MnS and MnO Nanoparticles by the Decomposition of Manganese Oleate in the Presence of Sulfur. *Chemistry of Materials*, 22(9) :2804–2813, 2010.
- [209] Daisuke Ito, Shun Yokoyama, Tatiana Zaikova, Keiichiro Masuko, and James E Hutchison. Synthesis of Ligand-Stabilized Metal Oxide Nanocrystals and Epitaxial Core/Shell Nanocrystals via a Lower-Temperature Esterification Process. *ACS nano*, 8(1) :64–75, 2014.
- [210] Ludwig Wilhelm Winkler. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 21(2) :2843–2854, 1888.
- [211] Patrick G. McCormick. The determination of dissolved oxygen by the Winkler method. A student laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*, 49(12) :839–841, 1972.
- [212] Narayan Pradhan and Xiaogang Peng. Efficient and color-tunable Mn-doped ZnSe nanocrystal emitters : control of optical performance via greener synthetic chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 129(11) :3339–47, 2007.
- [213] Yongan Yang, Ou Chen, Alexander Angerhofer, and Y Charles Cao. On doping CdS/ZnS core/shell nanocrystals with Mn. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46) :15649–15661, 2008.
- [214] Yuichiro Ishikawa. ESR Spectra of Exchange-Coupled  $Mn^{2+}$  Ions in ZnS and CdS. *Journal of the Physical Society of Japan*, 21(8) :1473–1481, 1966.
- [215] R. Kremer and J. Furdyna. Dependence of EPR in diluted magnetic semiconductors on the host lattice. *Physical Review B*, 31(1) :1–4, 1985.
- [216] AK Koh and DJ Miller. The systematic variation of the EPR parameters of manganese in II-VI semiconductors. *Solid State Communications*, 60(3) :217–222, 1986.

- [217] S V Nistor and M Stefan. In-depth investigation of EPR spectra of Mn(2+) ions in ZnS single crystals with pure cubic structure. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 21(14) :145408, 2009.
- [218] T. Kennedy, E. Glaser, P. Klein, and R. Bhargava. Symmetry and electronic structure of the Mn impurity in ZnS nanocrystals. *Physical Review B*, 52(20) :R14356–R14359, 1995.
- [219] Subhajit Biswas, Soumitra Kar, and Subhadra Chaudhuri. Solvothermal synthesis of  $\alpha$ -MnS single crystals. *Journal of Crystal Growth*, 284(1-2) :129–135, 2005.
- [220] Soumitra Kar, Paritosh Dutta, Tanusri Pal, and Surajit Ghosh. Simple solvothermal route to synthesize S-doped ZnO nanonails and ZnS/ZnO core/shell nanorods. *Chemical Physics Letters*, 473(1-3) :102–107, 2009.
- [221] Raihana Begum, Satyapriya Bhandari, and Arun Chattopadhyay. Surface ion engineering of Mn<sup>2+</sup>-doped ZnS quantum dots using ion-exchange resins. *Langmuir*, 28(25) :9722–8, 2012.
- [222] Anna Pajaczkowska. Physicochemical properties and crystal growth of AIIBVI - MnBVI systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 1(3) :289–326, 1978.
- [223] Dongyeon Son, Dae-ryong Jung, Jongmin Kim, Taeho Moon, Chunjoong Kim, and Byungwoo Park. Synthesis and photoluminescence of Mn-doped zinc sulfide nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 90(10) :101910, 2007.
- [224] Lester Corliss, Norman Elliott, and Julius Hastings. Magnetic Structures of the Polymorphic Forms of Manganous Sulfide. *Physical Review*, 104(4) :924–928, 1956.
- [225] Marina A Dobrovolskaia, Parag Aggarwal, Jennifer B Hall, and Scott E McNeil. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4) :487–95, 2009.
- [226] Igor L Medintz, H Tetsuo Uyeda, Ellen R Goldman, and Hedi Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature materials*, 4(6) :435–46, 2005.
- [227] Ron Gill, Maya Zayats, and Itamar Willner. Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(40) :7602–25, 2008.

