



HAL
open science

Nanocristaux organiques enrobés d'une coquille silicatée pour la réalisation de traceurs fortement fluorescents pour l'imagerie médicale

Josephine Zimmermann

► **To cite this version:**

Josephine Zimmermann. Nanocristaux organiques enrobés d'une coquille silicatée pour la réalisation de traceurs fortement fluorescents pour l'imagerie médicale. Agrégats Moléculaires et Atomiques [physics.atm-clus]. Université Grenoble Alpes, 2014. Français. NNT : 2014GREN048 . tel-01283733v2

HAL Id: tel-01283733

<https://theses.hal.science/tel-01283733v2>

Submitted on 10 Jul 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie – Physique moléculaire et structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Josephine ZIMMERMANN

Thèse dirigée par **Alain IBANEZ**
codirigée par **Fabien DUBOIS**

préparée au sein du **Département Matière Condensée –
Matériaux et Fonctions (Laboratoire Institut Néel)**
dans **l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Nanocristaux organiques enrobés d'une coquille silicatée pour la réalisation de traceurs fortement fluorescents pour l'imagerie médicale

Thèse soutenue publiquement le **11 décembre 2014**,
devant le jury composé de :

Dr. Jean-Olivier DURAND

DR2 CNRS, Institut Charles Gerhardt Montpellier, Rapporteur

Dr. Benoît PICHON

MCF, Université de Strasbourg IPCMS, Rapporteur

Pr. Stéphane PAROLA

Professeur, Université C. Bernard Lyon, Président du jury

Dr. Boudewijn VAN DER SANDEN

CR1 INSERM Grenoble, Institut des Neurosciences, Examineur



*Willst du glücklich sein im Leben,
trage bei zu andrer Glück;
denn die Freude, die wir geben,
kehrt ins eigene Herz zurück.*

*Si tu veux être heureux dans la vie,
donnes du bonheur aux autres;
car la joie que nous donnons,
retourne dans notre propre cœur.*

Johann Wolfgang von Goethe

REMERCIEMENTS

Au moment d'écrire ces remerciements, je parcours dans ma tête les dernières années. Je m'excuse d'avance pour ceux que je n'aurai pas cités... Je réalise que les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse sont innombrables car une thèse, c'est une grande histoire de relations et de rencontres. Une thèse étant un peu l'adolescence d'un chercheur, toutes ces rencontres m'ont aidé à apprendre, grandir, avancer et répondre aux incertitudes et diverses questions.

Je tiens pour commencer à vous adresser, chers membres du jury, mes sincères remerciements pour votre lecture, votre présence pour ma soutenance et les remarques qui ont enrichi ce travail que j'ai eu plaisir à partager et discuter avec vous.

Je remercie Alain Schul de m'avoir accueillie à l'Institut Néel et Benoit Boulanger de m'avoir intégrée au sein de l'équipe MatONLP.

Merci à mon directeur de thèse, Alain Ibanez de m'avoir suivie et conseillée tout au long de cette thèse. Tu as su allier ton enthousiasme scientifique inébranlable et ton rôle de conseiller et critique pour me former à la recherche. Ta bonne humeur légendaire, ton dynamisme et ta disponibilité, malgré tes nombreuses tâches, ont été appréciables. Un grand merci également à mon co-encadrant Fabien Dubois, que je considère pleinement comme mon second directeur de thèse, pour ton investissement pendant ces trois années. Merci de m'avoir transmis ton expérience pour de nombreuses techniques de laboratoire, d'avoir tremblé avec moi lorsque les particules n'obéissaient pas, et d'avoir corrigé mon manuscrit avec autant d'attention.

Mes remerciements vont également à Xavier Cattoen pour avoir accepté de corriger mon manuscrit et avoir enrichi cette thèse avec ton expertise en chimie, Isabelle Luneau-Gautier, Mathieu Salaun et toute l'équipe MatONLP pour votre accueil et les discussions que nous avons pu avoir.

Merci à Céline Darie et Boudewijn Van der Sanden qui ont constitué mon comité de suivi de thèse. Les discussions scientifiques engagées lors de ces comités annuels m'ont

permis de recadrer les idées pour mieux avancer. Vos réflexions et conseils avisés m'ont été d'une grande aide.

Cette thèse ayant été réalisée dans le cadre de l'ANR blanc "Ultrabright", je tiens à remercier tous les partenaires de notre consortium : Chantal Andraud, Yann Bretonnière, Noelle Lascoux, Batrice Baldeck, et toute l'équipe de l'ENS Lyon ; Bruno Boury pour les nombreux conseils et idées ainsi que l'équipe CMOS de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier pour nous avoir fourni un large panel de précurseurs ; et finalement l'équipe du Grenoble Institut des Neurosciences qui a réalisé l'imagerie *in vivo* : Boudewijn Van der Sanden pour sa patience et tous les conseils qui ont enrichi notre réflexion, ainsi que Florence Appaix, Mathieu Maurin pour une précieuse aide chirurgicale.

La taille de mes billes ayant une importance cruciale pour leur application, j'ai également passé de nombreuses heures au LyPhi pour y réaliser des mesures de diffusion dynamique de la lumière. Merci à Olivier Stephan qui m'a formé à l'utilisation de l'appareil et s'est toujours montré disponible pour s'intéresser à mon travail et me conseiller.

Pour avoir partagé ces trois années de thèse avec moi, je remercie Gwenaëlle Eucat. Même si la Science ne marche pas toujours comme on le veut, je pense que notre collaboration nous a beaucoup appris l'une et l'autre, et nous a aidées à toujours aller de l'avant au laboratoire comme par ailleurs. Grâce à toi, mes petites billes peuvent maintenant porter un maillot de bain rouge ! Je te souhaite beaucoup de succès pour ta carrière future.

Un immense merci va à Marine Liotaud, la fée du laboratoire ! Pour faire fonctionner les salles de chimie, ton aide précieuse au quotidien pour toujours trouver des solutions, tes nombreux conseils pour des questions techniques et administratives, et j'en passe... De même, Christophe Bouchard m'a été d'une grande aide ces dernières années pour soigner le réacteur. Je te remercie de ta patience et ta grande disponibilité pour m'avoir aidé à réparer tous les bobos de la bête ! Pour leur aide technique et leurs conseils avisés, je tiens également à remercier Philippe Plaindoux (pas seulement pour les conseils culinaires), Muriel Legendre, Alain Prat, Emmanuel Verloop, Rémi Bruyère,... Je pense sincèrement que le département a beaucoup de chance de travailler avec vous tous.

Pour m'avoir formée au microscope électronique à transmission, je remercie Stéphanie Kodjikian. Durant toutes ces heures dans le noir où nous avons vu que très rarement des points de diffraction apparaître, tu t'es montrée très patiente et tu as su m'encourager. Merci aussi à Edgar Rauch qui nous a finalement aidées à comprendre un peu mieux pourquoi notre échantillon tardait à diffracter.

Je remercie également Olivier Leynaud pour m'avoir aidée à réaliser les manips de diffraction et avoir grâce à ton inventivité trouvé des moyens de s'adapter aux divers échantillons, Sébastien Pairis pour m'avoir formée au microscope à balayage, et David Jegouso pour m'avoir permise de caractériser mes poudres.

Comment fonctionnerait un laboratoire sans toutes ces personnes qui nous aident pour nous faciliter le quotidien ? Muriel Boyer qui contribue grandement au bon fonctionnement du département pour toutes questions administratives. Les plantes, les buveurs de café, et certainement beaucoup d'autres le confirmeront ! Stéphanie Fort et Laurent Joubert qui m'ont certainement sauvée plus d'une fois avec un ordinateur. Agnès Agarla, Louise Infuso et toute l'équipe de gestion qui est d'une aide précieuse. Bien sûr, je pense aussi à l'équipe du magasin qui nous fournit toujours si bien, et les garçons du liquéfacteur qui m'ont rempli beaucoup de litres d'azote pendant ces trois années. Cécile Nemiche de la reprographie pour tes précieux conseils concernant la mise en forme de posters, manuscrits,... Merci aussi à Quentin Richard, Lilian De-Coster, Nathalie Bourgeat-Lami, Stéphanie Monfront qui soutiennent de nombreux projets avec enthousiasme.

Que serait une semaine dans notre département de recherche sans vous : Holger Klein, Stéphane Grenier, Pauline Martinetto, Marie-Claire Saint-Lager, Claire Colin, Jean-Louis Hodeau, Cécile Berne, Eglantine Boulard, Bertrand Ménaert, Sabine Douillet, Alexandra Pena, Christophe Lepoittevin, Céline Goujon, Stéphanie Garaudée, Jéraume Debray... et tous ceux avec qui j'ai pu mener des discussions intéressantes à la cafétéria ou dans les couloirs. Un grand merci à l'ensemble des membres de MCMF qui m'ont permis de réaliser ce travail dans une atmosphère agréable.

Qu'auraient été trois années de thèse sans ceux qui ont partagé mon quotidien : les autres thésards ? Ceux de ma génération avec qui j'ai partagé une course frénétique ces

derniers mois. Anne, Adrien et Mehdi, heureusement que Louis de Funès était là pour nous rappeler ceci : "Écoute, on t'connait pas, mais laisse nous t'dire que tu t'prépare des nuits blanches... des migraines... des *nervous breakdown*, comme on dit de nos jours." Bon courage à Sonia, Agnès, Lei, et William qui seront les prochains. Il ne faut pas oublier les grands qui nous ont transmis leurs savoirs, expériences et leur combativité : Vincent, Marta, Emmanuelle, Sophie, Patricia, Cyprien... bonne route (pour la recherche, la maternité,...) à chacun et chacune de vous ! Enfin, je remercie aussi la relève qui m'a impressionnée par sa grande motivation pour continuer à mettre en place nos projets communs... continuez comme ça : Pauline, Xueming, Elodie, Justin, Khalil, Céline, Alexis, Emilie, Logi, Ketty, Cornelia, Ovidiu... Maintenant que vous avez des parrains, j'attends de voir le nouveau site web ;-)
Bonne continuation pour les séminaires, CSTD et autres !

Comment parler d'une thèse, sans parler de tous ceux qui ont contribué à ma formation... qui a en fait commencé très tôt car, enfant, j'apprenais déjà la vie de labo avec une chercheuse passionnée : ma mère. Ensuite, je pense à tous les responsables de mes formations que ce soit en ingénierie mécanique, ingénierie médicale, ou nanobiotechnologie qui ont travaillé pour accueillir leurs étudiants dans les meilleures conditions. Les professeurs de toutes ces disciplines m'ont transmis leurs savoirs et n'ont cessé d'alimenter ma curiosité. Cette curiosité a également été alimentée par mes stages de découverte dans divers laboratoires aux côtés de chercheurs passionnés par leur métier. Que ce soit pour mesurer la luminosité des étoiles, analyser les contraintes mécaniques sur les cellules de l'arbre, ou comprendre mieux les maladies liées à la sérotonine, j'ai appris un peu plus avec chacun d'entre vous.

J'en arrive à une partie de mon parcours plus récente qui m'a permis de m'investir dans la communication scientifique à travers les labels instaurés depuis quelques années à l'Université de Grenoble. Un grand merci à Marion Sabourdy et Aleksandra Bogdanovic-Guillon qui m'ont permis de découvrir leur monde du journalisme scientifique et de la vulgarisation en tout genre. Grâce à vous, je suis tweetangélisée et plus que jamais motivée pour continuer à partager les sciences! Merci aussi à toute l'équipe de la Casemate pour m'avoir accueillie et pour votre investissement dans le partage des sciences et de l'art.

Je tiens à remercier Philippe Chinkirch ainsi que tout le réseau Valoridoc pour leur investissement dans la valorisation du doctorat et leur aide précieuse auprès des jeunes docteurs pour leur apprendre à mieux se connaître et suivre ses envies. La connaissance de soi-même et du monde qui nous entoure peut aider grandement chacun à trouver sa voie.

Il y a aussi tous ces autres thésards que j'ai rencontrés lors des diverses formations et qui ont chacun des sujets de thèse passionnants : Yann (qui essaye de comprendre notre planète), Flora, Sébastien (et ses bactéries), Mouna (quid de l'urbanisme), Anne (qui tente de comprendre notre morphologie), Rémi, Fabien, Samir (avec ses épices magiques)...

Merci à Els, voisine et amie, qui me motive à porter jusqu'au bout mes projets littéraires. J'espère que nous pourrons très prochainement publier ensemble nos traductions de mon premier recueil en allemand et néerlandais. J'ai été ravie de découvrir Amsterdam avec une guide native.

Une thèse, c'est aussi des amis qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours. Eva ma chère amie et rêveuse éternelle, Marielle ma grande qui m'impressionnera toujours par ton dynamisme, Noisette avec ta positive attitude, Laura et Wassim (et les dauphins !), Coco ma petite prof modèle, Gaëtan mon ami de longue date,...

A Grenoble, je pense à la nanobio-girls-team, eh oui on se serre les coudes ! Melina qui a réponse à tout et est une alliée sans faille, Selma qui épice la vie de son sourire, Lauréline notre petite courageuse, Clarisse qui se débrouille toujours pour gérer les embrouilles, Samia, Ferial, ... Petite question piège : y a-t-il des singes à la Bastille ?

Merci à Marion pour avoir accepté d'être ma coéquipière pour refaire le monde et avoir su comprendre la littéraire en moi, et cela malgré Legoland ! François, tes conseils (plus ou moins) réalistes m'ont toujours poussé à réfléchir et m'aident à avancer, et non seulement sur une piste de danse ;-)

Ah, et merci les west-coasters qui m'ont permis de me détendre de temps en temps en dansant : nos profs de grand niveau Lionel et Amandine, ainsi que Aurélia, Adrien, Eric, Phil, Natahalie, ... notre flash mob internationale restera un souvenir mémorable !

Je n'en serai certainement pas arrivée là sans celle qui m'a fait découvrir les sciences dès le plus jeune âge, ma maman Sabine. Merci de m'avoir transmis ta passion des sciences, soutenue tout au long de mon parcours, et de m'avoir corrigée, conseillée, encouragée. Vergiss nicht : "*the best is yet to come*"... Merci à Rainer de partager sa vie avec notre douce équipe de choc, et d'essayer sans cesse de comprendre le fonctionnement bizarre de la biologie et toutes autres sciences ! Une pensée va aussi à ma sœur Anne, mon frère Christian, ma grand-mère Christine. Une dédicace particulière va à ma chère grand-mère Gisela et un hommage à mon grand-père Joachim, notre grand passionné de sciences et techniques qui vient de nous quitter mais me laisse sa volonté et sa passion en héritage. Même si je devrais traduire cette thèse pour que vous puissiez la lire... chaque chose en son temps !

Enfin, je remercie Sylvestre de m'avoir supportée jour pour jour ces dernières années et plus particulièrement ces derniers mois. Papier peint et manuscrit, bon ménage ? Je dirais comme la NASA : "*failure is not an option*", on a bien prouvé que tout est faisable quand on veut ! Mais qu'aurions nous fait sans nos amis les fruits qui sont si bons pour les grands et les petits ?