- [228] Yanjie Zhang and Aaron Clapp. Overview of stabilizing ligands for biocompatible quantum dot nanocrystals. *Sensors*, 11(12) :11036–55, 2011.
- [229] S. B. Brichkin and E. V. Chernykh. Hydrophilic semiconductor quantum dots. *High Energy Chemistry*, 45(1) :1–12, 2011.
- [230] Alessandra Quarta, Alberto Curcio, Hamilton Kakwere, and Teresa Pellegrino. Polymer coated inorganic nanoparticles : tailoring the nanocrystal surface for designing nanoprobe with biological implications. *Nanoscale*, 4(11) :3319–34, 2012.
- [231] Teresa Pellegrino, Liberato Manna, Stefan Kudera, Tim Liedl, Dmitry Koktysh, Andrey L Rogach, Simon Keller, Joachim Rädler, Giovanni Natile, and Wolfgang J Parak. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell : a general route to water soluble nanocrystals. *Nano Letters*, 4(4) :703–707, 2004.
- [232] Emma E Lees, Tich-lam Nguyen, Andrew H A Clayton, Benjamin W Muir, and Paul Mulvaney. The preparation of colloiddally stable, water-soluble, biocompatible, semiconductor nanocrystals with a small hydrodynamic diameter. *ACS nano*, 3(5) :1121–1128, 2009.
- [233] Wolfgang Maret. Zinc and sulfur : a critical biological partnership. *Biochemistry*, 43(12) :3301–3309, 2004.
- [234] Warren C. W. Chan and Shuming Nie. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*, 281(5385) :2016–2018, 1998.
- [235] Daniele Gerion, Fabien Pinaud, Shara C. Williams, Wolfgang J. Parak, Daniela Zanchet, Shimon Weiss, and a. Paul Alivisatos. Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(37) :8861–8871, 2001.
- [236] Wenhao Liu, Hak Soo Choi, John P Zimmer, Eiichi Tanaka, John V Frangioni, and Mounqi Bawendi. Compact cysteine-coated CdSe(ZnCdS) quantum dots for *in vivo* applications. *Journal of the American Chemical Society*, 129(47) :14530–14531, 2007.
- [237] Gregory P Mitchell, Chad A Mirkin, and Robert L Letsinger. Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 121(35) :8122–8123, 1999.

- [238] Ponnusamy Babu, Sharmistha Sinha, and Avadhesh Surolia. Sugar-quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins. *Bioconjugate Chemistry*, 18(1) :146–51, 2007.
- [239] Wolfgang J Parak, Daniele Gerion, Teresa Pellegrino, Daniela Zanchet, Christine Micheel, Shara C Williams, Rosanne Boudreau, Mark A Le Gros, Carolyn A Labrabel, and A Paul Alivisatos. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 14(7) :R15, 2003.
- [240] Philipp Schapotschnikow, Bob Hommersom, and Thijs J. H. Vlucht. Adsorption and binding of ligands to CdSe nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(29) :12690–12698, 2009.
- [241] Hedi Mattoussi, J Matthew Mauro, Ellen R Goldman, George P Anderson, Vikram C Sundar, Frederic V Mikulec, and Mounji G Bawendi. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society*, 122(49) :12142–12150, 2000.
- [242] Kimihiro Susumu, H Tetsuo Uyeda, Igor L Medintz, Thomas Pons, James B Delehanty, and Hedi Mattoussi. Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45) :13987–13996, 2007.
- [243] Paul T Charles, Veronte R Stubbs, Carissa M Soto, Brett D Martin, Brandy J White, and Chris R Taitt. Reduction of non-specific protein adsorption using poly(ethylene glycol) (PEG) modified polyacrylate hydrogels in immunoassays for Staphylococcal Enterotoxin B detection. *Sensors*, 9(1) :645–55, 2009.
- [244] T Jean Daou, Liang Li, Peter Reiss, Véronique Jossierand, and Isabelle Texier. Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots. *Langmuir*, 25(5) :3040–4, 2009.
- [245] Bing C. Mei, Kimihiro Susumu, Igor L. Medintz, James B. Delehanty, T. J. Mountziaris, and Hedi Mattoussi. Modular poly(ethylene glycol) ligands for biocompatible semiconductor and gold nanocrystals with extended pH and ionic stability. *Journal of Materials Chemistry*, 18(41) :4949–4958, 2008.
- [246] Céline Durand-Gasselín, Mathieu Capelot, Nicolas Sanson, and Nicolas Lequeux. Tunable and reversible aggregation of poly(ethylene oxide-st-propylene oxide) grafted gold nanoparticles. *Langmuir*, 26(14) :12321–9, 2010.