Sommaire

INDEX DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I) CHAPITRE INTRODUCTIF	9
1. CONTEXTE DE L'ETUDE.....	11
1.1. <i>Contexte de l'imagerie intravitale.....</i>	<i>11</i>
1.2. <i>Imagerie des vaisseaux sanguins</i>	<i>12</i>
1.3. <i>Intérêt de la fluorescence à deux photons</i>	<i>13</i>
1.4. <i>Vivant et angiogénèse.....</i>	<i>16</i>
1.4.1. <i>Composition du sang</i>	<i>16</i>
1.4.2. <i>Mécanismes de l'angiogénèse</i>	<i>17</i>
1.4.3. <i>Comment piéger le système immunitaire ?.....</i>	<i>18</i>
1.4.4. <i>Ciblage tumoral</i>	<i>19</i>
1.5. <i>Différents types de traceurs particuliers fluorescents</i>	<i>21</i>
1.5.1. <i>Les quantum dots</i>	<i>23</i>
1.5.2. <i>Les polymères avec fluorophores greffés</i>	<i>25</i>
1.5.3. <i>Les nanoparticules hybrides fluorescentes.....</i>	<i>26</i>
1.5.3.1. <i>Les nanoparticules organiques</i>	<i>27</i>
1.5.3.2. <i>Les nanoparticules de silice</i>	<i>27</i>
1.5.3.2.1. <i>Biodistribution des nanoparticules de silice.....</i>	<i>28</i>
1.5.3.2.2. <i>Avantages et inconvénients des nanoparticules de silice.....</i>	<i>29</i>
1.5.3.2.3. <i>Effets d'agrégation.....</i>	<i>30</i>
1.5.3.2.4. <i>Les nanoparticules à cœur cristallin.....</i>	<i>31</i>
2. ELABORATION DES NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE HYBRIDES.....	32
2.1. <i>Précurseurs sol-gel et hydrolyse.....</i>	<i>32</i>
2.2. <i>Nucléation et croissance cristalline.....</i>	<i>33</i>
2.3. <i>Le réacteur utilisé pour le procédé de spray-drying.....</i>	<i>34</i>
2.4. <i>Stratégies de fonctionnalisation</i>	<i>37</i>
2.5. <i>Conclusion et enjeux sur l'élaboration des nanoparticules.....</i>	<i>40</i>
CHAPITRE II) ELABORATION ET CARACTERISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES CŒUR-COQUILLE	41
1. PARAMETRES CHIMIQUES POUR LA SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES ORGANOSILICATEES.....	43
1.1. <i>Nature des alcoxydes</i>	<i>43</i>
1.2. <i>Les paramètres chimiques à adapter.....</i>	<i>44</i>
2. PARAMETRES PHYSIQUES DU PROCÉDE DE SPRAY-DRYING POUR L'OBTENTION DE NANOPARTICULES ORGANOSILICATEES	46
2.1. <i>Impact de la pression d'azote sur la nébulisation.....</i>	<i>46</i>
2.2. <i>Températures du four et du filtre électrostatique</i>	<i>46</i>

2.3.	<i>Débit du gaz vecteur</i>	47
2.4.	<i>Obtention de nanoparticules sphériques</i>	48
2.5.	<i>Rendement de synthèse des nanoparticules</i>	49
2.6.	<i>Taille des nanoparticules en fonction de la matrice et du taux de solvant</i>	49
3.	FLUOROPHORE ORGANIQUE UTILISE POUR L'ELABORATION DE CŒUR-COQUILLES	50
3.1.	<i>Fluorophore de référence, le CMONS</i>	50
3.1.1.	<i>Synthèse du CMONS</i>	51
3.1.2.	<i>Rappel sur le polymorphisme du CMONS</i>	52
4.	SYNTHESE DE NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE HYBRIDES AVEC LE CMONS	53
4.1.	<i>Solubilité du CMONS</i>	53
4.2.	<i>Rappel des paramètres de synthèse des NPs cœur-coquille</i>	53
4.3.	<i>Taille des nanoparticules cœur-coquille en fonction de la matrice</i>	55
4.4.	<i>Dispersion colloïdale des nanoparticules</i>	55
4.5.	<i>Caractérisation des nanoparticules cœur-coquille</i>	56
4.5.1.	<i>Rayon hydrodynamique des nanoparticules cœur-coquille</i>	56
4.5.2.	<i>Charge de surface des NPs cœur-coquille</i>	57
4.6.	<i>Caractérisation du cœur organique</i>	57
4.6.1.	<i>Mise en évidence du cœur organique</i>	57
4.6.2.	<i>Polymorphisme du CMONS nanocristallisé en coquilles silicatées</i>	58
4.6.2.1.	<i>Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules cœur-coquille</i>	58
4.6.2.2.	<i>Diffraction et caractérisation structurale</i>	59
4.6.2.3.	<i>Influence de la température sur la nanocristallisation</i>	62
4.6.2.4.	<i>Détermination de l'influence de la température par microscopie électronique à transmission</i>	62
4.6.2.5.	<i>Caractérisation par diffraction rayons X</i>	64
4.7.	<i>Conclusion sur les nanoparticules cœur-coquille hybrides avec le CMONS</i>	65
5.	SYNTHESE DE NANOPARTICULES CONTENANT DES FLUOROPHORES EMETTANT DANS LE ROUGE – PROCHE INFRAROUGE	66
5.1.	<i>INGENIERIE DE NOUVEAUX FLUOROPHORES</i>	66
5.2.	<i>OPTIMISATION DES PARAMETRES DE SYNTHESE AVEC LES NOUVEAUX FLUOROPHORES</i>	68
5.3.	<i>SPECTROSCOPIE DES NANOPARTICULES AVEC LES NOUVEAUX FLUOROPHORES SELECTIONNES</i>	71
5.4.	<i>TAILLE DES NANOPARTICULES AVEC LES FLUOROPHORES EMETTANT DANS LE ROUGE – PROCHE INFRAROUGE</i>	72
6.	CONCLUSION SUR LA SYNTHESE DE NANOPARTICULES	73
CHAPITRE III) POROSITE ET FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES		75
1.	DISPERSION EN MILIEU AQUEUX ET STABILITE COLLOÏDALE DES NANOPARTICULES	77
1.1.	<i>Dispersion des nanoparticules en solution</i>	77
1.2.	<i>Diamètre hydrodynamique des nanoparticules dispersées en suspension colloïdale</i>	78
1.3.	<i>Charges de surface des nanoparticules dispersées en suspension colloïdale</i>	78

1.4. Influence du taux de solvant et du pH sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules.....	79
2. POROSITE DES NANOPARTICULES.....	80
2.1. POROSITE DES NANOPARTICULES "BLANCHES"	80
2.2. POROSITE DES NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE.....	82
3. OBTENTION DE NANOPARTICULES FONCTIONNELLES	86
3.1. Fonctionnalisation post-synthèse	87
3.1.1. Pégylation avec des sous-unités de PEG courtes (PEG400-Si).....	87
3.1.2. Fonctionnalisation avec des sous-unités de PEG longues (PEG2000-Si)	89
3.1.3. Greffage de chitosane	90
3.1.4. Conclusion sur la post-fonctionnalisation	92
3.2. Fonctionnalisation directe par co-condensation dans la matrice de départ	93
3.2.1. Insertion de précurseurs bis-silylés.....	94
3.2.2. Insertion de précurseurs mono-silylés.....	95
3.2.2.1. Insertion du PEG500-Si dans la matrice.....	95
3.2.2.2. Intégration d'un mélange de THPMP et d'APTES.....	97
3.2.2.3. Insertion de précurseurs clickables.....	99
3.2.3. Conclusion sur la co-condensation	101
CHAPITRE IV) IMAGERIE DE LA MICROVASCULARISATION CEREBRALE CHEZ LE PETIT ANIMAL.....	103
1. COMPATIBILITE DES NANOPARTICULES AVEC LE MILIEU BIOLOGIQUE	105
1.1. Stabilité colloïdale des nanoparticules dans le sel.....	105
1.2. Influence de la température sur la stabilité colloïdale.....	105
1.3. Modification de la stabilité colloïdale des nanoparticules cœur-coquille après fonctionnalisation	106
2. IMAGERIE IN VIVO : TESTS D'IMAGERIE DE LA MICRO VASCULARISATION CEREBRALE.....	108
2.1. Préparation et concentration des nanoparticules	108
2.2. Méthode d'observation.....	109
2.3. Préparation des animaux.....	109
2.4. Acquisition et traitement des images	110
2.5. Résultats d'imagerie cérébrale	111
2.5.1. Premiers tests in vivo après post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes avec des sous-unités PEG courtes (PEG400-Si).....	111
2.5.2. Deuxième série d'imagerie in vivo avec différentes stratégies de fonctionnalisation	112
2.5.2.1. Tests avec greffage de sous-unités PEG longues.....	113
2.5.2.2. Tests avec le chitosane	114
2.5.2.3. Conclusions sur la deuxième série de tests in vivo.....	115
2.5.3. Cinétique de circulation des nanoparticules dans le flux sanguin.....	116

3. CONCLUSION SUR L'IMAGERIE DE LA MICROVASCULARISATION AVEC LES NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE	119
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	123
BIBLIOGRAPHIE.....	129
ANNEXES	I
ANNEXE A : DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	III
ANNEXE B : POTENTIEL ELECTRIQUE DE SURFACE.....	IV
ANNEXE C : MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	V
ANNEXE D : MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE DIFFRACTION	VII
ANNEXE E : MESURES DE POROSIMETRIE	VIII
ANNEXE F: LES PRECURSEURS	IX
ANNEXE G : DIFFRACTION PAR RAYONS X	XIII
ANNEXE H : COMPOSITION DES LOTS DE NANOPARTICULES INJECTES	XVII
ANNEXE I : MICROSCOPE CONFOCAL A DEUX PHOTONS ZEISS LSM7 MP	XX
ANNEXE J : SPECTRE RMN DU CMONS	XXI
ANNEXE K : SPECTROMETRES	XXII
ANNEXE L : EVOLUTION DU REACTEUR	XXIII
ANNEXE M : CALCUL DU NOMBRE DE PARTICULES	XXIV

Tables des figures

FIGURE 1: IMAGERIE NON INVASIVE DU CERVEAU PAR ABSORPTION DE RAYONS X.	12
FIGURE 2: SCHEMA DE LA TECHNIQUE DE SELDINGER (SELDINGER 1953): (A) GRACE A L'AIGUILLE DE PONCTION, (B) LE FIL DE SELDINGER EST INTRODUIT. (C) APRES AVOIR ENLEVE L'AIGUILLE, (D) LE FIL SERT DE GUIDE POUR INTRODUIRE (D) PAR EXEMPLE UN CATHETER AVANT (E) D'ETRE RETIRE. L'AGENT DE CONTRASTE PEUT ENSUITE ETRE INJECTE.	12
FIGURE 3: EMISSION DE FLUORESCENCE DANS UN TISSU. (A) NIVEAU D'ENERGIE POUR LA FLUORESCENCE A UN ET DEUX PHOTONS. (B) L'EMISSION PAR FLUORESCENCE A UN PHOTON EST DIFFUSEE DANS L'EPAISSEUR DU TISSU ENTIER. (C) L'EMISSION PAR FLUORESCENCE A DEUX PHOTONS EST PLUS LOCALISEE.....	15
FIGURE 4: FENETRE DE TRANSPARENCE OPTIQUE DES TISSUS BIOLOGIQUES. COEFFICIENT D'ABSORPTION MOLAIRES DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES TISSUS BIOLOGIQUES : SANG, EPIDERME, EAU. LA PLUPART DES CELLULES ANIMALES SONT CONSIDEREES COMME TRANSPARENTES DANS LA FENETRE SPECTRALE DE 600 NM A 1100 NM (VO-DINH 2003).	16
FIGURE 5: SCHEMA DU PROCESSUS D'OPSONISATION: UN ANTICORPS (OPSONINE) SE LIE AU CORPS ETRANGER POUR FACILITER L'INGESTION ET LA DESTRUCTION PAR LES PHAGOCYTES (BIOLOGY, <i>WEBPAGE</i> 2014).	19
FIGURE 6: DIFFERENTS MODES DE CIBLAGE. (A) CIBLAGE PASSIF DE NANOOBJETS. (1) LES NANOBJETS ATTEignent LES TUMEURS SELECTIVEMENT A TRAVERS LES DEFILANCES DES PAROIS DES VAISSEUX SANGUINS. (2) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INFLUENCE DE LA TAILLE DES OBJETS POUR LA RETENTION DANS LES TISSUS TUMORAUX. DE PETITES MOLECULES DIFFUSENT LIBREMENT A CAUSE DE LEUR PETITE TAILLE ET AINSI LEUR CONCENTRATION EFFECTIVE DANS LA TUMEUR DECROIT RAPIDEMENT. LES NANOBJETS, PLUS GRANDS, NE REVIENNENT PAS VERS LE FLUX SANGUIN, CE QUI RESULTE EN UNE ACCUMULATION PROGRESSIVE: L'EFFET EPR. (B) STRATEGIES DE CIBLAGE ACTIF. LES LIGANDS GREFFES A LA SURFACE DES NANOBJETS SE FIXENT AUX RECEPTEURS SUREXPRIMES PAR LES CELLULES CANCEREUSES (LOUVAIN DRUG RESEARCH INSTITUTE, <i>PAGE WEB</i> 2013). ..	20
FIGURE 7: SPECTRES CARACTERISTIQUES D'ABSORPTION ET EMISSION DE QDS (BALASUBRAMANIAN 2007).	24
FIGURE 8: REPRESENTATION (A) MACROSCOPIQUE DU SYSTEME ET (B) SCHEMA DE LA MOLECULE FITC-DEXTRAN.	25
FIGURE 9: TRAVAUX AVEC LE LEM-PHEA (MASSIN ET AL. 2013). A) REPRESENTATION DE LA SONDE LEM-PHEA AVEC LE POLYMERE (CERCLE) ET LE FLUOROPHORE ; B) IMAGERIE 3D DE LA MICROVASCULARISATION OBTENUE AVEC LEM-PHEA.....	26
FIGURE 10: SCHEMA DES LIPIDOTS DEVELOPPES AU CEA (MERIAN 2012).	27
FIGURE 11: REPRESENTATION D'UNE NANOPARTICULE CŒUR ORGANIQUE CRISTALLIN - COQUILLE SILICATEE.	32
FIGURE 12: REACTEUR DE SYNTHESE DE NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE HYBRIDES : LES PARTIES DU REACTEUR. (1) FLACON CONTENANT LE SOL INITIAL A NEBULISER, (2) INJECTION D'AZOTE DANS L'ATOMISEUR PNEUMATIQUE DE TSI, MODELE 3076, (3) INJECTION ANNULAIRE DU GAZ VECTEUR, (4) FOUR TUBULAIRE DE 160 CM DE LONGUEUR CHAUFFE A 150°C, (5) FILTRE ELECTROSTATIQUE (10 KV) CHAUFFE A 120 OU 140°C, (6) SORTIE DU GAZ VECTEUR ET DES VAPEURS. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SECHAGE CONTROLE DE GOUTTELETTES SOL-GEL MICROMETRIQUES (7), FORMATION D'UNE CROUTE ORGANOSILICATEE A LA SURFACE DES GOUTTES (8), NUCLEATION CONFINEE ET CROISSANCE DES NCS AU CŒUR DES GOUTTES (9) ET NPS CŒUR-COQUILLE RESULTANTES (10).....	36
FIGURE 13: CROISSANCE DU PEI A LA SURFACE DES NANOPARTICULES DE SILICE.	38
FIGURE 14: SCHEMA DE GREFFAGE PAR CONDENSATION D'ALCOXYDES DE SILICIUM FONCTIONNELS A LA SURFACE DES NANOPARTICULES.	38
FIGURE 15: INTERACTION ENTRE NANOPARTICULE (A) SANS FONCTIONNALISATION ET (B) AVEC AJOUT DE PHOSPHONATE.....	39
FIGURE 16: ALCOXYDES DE SILICIUM UTILISES POUR LA SYNTHESE DE NANOPARTICULES. (A) TMOS ; (B) TMSE ; (C) C ₃ O ₄	43
FIGURE 17: PROFIL DE TEMPERATURE DU FOUR TUBULAIRE. L'ORDONNEE A L'ORIGINE REPRESENT LA SORTIE DU FOUR.	47
FIGURE 18: OBSERVATION PAR MEB DES NANOPARTICULES AVEC IMPACTS VISIBLES ET INCRUSTATION DES PLUS PETITES NPS DANS CELLES DE PLUS GRANDE TAILLE DONT LE SECHAGE N'A PAS ETE TOTAL LORS DE LEUR COLLECTION DANS LE FILTRE ELECTROSTATIQUE.	48
FIGURE 19: OBSERVATION PAR MEB DES NANOPARTICULES "BLANCHES" SPHERIQUES ET SEPARÉES. MATRICE 8TMOS/1C ₃ O ₄ AVEC S = 500. CONDITIONS DE SYNTHESE : FOUR A 156°C, FILTRE A 120°C, PRESSION D'AZOTE 1 BAR, DEBIT D'AIR COMPRISE 1,5 L/H.....	49
FIGURE 20: DIAMETRE MOYEN DES NANOPARTICULES "BLANCHES" : A) MOYENNE DU DIAMETRE MESURE SUR CLICHES MEB AVEC LA MATRICE 2TMOS-1TMSE ET 8TMOS-1C ₃ O ₄ ; B) DISTRIBUTION DE TAILLE MESUREE POUR LA MATRICE 2TMOS-1TMSE A S = 750.	50

FIGURE 21: OBTENTION DE CMONS PAR REACTION DE KNOVENAGEL. LA PYRIDINE EST UTILISEE COMME SOLVANT, ET LA PIPERIDINE COMME CATALYSEUR.....	51
FIGURE 22: SOLUBILITE DU CMONS DANS LE THF EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.	53
FIGURE 23: NANOPARTICULES DE CMONS ENCAPSULEES RECOLTEES SUR LE FILTRE ELECTROSTATIQUE.	54
FIGURE 24: NANOPARTICULES CONTENANT DU CMONS. MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ AVEC S = 500. CONDITIONS DE SYNTHESE : FOUR A 156 °C, FILTRE A 120 °C, AZOTE 1 BAR, AIR COMPRIME 1 BAR. IMAGES MEB DES NPS OBTENUES : (A) D = 0,9 TROP IMPORTANT, PRESENCE D'AIGUILLES ; (B) D = D _{MAX} = 0,88 DONNANT DE BELLES PARTICULES AVEC UN BON CONFINEMENT DE LA PHASE ORGANIQUE.	54
FIGURE 25: TAILLE DES NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLE AVEC CMONS. (A) MOYENNE DES DIAMETRES POUR LES DIFFERENTES MATRICES. (B) DISTRIBUTION DE TAILLE MESUREE POUR LA MATRICE 2TMOS-1TMSE A S = 750.	55
FIGURE 26: DIAMETRE APPARENT DES NPS CONTENANT LE CMONS OBTENU PAR DLS (COURBES FONCEES AVEC S = 500 ET COURBES PALES AVEC S = 750). MATRICE (A) 8TMOS-1C ₃ O ₄ ET (B) 2TMOS-1TMSE.	57
FIGURE 27: POTENTIEL ZETA DE NPS (A) CMONS-8TMOS-1C ₃ O ₄ ET (B) CMONS-2TMOS-1TMSE.	57
FIGURE 28: CARACTERISATION DU CŒUR CRISTALLIN NU. (A) OBSERVATION EN MEB D'UN NANOCRISTAL APRES DISSOLUTION DE LA COQUILLE. (B) DISTRIBUTION DE TAILLE EN DLS NPS CŒUR COQUILLE S _{C3O4} (COURBE BLEUE) ET NANOCRISTAUX DE CMONS CORRESPONDANTS OBTENUS APRES DISSOLUTION TOTALE DE COQUILLES SILICATEES EN SOLUTION AVEC NAOH (COURBE ROUGE).	58
FIGURE 29: CARACTERISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DES NANOPARTICULES CŒUR-COQUILLES DE TYPE CMONS : A) SPECTRES D'ABSORPTION NORMALISES (TRAITS POINTILLES) ET DE FLUORESCENCE NORMALISES (EXCITATION A 400 NM, TRAITS PLEINS) POUR MATRICE 2 TMOS-1TMSE (NOIR) ET MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ (GRIS) B) SPECTRES DE FLUORESCENCE A 2 PHOTONS NORMALISES (EXCITATION A 800 NM) POUR MATRICE 2 TMOS-1TMSE (NOIR) ET MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ (GRIS).	59
FIGURE 30: CLICHES DE DIFFRACTION ELECTRONIQUE DE (A) NANOCRISTAUX CMONS EN MATRICE 2TMOS-1TMSE ET CRISTALLISE SOUS LA FORME I OBSERVE LE LONG DE L'AXE $\begin{bmatrix} 111 \end{bmatrix}$; (B) NANOCRISTAUX CMONS EN MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ CRISTALLISES SOUS LA FORME II LE LONG DE L'AXE $\begin{bmatrix} 0\bar{1}1 \end{bmatrix}$	60
FIGURE 31: (A) CLICHE DE DIFFRACTION ELECTRONIQUE ENREGISTRE SUR DES NCS DE CMONS EN MATRICE S _{C3O4} , CRISTALLISE SOUS LA FORME (III) $\begin{bmatrix} \bar{1}32 \end{bmatrix}$; (B) IMAGE CORRESPONDANTE TEM EN MODE CHAMP SOMBRE DES NCS DE CMONS.	60
FIGURE 32: (A) IMAGE SHG ET (B) IMAGE TPEF DE NPS EN MATRICE S _{C3O4} . L'ECHELLE D'INTENSITE EST L'INTENSITE TOTALE SOMMEE SUR LES 32 ANGLES INCIDENTS DE POLARISATION. (C-E) REPNSES SHG AND TPEF ANALYSEES DANS LES DIRECTIONS X HORIZONTALE (ROUGE) ET Y VERTICALE (VERT). LES REPNSES A UNE POLARISATION INCIDENTE VARIANT DE 0° A 180° AVEC 32 ETAPES DANS LE PLAN DE L'ECHANTILLON SONT REPRESENTEES COMME GRAPHES POLAIRES. GAUCHE: AJUSTEMENT SHG THEORIQUE. MILIEU: SHG EXPERIMENTAUX (MARQUES) SUPERPOSE AVEC UNE LIGNE CONTINUE OBTENUE PAR UNE TRANSFORMATION DE FOURIER. DROITE: TPEF EXPERIMENTALE (MARQUES). LA REPONSE COMPLETE 0-360° EST RECONSTRUITE PAR SYMETRIE CENTRALE. LES GRAPHES DE GAUCHE SONT OBTENUS SELON LES PARAMETRES SUIVANTS: (C) FORME (II), ANGLES D'EULER ($\theta = 0^\circ$; $\phi = 30^\circ$; $\psi = 0^\circ$); (D) FORME (III), ANGLES D'EULER ($\theta = 30^\circ$; $\phi = -15^\circ$; $\psi = 0^\circ$); (E): ADDITION D'UNE FORME (III) ($\theta = 70^\circ$; $\phi = -50^\circ$; $\psi = 0^\circ$) ET FORME (II) ($\theta = 40^\circ$; $\phi = 40^\circ$; $\psi = 0^\circ$). (CECILE PHILIPPOT ET AL., 2013).	61
FIGURE 33 : (A) IMAGES DE DIFFRACTION TEM OBTENUES SUR DES NCS EN MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ RECOLTEES A 110 °C ET IMAGE EN CHAMPS SOMBRE RECONSTITUEE. (B) IMAGE RECONSTITUEE DE LA ZONE APRES IRRADIATION.	63
FIGURE 34: DIFFRACTION PAR RAYON X DE NPS DE CMONS EN MATRICE SC ₃ O ₄ . NPS RECOLTEES SUR UN FILTRE A 110 °C (COURBE VERTE) ET 140 °C (COURBE ORANGE), AINSI QUE NPS "BLANCHES" RECOLTEES A 110 °C (COURBE GRISE). LES COURBES SONT SUPERPOSEES AVEC UNE SIMULATION DE LA FORME (I) (COURBE BLEUE).	65
FIGURE 35: NANOPARTICULES 8TMOS-1C ₃ O ₄ CONTENANT LE GE1. (A) IMAGE MEB MONTRANT DES NPS AGGLOMEREES. (B) SPECTRE DE FLUORESCENCE DU COMPOSE GE1 SUR POUDDRE (COURBE ROSE) ET SOUS FORME DE NPS (COURBES BLEUE, ROUGE, VERTE).	68
FIGURE 36 : DEPENDANCE DU D _{MAX} OBTENU POUR DIFFERENT FLUOROPHORE EN FONCTION DE LA SOLUBILITE DES MOLECULES DANS LE THF.	71

FIGURE 37: COMPARAISON DES SPECTRES D'EMISSION NORMALISES SUR POUDRE (NOIR) ET ENCAPSULE DANS UNE MATRICE SILICATEE EN SUSPENSION DANS L'EAU (BLEU) DU COMPOSE (A) 13 ET (B) 27.....	72
FIGURE 38: COMPARAISON DES SPECTRES D'EMISSION NORMALISES SUR POUDRE (NOIR) ET ENCAPSULE DANS UNE MATRICE SILICATEE EN SUSPENSION DANS L'EAU (BLEU) DU COMPOSE (A) 28 ET (B) 32.....	72
FIGURE 39: DIAMETRE OBTENU DES NANOPARTICULES GE32 - 8TMOS-1C ₃ O ₄ OBTENUES. (A) DIAMETRE MESURE A PARTIR D'IMAGES MEB AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) DIAMETRE APPARENT MESURE EN DLS APRES SELECTION EN TAILLE.	73
FIGURE 40: CARACTERISATION DES NPS. DIAMETRE HYDRODYNAMIQUE DE (A) CMONS-S _{TMSE} ET DE (B) CMONS-S _{C3O4}	78
FIGURE 41: CARACTERISATION DES NPS. POTENTIEL ZETA DE (A) CMONS-S _{TMSE} ET DE (B) CMONS-S _{C3O4}	79
FIGURE 42: MESURE EN PARALLELE DU DIAMETRE APPARENT DES NPS AINSI QUE DE LEUR POTENTIEL ZETA POUR DES NPS EN MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ AVEC UN TAUX DE SOLVANT DE (A) S = 500 ET (B) S = 750.....	80
FIGURE 43: ISOTHERME D'ADSORPTION ET DE DESORPTION A 77 K OBTENU POUR DES NANOPARTICULES DE MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄	81
FIGURE 44: CARACTERISTIQUE SPECTROSCOPIQUE DU CMONS DANS L'ETHANOL ET D'UNE SUSPENSION COLLOÏDALE DE NP CŒUR COQUILLE (CMONS-MATRICE S _{C3O4}).....	82
FIGURE 45: SPECTRE D'ABSORPTION DES DIFFERENTES SOLUTIONS PREPAREES.	84
FIGURE 46 : SPECTRE DE FLUORESCENCE DES DIFFERENTES SOLUTIONS (EXCITATION A 400 NM, TENSION DU PM = 450 V).....	84
FIGURE 47 : SPECTRE D'ABSORBANCE DES SOLUTIONS CENTRIFUGEES (7000 TR.MIN ⁻¹ , 30 MIN).	85
FIGURE 48: SCHEMA DES VOIES DE FONCTIONNALISATION. LES VOIES DE POST-FONCTIONNALISATION, CO-CONDENSATION, ET GREFFAGE PAR CHIMIE CLICK SONT ENVISAGEES.	87
FIGURE 49: SCHEMA D'UN PRECURSEUR PEG AVEC N VARIABLE.	87
FIGURE 50: CARACTERISATION DES NPS AVANT ET APRES FONCTIONNALISATION. (A) POTENTIEL ZETA DES NANOPARTICULES NON FONCTIONNALISEES (ROUGE) ET DES NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR PEGYLATION (VIOLET). (B) DISTRIBUTION DE TAILLE DES NANOPARTICULES SANS FONCTIONNALISATION (ROUGE) ET DES NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR PEGYLATION (VIOLET).	88
FIGURE 51: CARACTERISATIONS DES NPS CMONS-S _{C3O4} FONCTIONNALISEES AVEC PEG2000-Si (COURBE VIOLETTE) COMPARE AUX NPS DE DEPART (COURBES ROUGES). (A) DIAMETRE APPARENT MESURE PAR DLS. (B) POTENTIEL ZETA.	89
FIGURE 52: CARACTERISATIONS DES NPS GE31-S _{C3O4} FONCTIONNALISEES AVEC LE PEG2000-Si (COURBES VIOLETES) COMPARE AUX NPS DE DEPART (COURBES ROUGES). (A) DIAMETRE APPARENT MESURE PAR DLS. (B) POTENTIEL ZETA.	90
FIGURE 53: FONCTIONNALISATION AVEC LE POLYMERE CHITOSANE.	90
FIGURE 54: IMAGES MEB DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES AVEC LE CHITOSANE. (A) REPARTITION GLOBALE DES PLUS PETITES NANOPARTICULES. (B) IMAGE DE QUELQUES GRANDES NPS SUGGERANT LA FORMATION D'UNE COUCHE DE CHITOSANE.	91
FIGURE 55: POTENTIEL ZETA DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES AVEC LE CHITOSANE (COURBE VIOLETTE) COMPARE A CELUI DES NPS DE BASE (COURBE ROUGE).	92
FIGURE 56: DISTRIBUTION EN TAILLE DES NANOPARTICULES MESUREE PAR DLS APRES FONCTIONNALISATION AVEC LE CHITOSANE (COURBE VIOLETTE) COMPAREE AUX NPS SANS FONCTIONNALISATION (COURBE ROUGE).	92
FIGURE 57: PRECURSEURS BIS-SILYLE PEG-Si ₂ CONTENANT UNE SOUS UNITE PEG (N = 10 : PEG400-Si ₂ ; N = 45 : PEG2000-Si ₂).	93
FIGURE 58: PRECURSEURS MONO-SILYLES UTILISES : PEG550-Si ET AZ-PTES, LE PHOSPHONATE THPMP (ALDRICH), APTES (COMMERCIAL).	93
FIGURE 59: CARACTERISATION DES NANOPARTICULES CONTENANT DES PEG400-Si ₂ . (A) IMAGES OBTENUE AU MEB AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) DISTRIBUTION EN TAILLE A PARTIR DE L'IMAGE MEB AVANT SELECTION EN TAILLE ET (C) MESURE PAR DLS APRES TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (D) MESURE DES CHARGES DE SURFACE.	94
FIGURE 60: CARACTERISATION DES NANOPARTICULES CŒUR CMONS - COQUILLE CONTENANT DES PEG400-Si ₂ . (A) IMAGES OBTENUE AU MEB AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) DISTRIBUTION EN TAILLE A PARTIR DE L'IMAGE MEB AVANT SELECTION EN TAILLE.	95
FIGURE 61: CARACTERISTIQUES DES NANOPARTICULES CONTENANT DES PEG550-Si. (A) IMAGE MEB DES NANOPARTICULES OBTENUES AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) DISTRIBUTION EN TAILLE A PARTIR DES IMAGES MEB AVANT SELECTION EN TAILLE, (C) DIAMETRE APPARENT OBTENU PAR DLS ET (D) CHARGES DE SURFACE MESUREES PAR POTENTIEL ZETA.	96