- [247] Huirui Zhou, Ke Tao, Jing Ding, Zhaofeng Zhang, Kang Sun, and Weibin Shi. A general approach for providing nanoparticles water-dispersibility by grinding with poly (ethylene glycol). *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1-3) :18–26, 2011.
- [248] Jinbin Liu, Mengxiao Yu, Xuhui Ning, Chen Zhou, Shengyang Yang, and Jie Zheng. PEGylation and Zwitterionization : Pros and Cons in the Renal Clearance and Tumor Targeting of Near-IR-Emitting Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(48) :12572–12576, 2013.
- [249] Marion Helle, Enrico Rampazzo, Morgane Monchanin, Frédéric Marchal, François Guillemin, Sara Bonacchi, Francesca Salis, Luca Prodi, and Lina Bezdetnaya. Surface chemistry architecture of silica nanoparticles determine the efficiency of *in vivo* fluorescence lymph node mapping. *ACS nano*, 7(10) :8645–57, 2013.
- [250] Chunxia Li, Dongmei Yang, Ping’an Ma, Yinyin Chen, Yuan Wu, Zhiyou Hou, Yunlu Dai, Jihong Zhao, Changping Sui, and Jun Lin. Multifunctional upconversion mesoporous silica nanostructures for dual modal imaging and *in vivo* drug delivery. *Small*, 9(24) :4150–4159, 2013.
- [251] Eleonora Muro, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Alexandra Fragola, Nicolas Sanson, Zsolt Lenkei, and Benoit Dubertret. Small and stable sulfobetaine zwitterionic quantum dots for functional live-cell imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13) :4556–4557, 2010.
- [252] Eleonora Muro, Alexandra Fragola, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Andriani Ioannou, Paris Skourides, and Benoit Dubertret. Comparing intracellular stability and targeting of sulfobetaine quantum dots with other surface chemistries in live cells. *Small*, 8(7) :1029–1037, 2012.
- [253] S Pathak, S K Choi, N Arnheim, and M E Thompson. Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 123(17) :4103–4104, 2001.
- [254] Fabien Dubois, Benoit Mahler, Benoit Dubertret, Eric Doris, and Charles Mioskowski. A versatile strategy for quantum dot ligand exchange. *Journal of the American Chemical Society*, 129(3) :482–3, 2007.

- [255] Claudia Querner, Peter Reiss, Joël Bleuse, and Adam Pron. Chelating ligands for nanocrystals' surface functionalization. *Journal of the American Chemical Society*, 126(37) :11574–11582, 2004.
- [256] Claudia Querner, Alessandro Benedetto, Renaud Demadrille, Patrice Rannou, and Peter Reiss. Carbodithioate-containing oligo- and polythiophenes for nanocrystals' surface functionalization. *Chemistry of Materials*, 18(20) :4817–4826, 2006.
- [257] Emerson Giovanelli, Eleonora Muro, Gary Sitbon, Mohamed Hanafi, Thomas Pons, Benoit Dubertret, and Nicolas Lequeux. Highly enhanced affinity of multidentate versus bidentate zwitterionic ligands for long-term quantum dot bioimaging. *Langmuir*, 28(43) :15177–84, 2012.
- [258] Japan National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). Spectral Database for Organic Compounds. [http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre_index.cgi).
- [259] Goutam Palui, Hyon Bin Na, and Hedi Mattoussi. Poly(ethylene glycol)-based multidentate oligomers for biocompatible semiconductor and gold nanocrystals. *Langmuir*, 28(5) :2761–2772, 2012.
- [260] K Bae, J B Na, D S Choi, J M Cho, H C Choi, K-N Jeon, M J Park, H Y Choi, J E Kim, and S H Chung. Contrast-enhanced MR cholangiography : comparison of Gd-EOB-DTPA and Mn-DPDP in healthy volunteers. *The British Journal of Radiology*, 85(1017) :1250–4, 2012.
- [261] F Bosch Serrat. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine for the colorimetric determination of manganese in water. *Mikrochimica Acta*, 129(1-2) :77–80, 1998.
- [262] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2) :55–63, 1983.
- [263] N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman, and L.W. Zhang. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(2) :222–235, 2009.
- [264] Sasanka Deka, Alessandra Quarta, Maria Grazia Lupo, Andrea Falqui, Simona Boninelli, Cinzia Giannini, Giovanni Morello, Milena De Giorgi, Guglielmo Lanzani, Corrado Spinella, Roberto Cingolani, Teresa Pellegrino, and Liberato Manna.