FIGURE 62: CARACTERISATION DES NANOPARTICULES CŒUR CMONS - COQUILLE CONTENANT DES PEG550-Si. (A) IMAGES OBTENUE AU MEB AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) DISTRIBUTION EN TAILLE MESURE A PARTIR DES IMAGES MEB AVANT SELECTION EN TAILLE.	97
FIGURE 63: CARACTERISATION DE NPS "BLANCHES" EN MATRICE 8TMOS-0.82C ₃ O ₄ -0.18THPMP OBTENUES PAR CO-CONDENSATION THPMP. (A) IMAGE MEB DES NPS OBTENUES AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE. (B) REPARTITION DE TAILLE DES NPS AVANT SELECTION EN TAILLE. (C) DIAMETRE APPARENT EN DLS ET (D) POTENTIEL ZETA DE CES NPS.	98
FIGURE 64: SCHEMA D'UNE REACTION DE CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE.	99
FIGURE 65: IMAGES MEB DE NPS "BLANCHES" EN MATRICE 8TMOS-0.82C ₃ O ₄ -0.18AZPTES AVANT TRAITEMENT EN SOLUTION BASIQUE.	100
FIGURE 66: SPECTRES INFRAROUGE POUR LA MATRICE CONTENANT L'AZ-PTES COMPAREE A LA MATRICE 8TMOS-1C ₃ O ₄ . (A) SPECTRE SUR POUDDRE DE NPS "BLANCHES" ET (B) SPECTRE SUR LES PRECURSEURS EN SOLUTION.	101
FIGURE 67: DIAMETRE APPARENT DES NANOPARTICULES GE32-8TMOS-1C ₃ O ₄ A 25°C SANS AJOUT DE SEL (COURBE ROUGE) ET AVEC 0,9% DE NaCl (COURBE VERTE).	105
FIGURE 68: DIAMETRE APPARENT DES NANOPARTICULES GE32-8TMOS-1C ₃ O ₄ A 37 °C SANS AJOUT DE SEL (COURBE ROUGE) ET AVEC 0,9 % DE NaCl (COURBE VERTE).	106
FIGURE 69: CINETIQUE DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE : NPS NON FONCTIONNALISEES DANS L'EAU (COURBE BLEU) PUIS EN PRESENCE DE SEL (COURBE ROUGE) ; NPS FONCTIONNALISEES AVEC LE CHITOSANE (COURBE JAUNE) ET AVEC LE PRECURSEUR CONTENANT LE PEG LONG (COURBE VERTE).	107
FIGURE 70: DIAMETRE APPARENT A 25 °C DES NANOPARTICULES GE32-8TMOS-1C ₃ O ₄ FONCTIONNALISEES AVEC PEG2000-Si SANS AJOUT DE SEL (COURBE ROUGE) ET AVEC 0,9 % DE NaCl (COURBE VERTE).	107
FIGURE 71: DIAMETRE APPARENT A 37 °C DES NANOPARTICULES GE32-8TMOS-1C ₃ O ₄ FONCTIONNALISEES AVEC PEG2000-Si SANS AJOUT DE SEL (COURBE ROUGE) ET AVEC 9 G.L ⁻¹ DE NaCl (COURBE BLEUE).	108
FIGURE 72: MONTAGE REALISE POUR L'IMAGERIE IN VIVO. LA SOURIS EST IMMOBILISEE APRES LA CHIRURGIE, PUIS L'OBJECTIF EST MIS EN CONTACT AVEC LA SURFACE DU CERVEAU A L'AIDE D'UN GEL PHYSIOLOGIQUE (MAURIN 2011).	110
FIGURE 73: IMAGERIE DE LA MICROVASCULARISATION. (A) IMAGERIE AVEC DES NPS FONCTIONNALISEES AVEC DES PRECURSEURS DE PEG COURTS. LES NPS DE SONT COLLEES AUX PAROIS. (B) IMAGERIE DE LA MEME ZONE APRES INJECTION DU COLORANT DE REFERENCE FITC-DEXTRAN.	112
FIGURE 74: IMAGERIE <i>IN VIVO</i> AVEC LES NPS CMONS-8TMOS-1C ₃ O ₄ FONCTIONNALISEES AVEC DES PRECURSEURS DE PEG LONGS, LE ROUGE ETANT LE MARQUAGE PAR LE RHODAMINE-DEXTRAN. LES PARTICULES DANS LE CERVEAU SONT ICI REPRESENTES PAR LES POINTS VERTS. (A) IMAGE DE LA VASCULARISATION. (B) DANS LE FOIE, ON OBSERVE DES POINTS VERTS.	114
FIGURE 75: IMAGES <i>IN VIVO</i> AVEC LES NPS CMONS-8TMOS-1C ₃ O ₄ FONCTIONNALISEES AVEC LE CHITOSANE, LE ROUGE ETANT LE MARQUAGE PAR LE RHODAMINE-DEXTRAN. LES PARTICULES DANS LE CERVEAU SONT ICI REPRESENTES PAR LES POINTS JAUNES. (A) IMAGERIE DE LA VASCULARISATION (B) ZOOM SUR UNE ZONE DU CERVEAU AVEC DES NPS EN JAUNES. (C) DANS LES REINS, ON OBSERVE DE NOMBREUSES NPS (JAUNE-VERT).	115
FIGURE 76: DIAMETRE APPARENT EN DLS DES NPS CMONS-2TMOS-1TMSE.	116
FIGURE 77: CARACTERISATION DES NPS CMONS-2TMOS-1TMSE. (A) DIAMETRE APPARENT DES NPS FONCTIONNALISEES AVEC PEG2000-Si. (B) POTENTIEL ZETA DES NPS FONCTIONNALISEES (COURBE VERTE) COMPARE AUX NPS NON FONCTIONNALISEES (COURBE BLEUE).	117
FIGURE 78: IMAGERIE DES VAISSEAUX SANGUINS DU CORTEX CEREBRAL. LES NPS SONT REPRESENTES EN JAUNE, LE ROUGE ETANT UN BRUIT DE FOND (PAS D'AUTRE COLORANT ICI). 51 SECONDES SEPARENT DEUX IMAGES CONSECUTIVES. LA DERNIERE IMAGE REPRESENTE L'IMAGERIE DE LA MEME ZONE APRES INJECTION DU COLORANT DE REFERENCE (RHODAMINE-DEXTRAN).	118
FIGURE 79: IMAGERIE DES VAISSEAUX SANGUINS DU CORTEX CEREBRAL. LES NPS SONT REPRESENTES EN JAUNE, LE ROUGE ETANT UN BRUIT DE FOND (PAS D'AUTRE COLORANT ICI). (A) NPS CMONS-2TMOS-1TMSE. 29 SECONDES SEPARENT DEUX IMAGES CONSECUTIVES. (B) NPS CMONS-8TMOS-1C ₃ O ₄ . 24 SECONDES SEPARENT DEUX IMAGES CONSECUTIVES.	119

Index des abréviations

AEF : *aggregation-enhanced fluorescence*

APTES : (3-aminopropyl)triéthoxysilane

Az-PTES : azidopropyltriéthoxysilane

C₃O₄ : 1,16-bis(triméthoxysilyl)4,7,10,13-tétrahexadécane

CdSe : *cadmium selenide*

CMONS : cyano-méthoxy-nitro-stylbène

DLS : diffusion dynamique de la lumière

EPR : *enhanced permeability and retention*

FITC: fluorescein-isothocyanate

IR : infrarouge

MEB : microscope électronique à balayage

NCs : nanocristaux

NPs : nanoparticules

PEG : polyéthylèneglycol

PEI : polyéthylèneimine

QDs : quantum dots

RES : système réticulo-endothélial

SHG : génération de seconde harmonique

TEM : microscope électronique en transmission

THF : tétrahydrofurane

THPMP : 3-(trihydroxysilyl)propyl methylphosphonate

TMOS : tétraméthoxysilane 1,2-bis(triméthoxysilyl)éthane

TMSE : 1,2-bis(triméthoxysilyl)éthane

TPE : *two photon excitation*

TPEF : microscopie de fluorescence à deux photons

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

ZnS : *Zinc sulfide*

Introduction générale

"Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont."

Aristote

L'imagerie de la vascularisation de tumeurs et de leur évolution après thérapie est un point crucial dans l'évaluation et la validation de nouveaux protocoles de traitement anticancéreux. Les méthodes d'imagerie médicale actuelles n'ont pas la résolution spatiale suffisante pour détecter les changements microscopiques apparaissant au niveau des capillaires sanguin. La microscopie de fluorescence excitée à deux photons est actuellement la seule technique qui permette de visualiser ces changements vasculaires à l'échelle microscopique. Cependant, elle exige l'utilisation de traceurs fluorescents très lumineux, stables colloïdalement en solution physiologique pour leur utilisation comme traceur non diffusible à travers les parois des vaisseaux sanguins: diamètres compris entre 20 et 100 nm. Dans l'objectif de réaliser l'imagerie 3D en profondeur de la micro-vascularisation du cortex cérébral de souris par fluorescence excitée à 2-photons, nous envisageons de contrôler la synthèse et les propriétés de nanoparticules hybrides constituées par un noyau monocristallin organique fluorescent entouré d'une coquille silicatée transparente pour obtenir des traceurs stables et biocompatibles. Ces nanoparticules hybrides (nanocristal organique-coquille silicatée amorphe), de diamètre compris entre 20 et 100 nm, devraient constituer une nanoplateforme multifonctionnelle, dispersable en milieux biologiques, particulièrement *in vivo*, et présenter de fortes intensités de fluorescence excitée à 2 photons.

Notre stratégie vise à accroître de façon significative la concentration en molécules de fluorophore, actives dans l'état cristallin, afin d'exalter les sections efficaces d'absorption et d'émission de fluorescence. De plus, les fluorophores sous forme de nanocristaux doivent présenter une meilleure photostabilité. La préparation de ces nanocristaux moléculaires intégrés dans des coquilles silicatées (nanoparticules hybrides cœur-coquille) est basée sur une méthode de nébulisation de sols contenant le fluorophore à nanocristalliser et les précurseurs sol-gel de la coquille silicatée dissous dans un solvant organique. Les gouttelettes nébulisées sont rapidement séchées dans un four tubulaire sous flux laminaire. Ce processus d'évaporation rapide du solvant permet la formation d'une croûte silicatée en surface des gouttelettes, suivie par la nucléation croissance du fluorophore organique confiné au cœur de la particule. Ce processus d'auto organisation spontanée, guidé par le processus de confinement spatial et temporel de la nucléation permet l'obtention de nanoparticules cœur-coquille en une étape.

L'objectif de ma thèse a donc été de synthétiser ces nouveaux traceurs "ultrabrillants" et d'ajuster leurs propriétés physicochimiques en vue de leur utilisation *in vivo*. Au cours de ce travail, des nanoparticules cœur-coquille ont été synthétisées et caractérisées. De plus, du fait de la difficulté de l'imagerie *in vivo*, le défi majeur de cette étude est d'augmenter la brillance des nanoparticules, leur biocompatibilité et leur furtivité afin de favoriser leur circulation dans le flux sanguin du petit animal. A terme, il s'agira d'optimiser le ciblage pour procéder à l'imagerie des vaisseaux sanguins au sein des tumeurs. Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre de l'ANR "Ultrabright Tracers" en collaboration avec l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier pour l'optimisation des précurseurs sol-gel afin d'optimiser la chimie de surface des nanoparticules, et avec Grenoble Institut des Neurosciences qui est intervenu pour l'imagerie de fluorescence excitée à deux photons. D'autre part, afin d'obtenir des nanoparticules très fluorescentes dans le rouge et proche infrarouge (fenêtre de transparence biologique), le groupe Chimie pour l'Optique de l'ENS-Lyon a, dans le cadre de la thèse de Gwenaëlle Eucat, réalisée en parallèle de ce travail, une ingénierie moléculaire spécifique afin de sélectionner des molécules organiques très fluorescentes dans l'état cristallin.

Le premier chapitre de mon manuscrit de thèse permettra de faire l'état de l'art sur l'imagerie de la micro-vascularisation. Après avoir décrit le contexte général de l'imagerie intravitale, l'intérêt de l'utilisation de la fluorescence à deux photons pour ce type d'applications sera présenté. Ensuite, nous ferons le point sur le fonctionnement de l'angiogenèse ainsi que la composition du sang, indispensable pour cette étude, avant de présenter plusieurs types de traceurs particuliers fluorescents pour l'imagerie *in vivo*. Enfin, ce chapitre présentera les principaux mécanismes mis en jeu pour l'élaboration des nanoparticules cœur-coquille hybrides : la chimie sol-gel, la nucléation et croissance cristalline, l'utilisation du réacteur *spray-drying*, et les stratégies de fonctionnalisation envisagées.

Dans le deuxième chapitre, sera présenté en premier lieu la méthode de synthèse des nanoparticules cœur-coquille en décrivant de manière systématique les paramètres chimiques et physiques qui doivent être pris-en compte. Le cyano-methoxy-nitro-stilbène, principal fluorophore utilisé lors de cette thèse, sera ensuite présenté, ainsi que la synthèse

de nanoparticules cœur-coquille et leur caractérisation. La dernière partie de ce chapitre traitera des nouveaux fluorophores émettant dans le rouge – proche infrarouge synthétisés par Gwenaëlle Eucat dans le cadre de notre consortium, ainsi que de la présentation de leur encapsulation dans les nanoparticules.