- CdSe/CdS/ZnS double shell nanorods with high photoluminescence efficiency and their exploitation as biolabeling probes. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8) :2948–58, 2009.
- [265] Yuanyuan Su, Yao He, Haoting Lu, Liman Sai, Qingnuan Li, Wenxin Li, Lianhui Wang, Pingping Shen, Qing Huang, and Chunhai Fan. The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase-synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating. *Biomaterials*, 30(1) :19–25, 2009.
- [266] Kim M Tsoi, Qin Dai, Benjamin A Alman, and Warren C W Chan. Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Accounts of Chemical Research*, 46(3) :662–671, 2013.
- [267] Ken-Tye Yong, Wing-Cheung Law, Rui Hu, Ling Ye, Liwei Liu, Mark T Swihart, and Paras N Prasad. Nanotoxicity assessment of quantum dots : from cellular to primate studies. *Chemical Society reviews*, 42(3) :1236–1250, 2013.
- [268] Ling Ye, Ken-tye Yong, Liwei Liu, Indrajit Roy, Rui Hu, Jing Zhu, Hongxing Cai, Wing-cheung Law, Jianwei Liu, Kai Wang, Jing Liu, Yaqian Liu, Yazhuo Hu, Xihe Zhang, Mark T Swihart, and Paras N Prasad. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nature Nanotechnology*, 7(7) :453–458, 2012.
- [269] E Hindié, D Groheux, M Espie, E Boursstyn, M Toubert, F Sarandi, and A De Roquancourt. Synthèse La technique du ganglion sentinelle dans le cancer du sein : quelques considérations récentes. *Bulletin du Cancer*, 96(6) :713–725, 2009.
- [270] V M Cimmino, a C Brown, J F Szocik, H a Pass, S Moline, S K De, and E F Domino. Allergic reactions to isosulfan blue during sentinel node biopsy—a common event. *Surgery*, 130(3) :439–42, 2001.
- [271] L Barthelmes, A Goyal, R G Newcombe, F McNeill, and R E Mansel. Adverse reactions to patent blue V dye - The NEW START and ALMANAC experience. *European Journal of Surgical Oncology*, 36(4) :399–403, 2010.
- [272] Sungjee Kim, Yong Taik Lim, Edward G Soltesz, Alec M De Grand, Jaihyoung Lee, Akira Nakayama, J Anthony Parker, Tomislav Mihaljevic, Rita G Laurence, Delphine M Dor, Lawrence H Cohn, Mounqi G Bawendi, and John V Frangioni. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature biotechnology*, 22(1) :93–7, 2004.

- [273] Haizheng Zhong, Shun S Lo, Tihana Mirkovic, Yunchao Li, Yuqin Ding, Yongfang Li, and Gregory D Scholes. Noninjection gram-scale synthesis of monodisperse pyramidal  $\text{CuInS}_2$  nanocrystals and their size-dependent properties. *ACS nano*, 4(9) :5253–5262, 2010.
- [274] H Tetsuo Uyeda, Igor L Medintz, Jyoti K Jaiswal, Sanford M Simon, and Hedi Mattoussi. Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11) :3870–3878, 2005.
- [275] Penghe Qiu and Chuanbin Mao. Viscosity gradient as a novel mechanism for the centrifugation-based separation of nanoparticles. *Advanced Materials*, 23(42) :4880–4885, 2011.
- [276] Joseph B Miller, John M Harris, and Erik K Hobbie. Purifying Colloidal Nanoparticles through Ultracentrifugation with Implications for Interfaces and Materials. *Langmuir*, 30(27) :7936–7946, 2014.
- [277] P. S. Vincett, E. M. Voigt, and K. E. Rieckhoff. Phosphorescence and fluorescence of phthalocyanines. *The Journal of Chemical Physics*, 55(8) :4131–4140, 1971.