Le troisième chapitre de ce manuscrit sera consacré aux stratégies de fonctionnalisation des nanoparticules devant permettre une amélioration de la stabilité colloïdale dans les milieux complexes ainsi qu'une augmentation de la furtivité des nanoparticules après injection dans le flux sanguin de la souris. Au préalable, sera décrite notre étude sur la porosité de la coquille des nanoparticules, afin de déterminer les conditions possibles pour une fonctionnalisation ultérieure. Enfin, les stratégies de post-fonctionnalisation et de fonctionnalisation par co-condensation seront introduites ainsi que les résultats obtenus pour chacune de ces stratégies.

Enfin, un dernier chapitre débutera par l'étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules en conditions salines proches de celles du vivant. La suite sera consacrée à la présentation de l'imagerie *in vivo*, après injection dans les souris, réalisée au cours de ce travail ainsi qu'à la compréhension et l'interprétation des différentes expériences menées.

Chapitre I) Chapitre introductif

Un voyage à travers la littérature...

"La littérature mène à tout à condition d'en sortir."

François Villemain

1. Contexte de l'étude

1.1. Contexte de l'imagerie intravitale

Après la découverte des rayons X par W.C. Röntgen en 1896 (Röntgen 1896) et les premières radiographies, l'imagerie médicale a révolutionné la médecine. Depuis plusieurs décennies, les techniques d'imagerie médicale *in vivo* non invasives donnent un accès rapide et fiable à des informations inaccessibles par le diagnostic clinique que ce soit sur la forme ou la densité d'un organe, sur certains aspects de son métabolisme ou sur la distribution d'un traceur spécifique.

Au départ, l'imagerie médicale a été essentiellement utilisée pour des analyses morphologiques ou fonctionnelles des tissus biologiques afin de comprendre le développement et la physiologie des organes et de comprendre un état pathologique. D'importants développements technologiques ont ensuite permis aux techniques d'imagerie médicale d'évoluer. L'instrumentation, l'informatique et l'apport majeur de la chimie ont conduit à la mise en place d'une imagerie moléculaire permettant de suivre *in vivo* la distribution spatiale d'un traceur. De plus en plus de stratégies se développent pour adapter les traitements à de nombreuses pathologies ainsi que pour imager des processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l'expression de gènes ou l'angiogenèse. Les progrès de l'instrumentation dans les domaines de la production des radiations ainsi que dans la détection des signaux ont permis l'amélioration des résolutions spatiales et temporelles des examens. L'arrivée du numérique et des logiciels informatiques de traitement de données ont grandement facilité l'interprétation des images générées et la création d'images fusionnées lors d'examens multimodaux (analyses 3D temporelles).

Dans le cadre hospitalier, l'imagerie du cerveau (Figure 1) est réalisée en injectant un agent de contraste radioactif dans le flux sanguin et en utilisant des techniques basées sur l'absorption des rayons X. Cette technique a été appliquée plus particulièrement pour le cerveau par Egas Moniz (Moniz 1933), un physicien et neurologue à l'université de Lisbonne. Elle permet actuellement de diagnostiquer des maladies comme des tumeurs ou autres malformations artérielles (Ligon 1998).



Figure 1: Imagerie non invasive du cerveau par absorption de rayons X.

1.2. Imagerie des vaisseaux sanguins

L'angiographie permet d'étudier les vaisseaux sanguins qui ne sont pas visibles sur des radiographies classiques. Cet examen dont la signification littérale est "imagerie des vaisseaux" est basé sur l'injection d'un produit de contraste. L'artériographie étant l'imagerie des artères, l'angiographie cérébrale permet un diagnostic de pathologies cérébrales. Cette méthode d'imagerie étant initialement très invasive, des progrès ont été faits au cours des années pour la rendre plus sûre.

Avec l'introduction en 1953 d'un nouveau protocole, la technique de Seldinger (Seldinger 1953), basée sur un système de cathéters, la procédure d'imagerie est devenue plus sûre puisqu'il ne fallait plus introduire d'objet coupant dans le corps. A l'aide d'un système de guides et cathéters (Figure 2), un agent de contraste permet de visualiser les vaisseaux sanguins. Cette méthode est toujours utilisée aujourd'hui. Le cathéter est un long tube fin, rigidifié par un guide, qui est manipulé depuis le point de ponction et mis en place sous contrôle télévisé. Une fois le guide retiré, le radiologue déclenche à la fois l'injection du produit de contraste et l'acquisition des images de l'angiographie.

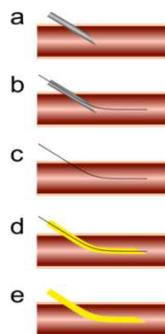


Figure 2: Schéma de la technique de Seldinger (Seldinger 1953): (a) Grâce à l'aiguille de ponction, (b) le fil de Seldinger est introduit. (c) Après avoir enlevé l'aiguille, (d) le fil sert de guide pour introduire (d) par exemple un cathéter avant (e) d'être retiré. L'agent de contraste peut ensuite être injecté.

L'angiographie numérisée utilise une installation assistée par ordinateur. Par la finesse des images qu'elle émet, cette angiographie moderne constitue la référence de qualité en imagerie vasculaire. La procédure informatisée permet d'enregistrer les images sur ordinateur, et de procéder à de nombreux réglages du contraste et des procédés de soustraction des images autres que celles des vaisseaux. Les limites de ces modes d'imagerie sont principalement dues aux produits de contraste iodés qui ne sont pas supportés par tous les patients. De plus, même si la quantité de rayons X utilisée est faible, il existe des limitations, par exemple chez la femme enceinte.

Des techniques moins invasives, sans nécessité de ponction, existent pour réaliser une angiographie. L'échographie-Doppler, par exemple, est une technique d'exploration vasculaire assez informative, sans contre-indication et de faible coût. Cependant, malgré de nombreux progrès, les techniques d'imagerie actuelles souffrent d'une sensibilité et d'une résolution trop faibles pour pouvoir visualiser des changements au niveau microscopique et définir les contours exacts des microvaisseaux. Certaines modalités d'imagerie existantes ou en phase de développement sont actuellement utilisées afin d'observer les vaisseaux tumoraux ou de suivre la réponse à des traitements antiangiogéniques (Dreyer et al. 2009; Thibault et al. 2008). Dans ce cas, il s'agit de visualiser les plus petits vaisseaux, on parlera d'imagerie de microvascularisation.

Les études sur des agents de contraste permettant ce type d'imagerie sont en constante évolution. Il y a un besoin d'agents particuliers biocompatibles de taille supérieure à 20 nm éviter la diffusion à travers les parois des vaisseaux sanguins dans certains tissus, et inférieurs à 100 nm afin de ne pas provoquer d'embolies dans les microvaisseaux et de préserver de bonnes propriétés de furtivité par rapport au système immunitaire.

1.3. Intérêt de la fluorescence à deux photons

La photo-luminescence est un processus pendant lequel une molécule excitée par une onde électromagnétique réémet l'énergie sous forme de lumière. Il existe différents types de luminescence : phosphorescence, fluorescence, etc. Dans le cas de la fluorescence, un laser est la source d'excitation. Après absorption d'un photon provenant de cette source, la

molécule, à l'état excité, réémet un photon de longueur d'onde proche de l'excitation mais légèrement décalée (déplacement de Stokes).

Dans le cas de la microscopie avec excitation à deux photons, l'imagerie de fluorescence permet l'imagerie des tissus vivants en profondeur, jusqu'à environ un millimètre. C'est une variante particulière du microscope de fluorescence. On utilise une lumière d'excitation décalée vers le rouge qui peut également exciter des colorants fluorescents par un processus non linéaire. La théorie du processus non linéaire d'absorption à deux photons a été démontrée en 1931 (Göppert-Mayer 1931) puis vérifiée expérimentalement pour la première fois en 1961 (Kaiser & Garrett 1961), suite à l'apparition des premières sources laser impulsives. Plus récemment, cette propriété d'excitation non linéaire d'un colorant fut utilisée dans le contexte de la microscopie de fluorescence (Denk, Strickler & Webb, 1990). Cette technique de microscopie non linéaire de fluorescence est alors devenue une technique alternative à la microscopie confocale de fluorescence en raison de sa pénétration plus profonde des tissus, et une phototoxicité réduite. Depuis cette découverte, la microscopie de fluorescence par excitation à deux photons (*two photon excitation*, TPE) ou microscopie biphotonique est en phase de développement intense et est plébiscitée en raison de ces avantages pour l'étude de milieux biologiques. L'excitation à deux photons consiste en l'absorption quasi-simultanée de deux photons d'excitation d'une longueur d'onde proche du double de l'excitation optimale à un photon. On utilise pour cela un laser pulsé dans des fréquences proches de l'infrarouge. Lorsque la densité de photons est très élevée (au point focal du faisceau laser), précisément celle des photons balistiques (contrairement aux diffusés), deux photons peuvent être absorbés simultanément. La transition électronique d'un fluorophore vers un niveau d'énergie plus élevé est le résultat de l'énergie combinée des deux photons. Etant donné que la longueur d'onde et l'énergie d'un photon sont inversement proportionnels, les deux photons ont une longueur d'onde d'environ deux fois celle du photon unique dans le cas d'une excitation à un photon (Figure 3a).

Dans ce cas, seul le point de focalisation du faisceau laser est excitateur car la densité de photons y est suffisante pour que le phénomène non linéaire de TPE puisse se produire (Figure 3c). Ainsi, on confine spatialement le phénomène de photoluminescence, contrairement à la spectroscopie monophotonique qui est diffuse (Figure 3b). Les avantages

de cette méthode sont multiples : i) il n'est plus nécessaire d'avoir un sténopé (dispositif optique permettant d'agrandir la profondeur de champ) dans un microscope biphotonique, ii) l'excitation des fluorophores étant limitée au point de focalisation du faisceau laser, le risque de photodégradation est réduit au sein de l'échantillon ; iii) l'utilisation d'une lumière d'excitation à une longueur d'onde élevée (> 800 nm) assure une plus grande pénétration à l'intérieur de l'échantillon (jusqu'à $500 \mu\text{m}$ au lieu de $150 \mu\text{m}$).

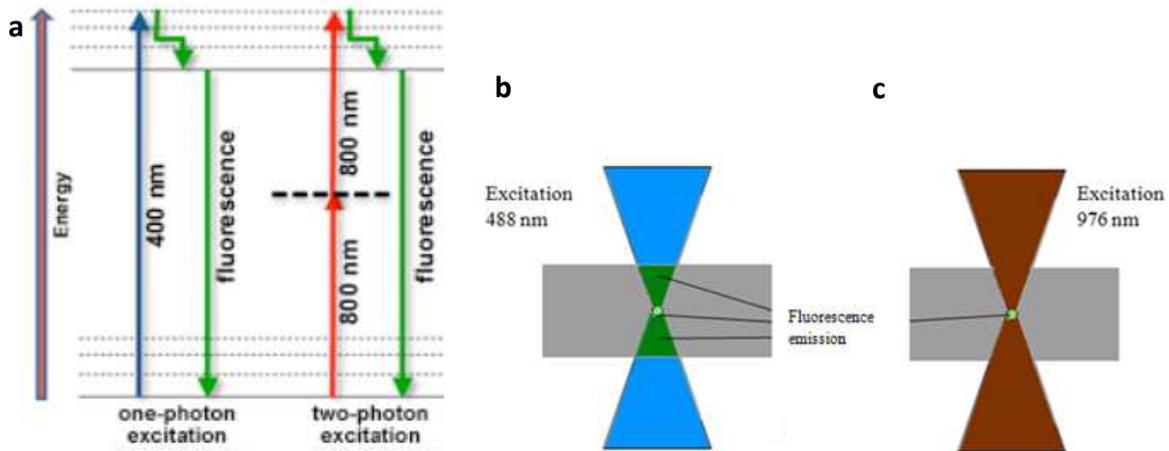


Figure 3: Emission de fluorescence dans un tissu. (a) Niveau d'énergie pour la fluorescence à un et deux photons. (b) L'émission par fluorescence à un photon est diffusée dans l'épaisseur du tissu entier. (c) L'émission par fluorescence à deux photons est plus localisée.

En effet, comme le montre la Figure 4 représentant le coefficient d'absorption molaire des principaux constituants des tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde, le vivant présente une fenêtre de transparence comprise entre 650 nm et $1,1 \mu\text{m}$ (fenêtre biologique). De plus, il existe de l'autofluorescence des tissus très importante pour les longueurs d'onde d'excitation dans le bleu et le vert. En limitant l'absorption par les tissus de la source d'excitation, on réduit le bruit de fond d'autofluorescence du milieu biologique ce qui améliore le contraste des images. C'est pourquoi, l'utilisation de colorants activables à deux photons et émettant dans le rouge ou le proche infrarouge avec excitation dans cette fenêtre biologique permet donc d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit et une profondeur d'analyse plus élevée (Hayek et al. 2006).

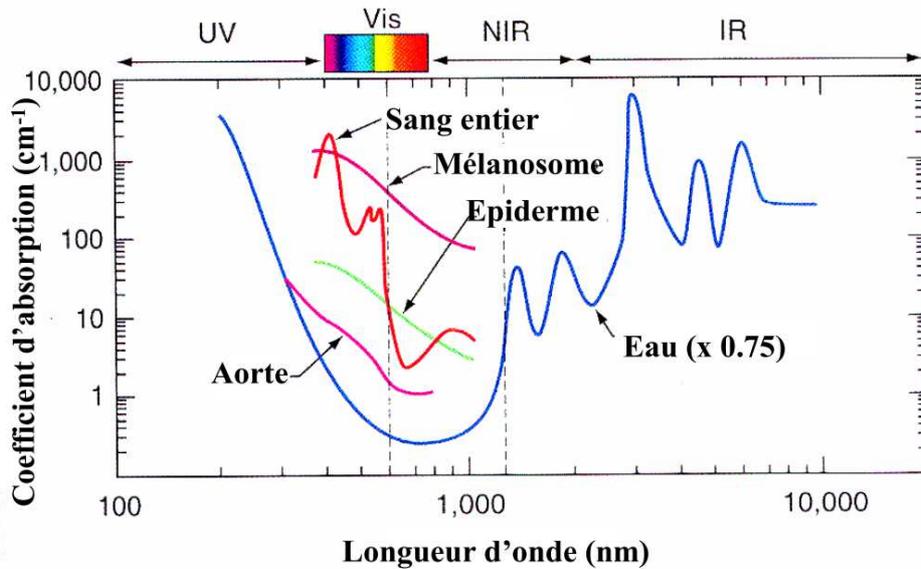


Figure 4: Fenêtre de transparence optique des tissus biologiques. Coefficient d'absorption molaire des principaux constituants des tissus biologiques : sang, épiderme, eau. La plupart des cellules animales sont considérées comme transparentes dans la fenêtre spectrale de 600 nm à 1100 nm (Vo-Dinh 2003).

La microscopie de fluorescence à deux photons permet ainsi d'imager *in vivo* des changements à l'échelle microscopique en trois dimensions puisque la précision du point focal permet de scanner l'objet à imager dans ses trois directions et de reconstituer ensuite l'image en 3D. Cependant, il y a encore un fort besoin en traceurs brillants non diffusibles combinant les propriétés suivantes : photostabilité, grande intensité de fluorescence à deux photons (bonne section efficace en émission et absorption) pour augmenter la profondeur d'imagerie jusqu'à 500 à 600 μm , biocompatibilité, et taille adaptée (quelques dizaines de nm) pour éviter la diffusion à travers les parois des vaisseaux sanguins qui ont une perméabilité plus élevée dans les tumeurs (Jiang et al. 2010).

1.4. Vivant et angiogénèse

1.4.1. Composition du sang

Afin d'effectuer de l'imagerie intravitale, il est nécessaire d'injecter des traceurs dans le flux sanguin. La composition chimique du sang est déterminante pour la stabilité de ces traceurs et leur temps de circulation dans l'organisme. Le sang contient de nombreux éléments cellulaires et des substances fondamentales dont l'hémoglobine qui lui donne sa couleur. Il peut être défini comme un composé des éléments figurés et du plasma. Les éléments figurés sont toutes les cellules contenues dans le sang et en constituent 45 %. Parmi ces éléments, on compte les hématies ou globules rouges (à peu près 99 %) qui permettent de transporter

l'oxygène ainsi que le fer mais aussi le dioxyde de carbone ou le monoxyde de carbone. Les leucocytes ou globules blancs (0,2 %) servent dans le système immunitaire à détruire les agents infectieux. Enfin les plaquettes sanguines (0,6 - 1,0 %) sont responsables de la coagulation sanguine.

Les 55 % restants constituent le plasma sanguin, un liquide jaunâtre qui est la phase liquide dans laquelle sont en suspension les éléments figurés. Le plasma est constitué d'eau, d'ions et de différentes molécules qui sont ainsi transportées à travers l'organisme. Il faut encore le distinguer du sérum sanguin, liquide issu d'un caillot sanguin rétracté, dont la composition est un peu différente de celle du plasma sanguin. Les principales molécules du soluté du plasma sont le glucose, les lipides, les hormones, ainsi que des protéines. Les principales protéines sont l'albumine, les immunoglobulines du système immunitaire, les protéines de la coagulation sanguine, et les protéines de complément qui ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire et de l'inflammation.

Le sang comporte aussi des solutés minéraux : oligo-éléments et ions dissous. La concentration totale des ions est un facteur important dans le maintien de l'équilibre osmotique. Par exemple, la concentration en chlorure de sodium dans le sang est de 0.9 % chez la plupart des mammifères. Certains ions (Na^+ , Cl^- , K^+ , PO_4^{3-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-}) ont également un effet tampon qui contribue avec les protéines plasmatiques à maintenir le pH du sang artériel entre 7,35 et 7,45 chez les humains.

Toutes les protéines circulant dans le sang peuvent potentiellement interagir avec les agents imageants injectés dans la circulation sanguine. Selon les charges de surface des nanoparticules et leur chimie de surface, elles sont capables de se lier aux différentes protéines. Ainsi, il sera important de comprendre et contrôler l'interaction entre les particules injectées et les éléments du sang en vue des futures applications.

1.4.2. Mécanismes de l'angiogenèse

Afin de mieux comprendre l'objet de cette étude, nous introduirons brièvement l'angiogenèse. Le développement du système vasculaire se déroule selon deux phénomènes successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse se produit au cours du développement embryonnaire mais aussi à l'âge adulte lors de pathologies telles que les

cancers. L'angiogenèse tumorale conduit à la création de nouveaux vaisseaux sanguins ce qui entraîne une augmentation du flux sanguin et de son volume. Les paramètres de perfusion et de perméabilité ont été utilisés avec succès pour détecter les tumeurs, différencier les lésions bénignes des lésions malignes et pour le suivi des thérapies antiangiogéniques à l'aide de techniques d'imagerie. On utilise alors l'imagerie de microvascularisation pour visualiser l'intérieur des vaisseaux sanguins et organes du corps (Rumberger 2002; Zanette et al. 1989).

Lors de son développement, une tumeur peut persister pendant plusieurs mois ou années sans augmentation de volume. L'oxygène et les nutriments nécessaires à sa survie sont apportés par les vaisseaux du tissu normal. Il faut pour cela que des capillaires sanguins soient localisés à moins de 200 μm de la tumeur ce qui correspond à la limite de diffusion de l'oxygène. Au-delà de quelques mm^3 , une tumeur solide ne peut croître sans développer de nouveaux vaisseaux qui viendront irriguer la tumeur et accompagner sa croissance. Les thérapies antiangiogéniques constituent l'un des domaines les plus prometteurs pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses. L'obtention de systèmes sélectifs de vectorisation d'agents d'imagerie ou d'agents thérapeutiques est donc un enjeu majeur dans la recherche médicale. L'observation de ces nouveaux vaisseaux permettrait d'imager une tumeur à un stade précoce de son développement.

1.4.3. Comment piéger le système immunitaire ?

Afin de permettre la visualisation de l'angiogenèse par imagerie de fluorescence avec la TPE, il faut dans un premier temps rendre le traceur furtif dans l'organisme pour permettre une bonne circulation dans le flux sanguin. Pour cela, il faut prendre en compte les divers mécanismes de défense du système immunitaire. Il s'agit notamment de l'absorption par le système réticulo-endothélial (RES), qui élimine rapidement les nanoparticules (NPs) de la circulation. De l'agrégation peut conduire à l'emprisonnement des NPs dans le foie, les poumons ou ailleurs en raison de l'occlusion capillaire (Knop et al. 2010). Parmi les mécanismes de défense du corps, l'opsonisation est un processus biochimique par lequel une molécule (dite opsonine) recouvre la membrane d'une cellule cible (une bactérie ou une cellule du corps infectée par un pathogène) pour favoriser sa phagocytose (élimination) par une cellule dotée de récepteurs pour les opsonines (Figure 5). Ce processus fait partie de

l'immunité innée et est réalisé principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : cellule dendritique, macrophage et lymphocyte B.

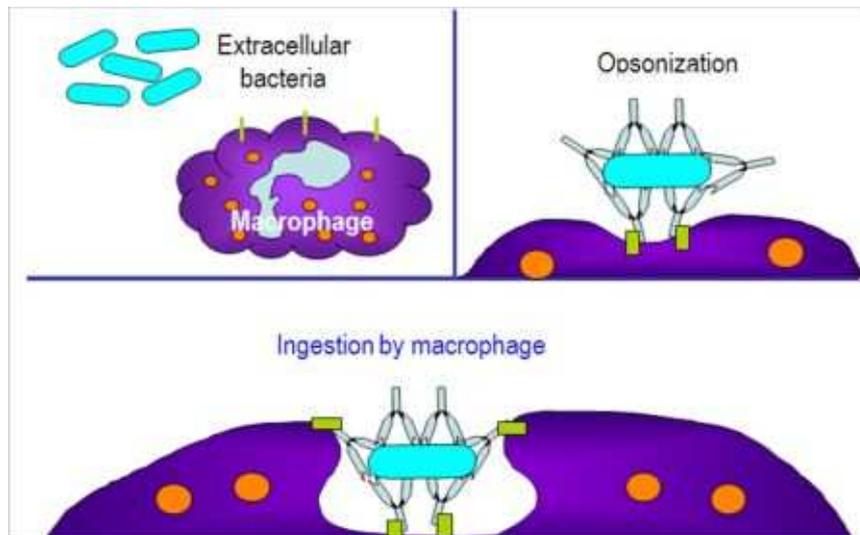


Figure 5: Schéma du processus d'opsonisation: un anticorps (opsonine) se lie au corps étranger pour faciliter l'ingestion et la destruction par les phagocytes (Biology, *webpage* 2014).

Afin d'éviter ces processus d'élimination des corps étrangers, il faut rendre les traceurs "invisibles" par ces organes. La taille et la chimie de surface font partie des facteurs déterminants pour piéger le système immunitaire. En effet, leur diamètre doit être supérieur à 20 nm pour ne pas traverser les parois des vaisseaux sanguins dans certains tissus, et inférieur à 100 nm afin de i) ne pas boucher les microvaisseaux et ii) éviter la reconnaissance par le système immunitaire. Un bon contrôle du diamètre hydrodynamique des particules ainsi que leur chimie de surface (groupements réactifs, charges ioniques,...) permettra d'éviter l'adsorption de protéines à leur surface et ainsi une reconnaissance par le système immunitaire.

1.4.4. Ciblage tumoral

Afin de réaliser l'imagerie de la microvascularisation tumorale, il est important non seulement que le traceur utilisé circule dans le corps mais aussi qu'il entre dans la tumeur. Ainsi, cibler les tumeurs plus précisément permet de les atteindre plus rapidement pour leur visualisation mais aussi leur traitement.

Deux mécanismes permettent de cibler une tumeur : d'une part le ciblage passif par effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*, Danhier et al. 2010; Iyer et al. 2006) présent au sein d'une tumeur. En effet, on y observe une augmentation de la perméabilité

des vaisseaux sanguins en raison d'une modification de la pression créée par l'hyperprolifération cellulaire ainsi qu'une faiblesse du drainage lymphatique permettant une accumulation des nanoparticules circulant dans le flux sanguin (Figure 6a). Dans les tissus tumoraux, les vaisseaux sanguins comportent des pores de plus grande taille (20 nm contre 10 nm dans la plupart des tissus sains) ce qui explique la possibilité de procéder à un ciblage passif de nanoobjets par effet EPR. Ce processus de ciblage passif n'est néanmoins pas efficace pour tous les types de tumeurs puisque cette perméabilité est spécifique seulement à certains types de tumeurs.

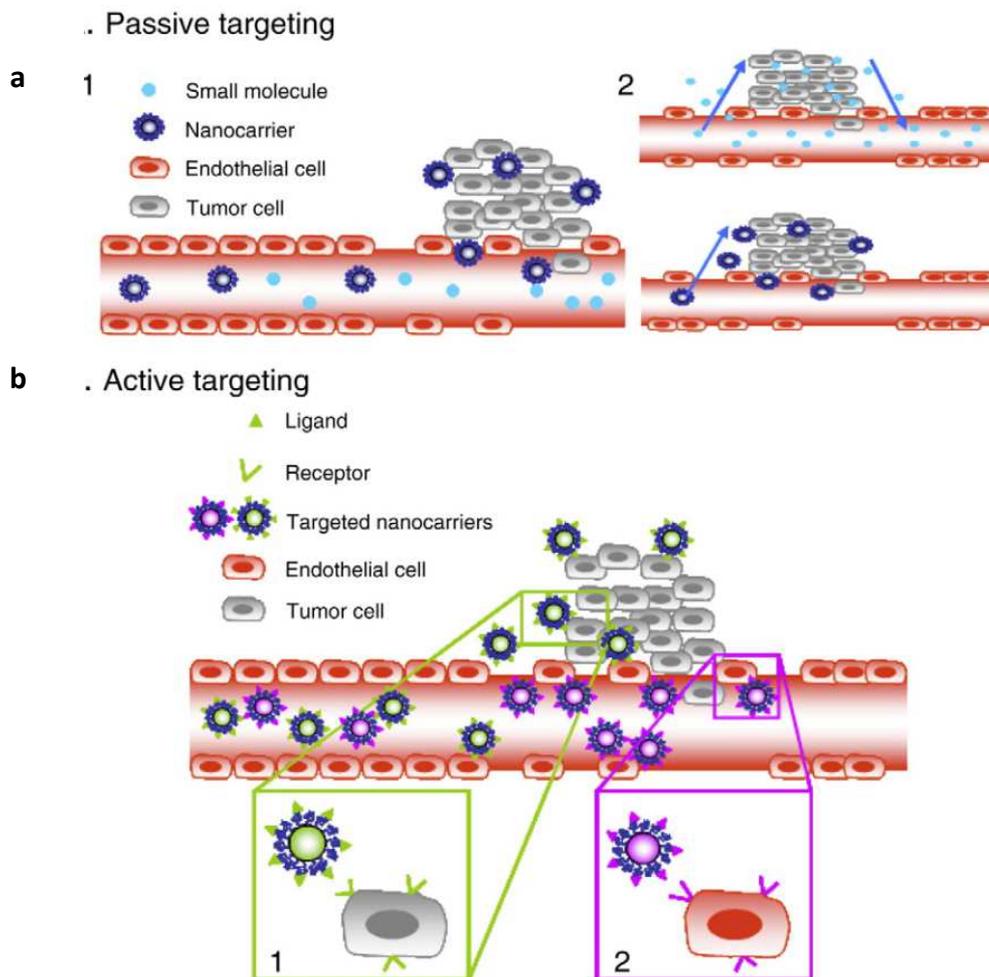


Figure 6: Différents modes de ciblage. (a) Ciblage passif de nanoobjets. (1) Les nanoobjets atteignent les tumeurs sélectivement à travers les défaillances des parois des vaisseaux sanguins. (2) Représentation schématique de l'influence de la taille des objets pour la rétention dans les tissus tumoraux. De petites molécules diffusent librement à cause de leur petite taille et ainsi leur concentration effective dans la tumeur décroît rapidement. Les nanoobjets, plus grands, ne reviennent pas vers le flux sanguin, ce qui résulte en une accumulation progressive: l'effet EPR. (b) Stratégies de ciblage actif. Les ligands greffés à la surface des nanoobjets se fixent aux récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses (Louvain Drug Research Institute, *page web* 2013).

D'autre part, on peut utiliser le ciblage actif grâce à des récepteurs spécifiques (Figure 6b). Ce type de ciblage peut être adapté selon les types de tumeurs. Les intégrines

constituent une famille importante de récepteurs membranaires responsables des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et cellule-agent pathogène. Elles jouent un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine). La liaison de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ à ces protéines se fait par l'intermédiaire de la séquence d'acides aminés "arginine - glycine - acide aspartique" (RGD).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (en anglais *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) est une protéine dont le rôle dans l'organisme est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) nécessaires pour accompagner la croissance des tissus et le développement des organes du corps humain (Ferrara & Henzel, 1989). Le VEGF joue ainsi un rôle important dans la croissance des tumeurs car pour satisfaire leur besoin en oxygène et en nutriments, les tumeurs nécessitent la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Un certain nombre de cellules tumorales portent des récepteurs au VEGF et sont donc aussi des cibles pertinentes pour un ciblage actif de traceurs.

Pour résumer, des cibles privilégiées pour imager l'angiogenèse tumorale sont les récepteurs du VEGF et les récepteurs aux intégrines. La fonctionnalisation des traceurs pour détection par ces cibles constitue donc une approche majeure dans la détection des processus tumoraux.