# Table des figures

|     |   |    |
|-----|---|----|
| I.1 | Image d'une coupe sagittale de cerveau humain obtenue en IRM anatomique ©CNRS Photothèque, DURAND, Emmanuel . . . . .   | 10 |
| I.2 | Série d'image pondérée en $T_1$ du cerveau d'une souris avant (pré-injection) et après injection d'un agent de contraste. On voit apparaître la tumeur sur les images post-injection (flèche blanche). Image reproduite d'après REF. [25]. . . . .  | 11 |
| I.3 | Mécanismes d'action des agents de contraste . . . . .   | 12 |
| I.4 | Comparaison des images obtenus avec des agents de contraste $T_1$ et $T_2$ pour des concentrations croissantes dans des tubes contenant de l'eau. Image adaptée de la REF. [31]. . . . .  | 12 |
| I.5 | Exemples de complexes de gadolinium utilisés comme agent de contraste   | 14 |
| I.6 | Structure chimique du dipyridoxyl-diphosphate de manganèse commercialisé sous le nom Teslascan™ (GE Healthcare) . . . . .   | 15 |
| I.7 | Comparaison des relaxivités pour un complexe de gadolinium (■) et pour des nanoparticules de $Gd_2O_3$ avec différents ligands en surface : acide D-glucoronique (●), polysiloxane (▲), polyéthylène glycol (▼), dextrane (◆) et sans ligand (▶). Image adaptée de la REF. [47] . . . . . | 16 |
| I.8 | Schéma de principe du « spin canting effect » (a) et influence de la taille de la nanoparticule sur les propriétés magnétiques (b). Image tirée de la REF. [59]. . . . .  | 17 |
| I.9 | Coefficients d'absorption des principaux constituants des tissus. Image tirée de la REF. [60]. . . . .  | 17 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.10 | Démonstration de l'autofluorescence d'organes et des fluides corporels. (a) Image d'une souris sacrifiée et indications de vésicule biliaire (GB), petit intestin (SI) et vessie (Bl). L'autofluorescence a ensuite été visualisée dans trois gammes spectrales en utilisant des filtres passe-bandes à l'excitation/visualisation : (b) bleu (460-500 nm)/vert (505-560 nm); (c) vert (525-555 nm)/rouge (590-650 nm); et rouge (725-775 nm)/proche infra-rouge (790-830 nm). Image tirée de la REF. [61]. . . . . | 18 |
| I.11 | Schéma du diagramme d'énergie du système $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ . Image tirée de la REF. [84] . . . . .  | 20 |
| I.12 | Principe de l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistente (A) et image obtenue 2 minutes après injection sous-cutanée chez la souris de 3 doses différentes de nanoparticules (B). Image tirée de la REF. [89] . .   | 21 |
| I.13 | Schéma des structures de bandes pour les matériaux massifs et des quantum dots de différentes tailles (a); photo de solution de QDs de CdSe avec des tailles comprises entre 2 et 6 nm (b) . . . . .  | 23 |
| I.14 | Récapitulatif des différents matériaux permettant des quantum dots émettant dans la « fenêtre thérapeutique ». Les matériaux pour lesquels la longueur d'onde d'émission ne dépend que de la composition sont entourés de points. Image tirée de la REF. [113] . . . . .  | 24 |
| I.15 | Schéma des principales stratégies adoptées pour la fabrication de sondes bimodales pour l'IRM et l'imagerie de fluorescence. En rouge, l'entité fluorescente. En noir, l'entité magnétique. Image tirée de la REF. [122]. .   | 25 |
| I.16 | Image de microscopie électronique de nanoparticule (a)Co/CdSe (Image tirée de la REF. [124]) (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CdSe}$ (nanoparticules synthétisées au laboratoire). . . . .  | 26 |
| I.17 | Images de microscopie électronique de nanoparticules de silice contenant des particules de maghémite et de CdSe. L'image de haute résolution de la particule indiquée par une flèche permet de confirmer la présence des deux types de particules. . . . .  | 27 |
| I.18 | Schéma du principe de fabrication de sondes obtenues par Hong <i>et al.</i> . Trois couches de polyélectrolytes sont adsorbées successivement sur des nanoparticules d'oxyde de fer (étapes 1 à 3) et on adsorbe ensuite des nanoparticules fluorescentes (étape 4). . . . .  | 28 |
| I.19 | Structure moléculaire du polymère utilisé par Modo <i>et al.</i> [21, 140] une chaîne de dextrane sur laquelle est greffée une rhodamine (orange) et un complexe de gadolinium (bleu). . . . .  | 29 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| I.20  | Schéma des nanoparticules synthétisées durant cette étude. Le cœur de Zn-Cu-In-E assure le caractère fluorescent de nos sondes tandis que les ions manganèse incorporés dans la coque de ZnS leur confère un caractère paramagnétique. . . . .   | 30 |