1.5. Différents types de traceurs particuliers fluorescents

Le développement de nouvelles familles de fluorophores est indispensable au développement de nouveaux traceurs efficaces *in vivo*. Ainsi, nous présenterons, dans un premier temps et de manière générale, l'utilisation de fluorophores moléculaires pour l'imagerie *in vitro* et *in vivo* avant de détailler différents types de traceurs à base de particules efficaces pour l'imagerie à deux photons.

Il existe de nombreux fluorophores qui permettent de marquer sélectivement les différents composants cellulaires. Le tableau ci-dessous (Tableau 1) résume les principaux fluorophores utilisés ainsi que leurs cibles.

immunofluorescence	AMCA ; Alexa Fluor 488, Alexa 568, Alexa 647, etc. ; Cy2 (Cyanine2), FITC, Cy3.5, TRITC, lissamine rhodamine, Texas Red, Cy5.18
ADN	Iodure de propidium, YOYO, SYTO16 (vital), chromomycine A3 ou mithramycine (bases GC), bisbenzimidazole Hoechst 33342 (quelquefois vital), DAPI, YOPRO, TOTO3, TOPRO3
mitochondrie, sensible au potentiel membranaire	Rhodamine123, DiOC ₆ (3), DiOC ₇ (3), JC-1, MitoTracker Orange ou Red CMXRos (vital: post-fixation possible)
membranes	FM1-43, FM4-64, fusions-GFP, et divers anticorps de surface ; filipin pour cholestérol
réticulum endoplasmique	(non spécifique) DiOC ₆ (3) à plus forte concentrations ; GFP-tagguée
appareil de Golgi	quelques anticorps ; GFP-tagguée ; NBD-C ₆ -ceramide (pas pour végétaux)
parois	Acridine Orange, Calcofluor (UV), bleu d'aniline (sur callose), chromomycine ou iodure de propidium (non spécifique), FM1-43, FM4-64
dépendance envers le pH	carboxy-SNARF-1 et dérivés, BCECF
dépendance envers le calcium	Fluo-3 ou -4 (±FF), Fura Red, CalciGreen ; Indo-1, Cameleon
viabilité	fluorescéine di-acétate ; exclusion d'iodure de propidium ; Fluoro-Jade (Histo-Chem) pour neuro-dégénération ; ...et la morphologie par Contraste Interférentiel (DIC)
Protéines Autofluorescentes	CFP, GFP, YFP, DsRed, DsRed2, HcRed1, mRFP1, etc
divers	Acridine Orange, Neutral Red, Lucifer Yellow, chlorophylle, composés endogènes

Tableau 1: Principaux fluorophores utilisés en microscopie confocale et leurs applications (Brown & Talbot, *cours* 2006).

In vivo, des fluorophores sont utilisés pour imager certains organes comme par exemple la fluorescéine pour l'angiographie rétinienne (Binaghi et al. 1984), mais aussi l'indocyanine green ou le Gliolan qui sont également admis en clinique. Néanmoins, les fluorophores souffrent de différents problèmes altérant leur efficacité : la diffusion à travers les parois des vaisseaux sanguins lorsque leur taille est inférieure à 10 nm, les interactions non spécifiques avec l'organisme et une toxicité pas toujours contrôlée. Les fluorophores organiques ne sont en général pas très photostables et il peut y avoir une diminution de la fluorescence émise lorsque le taux de molécules est élevé. Suite à son irradiation, une molécule à l'état excité a tendance à être plus réactive d'un point de vue chimique que dans son état fondamental. Des réactions irréversibles (polymérisations, oxydations, dissociations, isomérisations, liaisons avec d'autres molécules) peuvent se produire et donner naissance à des photo-produits. Ces nouvelles espèces créées sont souvent non fluorescentes ou éventuellement caractérisées par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence différents de ceux de la molécule initiale. Les réactions photochimiques se traduisent ainsi par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon. Cet effet est appelé processus de photoblanchiment (Brown & Talbot, *cours* 2006). Certaines espèces peuvent par ailleurs avoir une influence néfaste sur le milieu biologique vivant (cytotoxicité).

Ainsi, pour l'imagerie *in vivo*, il est intéressant de développer des traceurs à base de particules, puisque leur taille supérieure à 10 nm leur confère un caractère non diffusible à travers les parois. De plus, il devient plus aisé de contrôler leur chimie de surface en greffant différents groupements. Les particules peuvent être rendues fluorescentes en intégrant des fluorophores soit en surface soit dans les particules. Le développement des traceurs fluorescents, ayant pour cible des molécules biologiques, fait actuellement l'objet de nombreux développements (Xie et al. 2010).

1.5.1. Les quantum dots

Les quantum dots (QDs, Bawendi et al. 1990) appelés aussi boîtes quantiques, sont des nanostructures de semi-conducteurs. De par leur taille et leurs caractéristiques, ils se comportent comme des puits de potentiel qui confinent les électrons dans les trois dimensions de l'espace, dans une région d'une taille de l'ordre de la longueur d'onde des électrons, soit quelques dizaines de nanomètres dans un semi-conducteur.

L'utilisation des QDs dans le vivant est encore relativement peu étudiée à cause de leur toxicité innée, spécialement avec les QDs de première génération comme les CdSe (*cadmium selenide*) et ZnS (*zinc sulfide*) (Kirchner et al. 2005). Les avancées dans la synthèse des QDs ont permis l'émergence de QDs sans cadmium (Xie et al. 2008; Zimmer et al., 2006). L'addition de polyéthylèneglycols (PEGs) à la surface des QDs permet de les stabiliser dans l'eau pour un ciblage des tumeurs (Park et al. 2008).

Les QDs sont produits avec une distribution de taille étroite, ils présentent une bonne photostabilité et la synthèse de cœur-coquilles a permis d'augmenter considérablement le rendement quantique de fluorescence de ces objets (Sapsford et al. 2006). Leur spectre de fluorescence est très étroit en comparaison avec des fluorophores moléculaires et peut très facilement être déplacé en longueur d'onde (400 nm – infrarouge) en fonction de la taille de la particule (entre 1 et 10 nm) et la nature du semiconducteur. La surface des QDs peut être fonctionnalisée (Ballou et al. 2004; Ip et al. 2012; Sperling & Parak 2010), ce qui permet de les disperser en milieu biologique ou de greffer des molécules cibles à leur surface.

L'utilisation de QDs pour des applications biomédicales résulte de leurs propriétés physicochimiques uniques : une largeur du spectre d'absorption (Figure 7) permettant une excitation dans une large gamme spectrale, des spectres d'émission étroits et stables dépendant de la taille, une photostabilité importante et une capacité à servir de plateforme pour des agents supplémentaires comme des ligands de ciblage et des agents thérapeutiques. De plus, il y a de nombreuses possibilités inexplorées d'étendre l'utilisation des agents théranostiques basés sur les QDs. Selon la nature des quantum dots utilisés, les QDs peuvent parfaitement être utilisés pour une imagerie en fluorescence à deux photons (Larson et al. 2003).

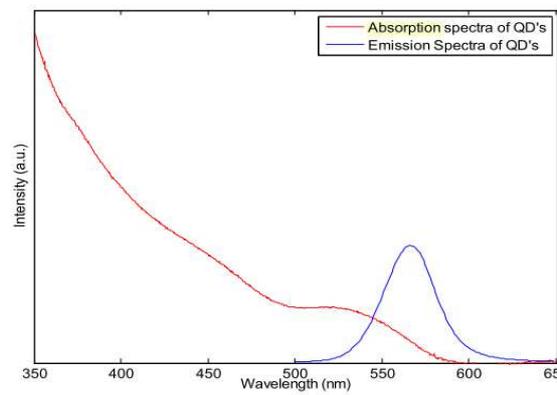


Figure 7: Spectres caractéristiques d'absorption et émission de QDs (Balasubramanian 2007).

Cependant, l'utilisation des QDs en tant que biosenseur ne donne pas de meilleure sensibilité que les systèmes existants (Sapsford et al. 2006). De plus, les synthèses de QDs sont longues et coûteuses. Les QDs ne sont souvent pas aisément dispersables dans l'eau (synthèse organométallique). Il est donc nécessaire de les rendre biocompatibles avec des étapes de fonctionnalisation qui peuvent poser des problèmes d'instabilité (Kloepfer et al. 2005) et de toxicité (Derfus et al. 2004; Nunes et al. 2012). Ces problèmes de coût de production, la préparation pour la dispersion dans l'eau et la toxicité des QDs sont des inconvénients importants pour des applications *in vivo*. Ces conditions exigent la coloration globale du système sanguin et ainsi de grandes quantités de marqueurs fluorescents. De plus, pour l'imagerie de la microvascularisation, particulièrement pour des tumeurs, des traceurs de plus grandes tailles sont exigés (plus de 20 nm pour le diamètre) car la perméabilité vasculaire y augmente considérablement. Ainsi, il paraît être de grand intérêt de développer d'autres types de traceurs.

1.5.2. Les polymères avec fluorophores greffés

Pour permettre une meilleure dispersion et circulation dans le sang des fluorophores, des molécules fluorescentes sont greffées à la surface de polymères. L'un des systèmes commerciaux actuellement les plus utilisés est le Fluorescein-Isothiocyanate (FITC) – dextran (Figure 8) (Vérant et al. 2006). La molécule de dextran est un polymère de glucose dont la masse molaire est d'environ 20 000 g/mole. Ces particules de dextran sont rendues fluorescentes par greffage de molécules de FITC. Les molécules de FITC sont fixées de manière aléatoire aux groupements hydroxyyles du dextran, suivant la proportion de 0,003 à 0,02 moles de FITC par mole de glucose (Andrieux et al. 2002). Le dextran rend le traceur biocompatible, mais en raison du faible nombre de molécules fluorescentes fixées sur chaque polymère de dextran, l'intensité de fluorescence de ces traceurs est encore faible pour imager en profondeur des tissus biologiques. Ainsi, pour ces traceurs, la concentration à injecter doit être très élevée pour avoir un signal suffisant et obtenir une imagerie résolue des vaisseaux sanguins en profondeur.

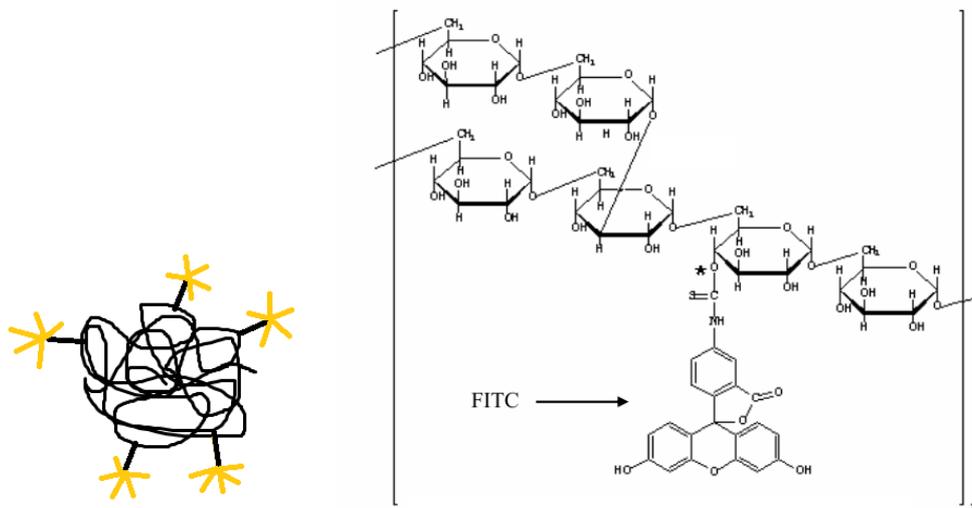


Figure 8: Représentation (a) macroscopique du système et (b) schéma de la molécule FITC-dextran.

Récemment, une équipe de l'ENS Lyon a mis au point le Lem-PHEA (Figure 9a), un nouveau système de molécule fluorescente greffée sur un polymère. Ce traceur fluoresce dans le proche infra-rouge (fenêtre biologique) et surclasse sensiblement les meilleurs colorants actuellement utilisés (Massin et al. 2013) en permettant une imagerie en 3D à très haute résolution ($10 \mu\text{m}^3$) du système vasculaire cérébral (Figure 9b). Ces travaux ouvrent d'importantes perspectives pour l'imagerie de la microvascularisation du cerveau.

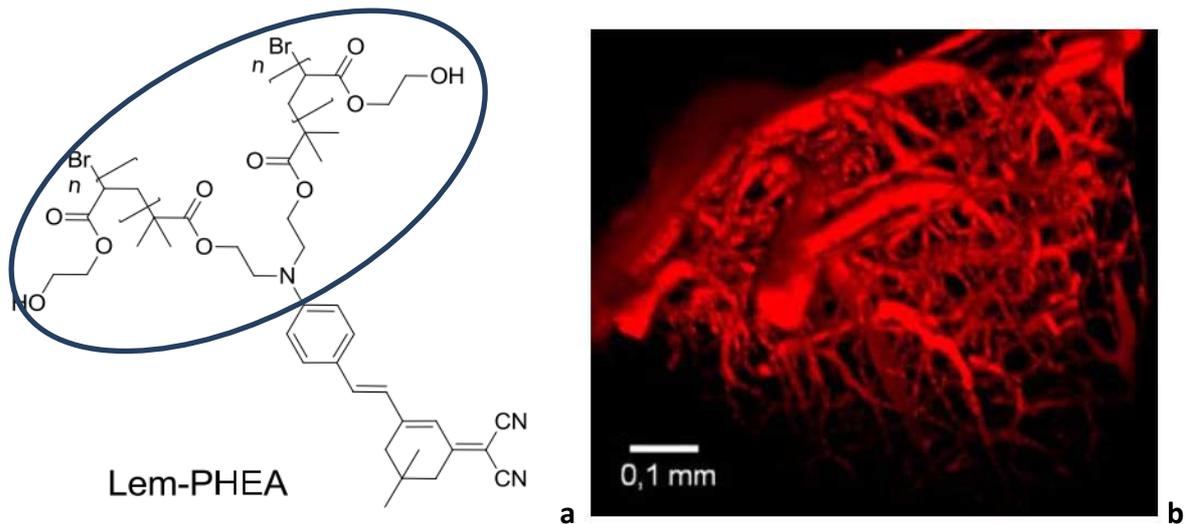


Figure 9: Travaux avec le Lem-PHEA (Massin et al. 2013). a) Représentation de la sonde Lem-PHEA avec le polymère (cercle) et le fluorophore ; b) Imagerie 3D de la microvascularisation obtenue avec Lem-PHEA.

Malgré les avancées importantes, ces systèmes souffrent de quelques inconvénients liés à la présence du faible nombre de molécules fluorescentes greffées en surface du polymère. Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence (spectre, polarisation, rendement quantique et durée de vie de fluorescence) qui sont extrêmement dépendantes de l'environnement physico-chimique dans lequel est dispersé le traceur. Par exemple, des variations importantes peuvent être observées en fonction du pH, de la viscosité, de la température, du potentiel électrique, de la présence d'ions, d'oxygène ou d'éventuelles interactions avec d'autres molécules. De même, les chromophores greffés en surface peuvent subir un photoblanchiment. Depuis quelques années, la recherche s'intéresse donc aux traceurs dans lesquels les fluorophores ne seraient pas en contact avec l'environnement biologique *in vivo*.