| II.1  | Schéma des structures cristallines existante pour les chalcogénures. En jaune, les anions ( $S^{2-}$ ou $Se^{2-}$ ). Les cations sont représentés en gris pour les structures wurtzite et sphalérite et en rose ( $In^{3+}$ ) et bleu ( $Cu^{+}$ ) dans le cas de la chalcopyrite. . . . . | 34 |
| II.2  | Diffractionogrammes mesurés et calculés pour des nanoparticules de $CuInSe_2$ : (a) pour une phase chalcopyrite ; (b) pour une phase chalcopyrite contenant des lacunes ordonnées ; (c) pour une structure sphalérite. Image tirée de la REF. [117]. . . . .                               | 35 |
| II.3  | Spectres d'émission de fluorescence pour différents lots de quantum dots cœur/coques $CuInS_2/ZnS$ et quelques échantillons correspondants. Image tirée de la REF. [157]. . . . .  | 36 |
| II.4  | Évolution du spectre d'émission au cours de la synthèse de cœurs Zn-Cu-In-S . . . . .  | 38 |
| II.5  | Diffractionogramme de cœurs Zn-Cu-In-S. En rouge, le diffractionogramme de référence pour $CuInS_2$ en structure chalcopyrite (JCPDS 01-075-0106). . . . .   | 39 |
| II.6  | Évolution du spectre d'émission au cours de la synthèse de cœurs Zn-Cu-In-Se . . . . .   | 40 |
| II.7  | Diffractionogramme de cœurs Zn-Cu-In-Se. En rouge, le diffractionogramme de référence pour $CuInSe_2$ en structure chalcopyrite (JCPDS 00-036-1311). . . . .   | 41 |
| II.8  | Schéma des différents alignements de bandes existants. . . . .   | 42 |
| II.9  | Alignement de bandes des matériaux massifs ZnS, $CuInS_2$ , $CuInSe_2$ et $CuIn_5Se_8$ en structure sphalérite[185] . . . . .  | 43 |
| II.10 | Spectre d'absorbance normalisée pour des cœurs et différents précurseurs de zinc . . . . .   | 47 |
| II.11 | Comparaison des spectres d'émission (traits continus), d'absorbance (triangle) et PLE (carré) pour les cœurs (noir) et les cœur/coques . . . . .   | 49 |
| II.12 | Comparaison des diffractionogrammes pour des cœurs Zn-Cu-In-S (noir) et des cœur/coques Zn-Cu-In-S/ZnS (rouge). Diffractionogramme de référence pour ZnS en structure cubique (JCPDS 03-065-5476, en vert). . . . .  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| II.13 Images de MET de particules Zn-Cu-In-S/ZnS. Les images à faible grandissement (a) permettent d'évaluer la distribution en taille sur un grand nombre de particules (b) : $8 \pm 3$ nm. Les images à fort grandissement (c) permettent de voir les différents plans atomiques dans les nanoparticules et une transformée de Fourier rapide (FFT) permet d'obtenir la figure de diffraction (d) de la particule encadrée en rouge. . . . . | 50 |
| III.1 Schéma de séparation des niveaux d'énergie pour le cas des ions $Mn^{2+}$ . Pour des raisons de simplification du schéma, nous ne présentons qu'un groupe de couplage hyperfin. . . . .  | 57 |
| III.2 Spectre RPE obtenus pour différents taux de manganèse dans la solution d'injection . . . . .   | 57 |
| III.3 Diffractogrammes obtenus pour des échantillons avec différents taux de manganèse dans la coque. Comme référence nous avons ajouté les structure zinc blende ZnS, en noir (JCPDS 03-065-5476) et MnS, en rouge (JCPDS 03-065-2884) . . . . .  | 58 |
| III.4 Spectre d'analyse dispersive en énergie pour un échantillon Zn-Cu-In-S/ $Zn_{0,8}Mn_{0,2}S$ . . . . .  | 60 |
| III.5 Comparaison des taux effectifs de manganèse obtenus par les différentes techniques utilisées. La ligne rouge correspond à un taux effectif égal au taux nominal. Carré, EDX ; triangle, ICP ; étoile, DRX . . . . .  | 61 |
| III.6 Spectres d'émission de fluorescence pour différents taux de manganèse injecté . . . . .  | 62 |
| III.7 Propriétés magnétiques des quantum dots Zn-Cu-In-S/ $Zn_{1-x}Mn_xS$ : (a) courbes d'aimantation pour des échantillons avec différents taux de manganèse dans la coque ; (b) susceptibilité magnétique en fonction du taux de manganèse dans la coque. . . . .  | 63 |
| IV.1 Stratégies pour la solubilisation de nanoparticules dans l'eau. En haut, l'échange de ligands : on remplace les ligands hydrophobes (en noir) par des ligands hydrophiles (en vert). En bas, l'encapsulation par un polymère amphiphile. La partie hydrophobe du polymère (en orange) va interagir avec les ligands de la particule alors que la partie hydrophile (en bleu) assure la solubilité. . . . .                                | 66 |
| IV.2 Exemples de ligands utilisés pour l'encapsulation de quantum dots . . . . .   | 68 |
| IV.3 Exemples de ligands mono- et bidentates utilisés pour l'échange de ligands . . . . .  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| IV.4 Spectre infrarouge d'un échantillon avant échange de ligands (noir) et comparaison avec l'oléate de zinc (rouge), l'éthylxanthate de zinc (bleu) et le dodécane-thiol (rose) . . . . .   | 71 |
| IV.5 Mesure du rayon hydrodynamique de quantum dots ZnCuInSe/Zn <sub>0,86</sub> Mn <sub>0,14</sub> S  | 73 |
| IV.6 Mesure du potentiel zéta de quantum dots ZnCuInSe/Zn <sub>0,86</sub> Mn <sub>0,14</sub> S . . .  | 74 |
| IV.7 Spectre d'absorbance (tirets) et d'émission (trait plein) de quantum dots ZnCuInS/Zn <sub>0,8</sub> Mn <sub>0,2</sub> S avant (noir) et après (rouge) échange avec le DHLA-PEG. . . . .  | 75 |
| IV.8 Émission normalisée par l'absorbance à chaque étape du traitement de nos nanoparticules . . . . .  | 75 |
| IV.9 Schéma de principe d'une mesure du temps de relaxation longitudinale par une séquence d'inversion récupération . . . . .   | 76 |
| IV.10 Mesure de relaxivité pour un échantillon. (a) Tracé de $\ln(1/2(1-M_z(T_r)/M_0))$ en fonction de $T_r$ ; (b) Taux de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en quantum dots et en manganèse. . . . .  | 78 |
| IV.11 Relaxivité (mesurée à 7 T et 300 K) pour des échantillons de Zn-Cu-In-S/Zn <sub>1-x</sub> Mn <sub>x</sub> S avec différents taux de manganèse en fonction de la concentration en QDs (■) ou en manganèse (△) et un échantillon Zn-Cu-In-Se/Zn <sub>0,86</sub> Mn <sub>0,14</sub> S (◆ et ▼). À titre de comparaison, nous indiquons un complexe commercial de gadolinium (◄). . . . . | 79 |
| IV.12 Dosage colorimétrique des ions Mn <sup>2+</sup> par la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine : (a) Spectre d'absorbance d'une solution contenant des ions Mn <sup>2+</sup> après ajout de TMB; (b) Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en ions Mn <sup>2+</sup> . . . . .  | 81 |
| IV.13 Mesure du taux de cellules viables après exposition pendant 24 heures à des quantum dots ZnCuInSe/ZnS (bleu) et ZnCuInSe/Zn <sub>0,86</sub> Mn <sub>0,14</sub> S (rouge)  | 83 |
| IV.14 Images IRM pondérées en T <sub>1</sub> de tubes contenant des solutions de quantum dots de concentration variable. . . . .  | 84 |
| IV.15 Images de souris injectée avec des QDs ZnCuInSe/Zn <sub>0,86</sub> Mn <sub>0,14</sub> S par résonance magnétique pondérées en T <sub>1</sub> et en fluorescence proche infra-rouge. (a) IRM avant injection; (b) IRM 20 minutes après injection. . . . .  | 85 |
| IV.16 Images de fluorescence dans le proche infrarouge obtenues 30 minutes après l'injection. L'insert présente une image de la région d'intérêt en ayant masqué le point d'injection. . . . .  | 86 |
| IV.17 Schéma des autres types de nanoparticules envisagées pour l'obtention de sondes fluorescentes et magnétiques. . . . .   | 91 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| A.1  | Photographies d'échantillons prélevés au cours de la synthèse d'échantillons avec (b) et sans (a) illumination dans l'UV. Spectres d'émission de prélèvements effectués au cours d'une synthèse de cœur ZnCuInS. . . . .  | 96  |
| A.2  | Spectres d'émission de prélèvements effectués au cours d'une synthèse de cœur ZnCuInSe . . . . .  | 97  |
| A.3  | Schéma de principe de la séparation par ultracentrifugation . . . . .   | 103 |
| B.1  | Schéma de la réaction entre la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et le manganèse (IV). . . . .   | 107 |
| B.2  | Dosage colorimétrique des ions $Mn^{2+}$ par la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine : (a) Spectres d'absorbance de solutions contenant des ions $Mn^{2+}$ après ajout de TMB ; (b) Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en ions $Mn^{2+}$ . . . . . | 108 |
| B.3  | Schéma du principe de fonctionnement d'un fluorimètre. . . . .  | 109 |
| B.4  | Comparaison des spectres d'excitation des cœurs ( $\circ$ ), cœurs/coques ( $\blacktriangle$ ) et spectres d'absorbance ( $\blacksquare$ ). . . . .   | 111 |
| B.5  | Intensité de fluorescence en fonction du temps. En rouge, ajustement par une triexponentielle décroissante. . . . .   | 112 |
| B.6  | Spectres d'excitation et d'absorbance de la phtalocyanine de zinc (a) et du vert d'indocyanine (b). . . . .   | 113 |
| B.7  | Principe de l'analyse dispersive en énergie. . . . .  | 115 |
| B.8  | Exemple de spectre obtenu en EDX avec un échantillon Zn-Cu-In-S/ $Zn_0,8Mn_0,2S$ . 115  |     |
| B.9  | Schéma de principe d'une mesure du temps de relaxation longitudinale par une séquence d'inversion récupération . . . . .  | 117 |
| B.10 | Mesure de relaxivité pour un échantillon. (a) Tracé de $\ln(1/2(1-M_z(T_r)/M_0))$ en fonction de $T_r$ ; (b) Taux de relaxation longitudinale en fonction de la concentration en quantum dots et en manganèse. . . . .  | 118 |
| B.11 | Exemple typique de spectre obtenu par RPE. . . . .  | 120 |

# Liste des tableaux

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| I.1   | Récapitulatif des caractéristiques des différentes modalités d'imagerie.[22–24] . . . . . | 8   |
| III.1 | Tableau récapitulatif des synthèses proposées pour $\text{Mn}(\text{OA})_2$ . . . . .     | 54  |
| III.2 | Taux de dopage effectif de manganèse déterminé grâce à la DRX. . . . .                    | 59  |
| IV.1  | Tableau récapitulatif des traitements de surface essayé . . . . .                         | 72  |
| A.1   | Tableau récapitulatif de la composition de la solution d'injection de cations             | 98  |
| A.2   | Précurseurs utilisés . . . . .  | 100 |

# Résumé

La chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence est une technique prometteuse mais limitée par la faible profondeur de pénétration (inférieure au millimètre dans le visible) à cause de l'absorption et de la diffusion par les tissus. Elle est plus élevée dans la gamme du proche infrarouge (700-1000 nm) mais reste limitée à quelques centimètres. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'obtenir des images sur corps entier mais ne peut être utilisée pour le suivi peropératoire. Le développement de sondes bimodales, fluorescentes et magnétiques, permet de coupler les avantages des deux techniques.

Nous avons choisi de développer des sondes basées sur des nanocristaux fluorescents de  $\text{CuIn}(\text{S},\text{Se})_2$  car ils présentent une longueur d'onde d'émission modulable sur toute la gamme du proche infrarouge ainsi que des rendements quantiques, sections efficace d'absorption et photostabilités élevés. La croissance d'une coque épaisse de ZnS permet d'augmenter le rendement quantique qui peut atteindre 60 % dans les solvants organiques.

L'incorporation d'ions  $\text{Mn}^{2+}$  dans la coque de nos objets permet de leur conférer un caractère paramagnétique. Les propriétés optiques et structurales ont été étudiées par spectroscopie (fluorescence et absorbance), RPE, DRX, MET/METHR et analyse élémentaire. Nos sondes sont transférées en milieu aqueux par un échange de ligands qui ne modifie pas leurs propriétés. Des mesures de relaxivités longitudinales ont permis de confirmer leur potentiel comme agent de contraste pour l'IRM pondérée en  $T_1$  et nous avons apporté une preuve de principe de l'utilisation de nos sondes *in vivo* en marquant des ganglions lymphatiques chez la souris.

**Mots clés :** imagerie de fluorescence proche infrarouge, imagerie par résonance magnétique, quantum dots I-III-VI, dopage au manganèse, agent de contraste.

# Abstract

Fluorescence imaging is a promising technique for image-guided surgery. Because of diffusion and absorption of light by tissues, the low penetration depth (less than a millimeter) in the visible spectral range, which can reach a few centimeters in the near infrared (NIR) spectral range (700-1000 nm), limits its use. To overcome this limitation, fluorescence imaging can be coupled with magnetic resonance imaging (MRI) which provides whole body images but cannot be used for intraoperative monitoring. Thus, the development of bimodal fluorescent and magnetic (for MRI) probes offers the opportunity to combine advantages from both imaging modalities.

In this regard, we chose to use  $\text{CuIn}(\text{S},\text{Se})_2$  fluorescent semiconductor nanocrystals (or quantum dots) as a platform for the development of our probes. They display a size-tunable emission wavelength over the NIR spectral range and high quantum yield, absorption cross section and photostability. The growth of a thick shell of ZnS on these nanoparticles can increase the quantum yield up to 60 % in organic media.

The incorporation of  $\text{Mn}^{2+}$  ions in the shell gives our probes a paramagnetic behavior. The influence of doping level on structural and optical properties is investigated using fluorescence and absorbance spectroscopy, EPR, XRD, TEM/HRTEM and elemental analysis. Our probes are solubilized in water through a ligand exchange and their properties remain stable in water. Longitudinal relaxivity measurements show that these probes can be used as MRI  $T_1$  contrast agents. As a proof-of-principle, we demonstrate that these probes can be used for the detection of lymph nodes *in vivo*.

**Keywords :** near infrared fluorescence imaging, magnetic resonance imaging, I-III-VI quantum dots, Mn-doping, contrast agent.