1.5.3. Les nanoparticules hybrides fluorescentes

L'intérêt de l'utilisation de ces nanoparticules fluorescentes provient d'une brillance importante de ces objets grâce au nombre élevé de molécules fluorescentes par rapport aux molécules isolées, ce qui augmente leur section efficace en absorption et émission. De plus, une meilleure photostabilité et la possibilité de fonctionnaliser leur surface pour les rendre multifonctionnelles (biocompatibles, furtives, ciblage) sont des avantages significatifs.

Nous décrivons, dans cette partie, quelques exemples d'applications des deux types de nanoparticules : les nanoparticules organiques et les nanoparticules de silice en développant plus particulièrement ces dernières.

1.5.3.1. Les nanoparticules organiques

Les Lipidots (Gravier et al. 2011; Mérian et al. 2012; Merian, 2012) sont une alternative organique aux QDs semi-conducteurs. Ils sont composés d'un mélange d'huile, de cire et de lécithine, puis stabilisés par une couronne de surfactants pégylés (Figure 10). Ces nanoparticules lipidiques sont biocompatibles et leur taille d'environ 50 nm de diamètre. Les lipidots permettent de transporter des composés hautement hydrophobes en leur cœur organique. Des fluorophores y sont encapsulés pour l'évaluation de la biodistribution des nanoparticules chez la souris saine ainsi que dans différents modèles tumoraux. Les applications biomédicales des nanoparticules organiques chez l'homme sont diverses : agent de contraste, délivrement de médicaments *in vivo* ; mais l'instabilité *in vivo* de ces objets reste un point très critique à prendre en compte.

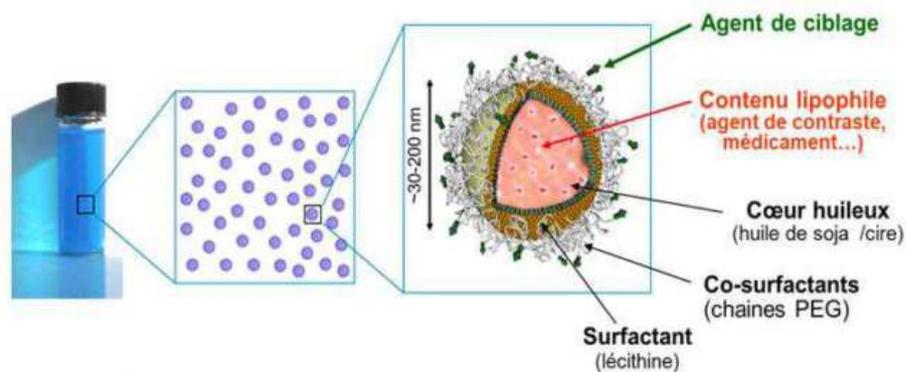


Figure 10: Schéma des lipidots développés au CEA (Merian 2012).

1.5.3.2. Les nanoparticules de silice

La préparation des nanoparticules de silice de taille entre 1 et 100 nm est actuellement un domaine d'intérêt scientifique intense en raison d'une large variété d'applications potentielles dans des champs biomédicaux, optiques et électroniques (Lu T et al. 2011; Na & Hyeon 2009). Les nanoparticules de silice sont très étudiées en tant que plateforme pour des applications dans l'imagerie ou dans le traitement de tumeurs (Gary-Bobo et al. 2011, Gary-Bobo et al. 2012).

1.5.3.2.1. Biodistribution des nanoparticules de silice

Afin de comprendre quels sont les critères importants permettant une circulation de longue durée (plusieurs heures) de nanoparticules dans l'organisme de la souris, il faut s'intéresser au comportement des nanoparticules dans ce milieu complexe. Après injection *in vivo*, ce comportement dépend de leurs voies de métabolisation, c'est-à-dire comment l'organisme vivant les accepte puis comment ces objets étrangers sont distribués aux organes ou éliminés. Cependant, il est difficile de comparer la littérature en raison du grand nombre de nanoparticules différentes (composition, taille, chimie de surface...) ainsi que de la grande variété des protocoles expérimentaux proposés (modèle animal, voie d'administration, organes cibles, durée de l'expérimentation).

La taille des nanoparticules est un critère essentiel pour la circulation de nanoparticules dans le flux sanguin. Des particules de 200 nm sont captées beaucoup plus rapidement que des NPs de 50-100 nm par les macrophages et disparaissent de la circulation (Cho et al. 2009). Néanmoins la taille n'est pas le seul facteur important pour une circulation des particules dans le sang. Des particules de 90 nm peuvent circuler dans certaines conditions, alors que dans d'autres conditions, elles sont détectées et capturées par le système immunitaire avec un diamètre de 30 nm. En effet, il faut prendre aussi en compte la chimie de surface des nanoparticules pour éviter l'agglomération des particules ou leur reconnaissance par l'organisme.

Dans de nombreuses études, les nanoparticules de silice sont repérées par le système immunitaire et éliminées par les phagocytes dans le système réticulo-endothélien. Plusieurs études montrent qu'une charge électronique négative a un effet prononcé sur leur stabilité colloïdale (Natte et al. 2012; Tang et al. 2011). En effet, plus l'interaction entre les ions négatifs est forte, plus il est aisé de stabiliser les NPs. Néanmoins, les interactions entre ces ions très négatifs et des éléments de l'organisme peuvent entraîner une reconnaissance plus rapide par celui-ci, l'adsorption des protéines dans le système circulatoire et ainsi une rapide élimination des NPs du flux sanguin. Ainsi, il peut être intéressant de procéder à une fonctionnalisation avec des molécules à potentiel neutre, positif, ou zwitterioniques. La fonctionnalisation de nanoparticules de silice avec des polyéthylène-glycols permet d'éviter

leur phagocytose (He et al. 2010) et d'allonger de plusieurs dizaines de minutes le temps de circulation.

1.5.3.2.2. Avantages et inconvénients des nanoparticules de silice

Les nanoparticules de silice dopées par un fluorophore (Kim et al. 2009; Santra et al. 2004) présentent beaucoup d'avantages par rapport aux fluorophores dispersés ou aux QDs, dans des applications de bioanalyse comme par exemple l'identification de bactéries (Tran et al. 2013):

L'intérêt de ces nanoparticules est que la fluorescence est plus intense que pour les molécules fluorescentes isolées, puisqu'on concentre les molécules dans les particules en limitant les interactions intermoléculaires grâce à la matrice (Bae et al. 2012). Ainsi, on peut augmenter considérablement la concentration du fluorophore tout en évitant le quenching typique de la fluorescence moléculaire observé habituellement pour une forte concentration de fluorophore en solution (Penzkofer & Lu 1986). Certaines voies de désexcitation non radiative peuvent aussi être bloquées via la protection de la matrice. De plus, une augmentation du rendement quantique de fluorescence et de la durée de vie par rapport au fluorophore en solution sont en général observées (Yan et al. 2007). La matrice protège aussi le colorant du photoblanchiment, notamment en empêchant le contact avec du dioxygène, et la photostabilité des nanoparticules fluorescentes est souvent meilleure que celle du fluorophore moléculaire isolé (Burns et al. 2006; Ow et al. 2005). Des nanoparticules de silice ayant une photostabilité comparable à celle des QDs peuvent ainsi être obtenues (Lian et al. 2004). Il est possible de fabriquer des objets fluorescents dans toute la gamme visible, en changeant de fluorophore organique mais aussi en incorporant plusieurs fluorophores différents dans une même particule. Ainsi, à partir d'une seule longueur d'onde d'excitation, il est possible d'obtenir des particules émettant à différentes longueurs d'onde en modulant la nature des fluorophores et leurs proportions relatives (Wang & Tan 2006). D'autre part, la matrice de silice comporte des groupements réactifs (silanols) en surface des particules qui permettent leur post-fonctionnalisation par des biomolécules. De plus, les nanoparticules de silice sont inertes et non soumises à l'attaque microbienne. Enfin, les synthèses obtenues par synthèse Stöber (Stöber 1968) sont faciles à mettre en œuvre (Ibrahim et al. 2010) et,

en vue d'une meilleure furtivité, des processus de fonctionnalisation sur la silice sont bien connus pour des applications *in vitro* (Bhattacharyya et al. 2012) et *in vivo* (Lu J et al. 2012).

Cependant, les nanoparticules de silice dopées par dispersion de fluorophores peuvent présenter des intensités de fluorescence (brillance) insuffisantes pour des imageries en épaisseur dans les tumeurs (objectif de l'ordre du mm). C'est pourquoi un objectif est de concentrer sensiblement la concentration des molécules fluorescentes au sein de la matrice.

1.5.3.2.3. Effets d'agrégation

Le défi actuel dans le domaine des nanoparticules fluorescentes pour la bio-imagerie est d'atteindre une brillance très élevée et un contrôle externe de leur émission en utilisant des matériaux biodégradables. Pour de nombreuses familles de fluorophores, l'efficacité de la fluorescence s'effondre en cas d'agrégation de ces molécules, ce qui rend impossible leur forte concentration pour atteindre une brillance élevée. Ainsi, il est essentiel de chercher de nouvelles familles de fluorophores qui présentent une fluorescence exaltée par effet d'agrégation (*Aggregation-enhanced fluorescence, AEF*) grâce au contrôle des interactions intermoléculaires permettant d'améliorer la section efficace d'émission de fluorescence plutôt que de la diminuer.

Des avancées ont été faites au cours des dernières années pour parvenir par agrégation à une forte augmentation du nombre de molécules fluorescentes (N) et ainsi à l'exaltation des propriétés fluorescentes du traceur. Récemment, une augmentation importante du signal de fluorescence a été enregistrée par Prasad et al. (Kim et al. 2007) en augmentant significativement le nombre de molécules fluorescentes agrégées dans les nanoparticules de silicate (phénomène d'exaltation de la fluorescence) permettant ainsi une image *in vitro* efficace à deux photons. Depuis, un nombre important de publications décrivent l'utilisation de ce phénomène d'AEF pour la préparation de NPs silicatées hybrides fortement brillantes (Brasselet et al. 2004). L'utilisation d'analogues des fluorophores connus peut aussi dans certains cas permettre d'obtenir une fluorescence exaltée, comme pour les analogues de la green fluorescent protein (GFP) dont certains dérivés présentent les propriétés d'AEF (Fery-Forgues et al. 2013).

D'autre part, l'on cherche aussi à diminuer les interactions entre des molécules étant normalement sujettes à l'auto-inhibition de la fluorescence en cas d'agrégation. Des chercheurs ont développé récemment un nouveau concept de nanoparticules polymériques fluorescentes (Reisch et al. 2014) en encapsulant des fluorophores dans un polymère biodégradable, le PLGA (poly(D,L-lactide-co-glycolide)). Dans ce système, un contre-ion joue le rôle d'espaceur entre les fluorophores et permet de diminuer fortement leur auto-agrégation et ainsi l'auto-inhibition de fluorescence. Les nanoparticules de 40 nm ainsi obtenues peuvent contenir jusqu'à 500 fluorophores et sont 5 à 10 fois plus brillantes que des quantum-dots. Ce concept ouvre la voie à une nouvelle classe de nanomatériaux pour la l'imagerie médicale.

1.5.3.2.4. Les nanoparticules à cœur cristallin

Au laboratoire, nous avons développé ces dernières années des NPs silicatées présentant un cœur organique cristallin qui permet ainsi d'augmenter très fortement le nombre de molécules fluorescentes. Il faut cependant que les composés utilisés soient fluorescents uniquement à l'état cristallin. Nous allons à présent introduire les travaux antérieurs réalisés dans ce domaine avant le démarrage de cette thèse.

L'élaboration de nouveaux matériaux hybrides organo-minéraux, basés sur la cristallisation confinée de nanocristaux organiques dans des matrices silicatées par voie sol-gel, permet d'obtenir un nouveau type de traceurs nanocomposites. Ces particules combinent les propriétés à la fois de la matrice silicatée (stabilité, facilité de mise en forme) et des nanocristaux organiques (fluorescence, photostabilité). Pour ce type de traceur, il faut utiliser des fluorophores organiques qui fluorescent dans l'état cristallin.

Le fait de synthétiser des nanoparticules à cœur cristallin organique permet d'augmenter encore plus significativement le nombre N (Philippot 2010). Dans notre étude, des nanocristaux de différents fluorophores présentant des propriétés de fluorescence à l'état cristallin, enrobés dans une matrice silicatée seront produits (structure cœur organique cristallin - coquille silicatée) ce qui permet d'augmenter le N à 10^5 - 10^8 molécules dans chaque nanoparticule selon les tailles respectives des molécules et du cœur cristallin (Figure 11).

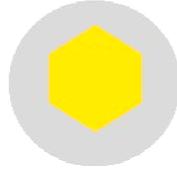


Figure 11: Représentation d'une nanoparticule cœur organique cristallin - voquille silicatée.

2. Elaboration des nanoparticules cœur-voquille hybrides

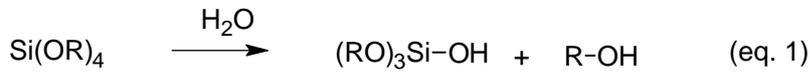
Dans notre procédé d'élaboration de nanoparticules cœur-voquille (Philippot et al. 2010; Philippot 2010), la nucléation des nanocristaux s'effectue à l'intérieur des pores du gel humide mis sous forme de gouttelettes par nébulisation de sols. Pour que la probabilité de nucléation soit significative en milieu confiné, il faut appliquer des sursaturations très élevées par une évaporation très rapide du solvant qui est rendue possible grâce à une méthode de nébulisation par "*spray-drying*", où le sol de départ est rapidement nébulisé dans un gaz vecteur, conduisant ensuite à une interface sol-gaz très importante.

La nature des alcoxydes de silicium utilisés dans notre processus de synthèse influence les paramètres de confinement des nanocristaux organiques, le type d'interactions fluorophore-matrice sol gel et le caractère hydrophile de la voquille silicatée finale qui favorisera la dispersion des particules en solution aqueuse. Afin de mieux appréhender la fabrication des nanoparticules cœur-voquille, la partie suivante introduira la méthode développée au laboratoire avant le déroulement de cette thèse.

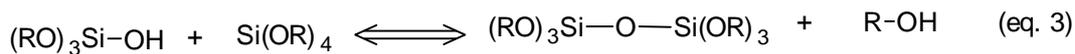
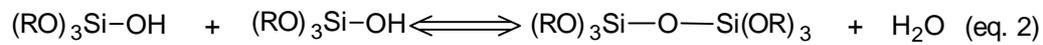
2.1. Précurseurs sol-gel et hydrolyse

Le procédé sol-gel est une méthode d'élaboration de matériaux réalisée dans des conditions douces (température ambiante, en solution...). Il consiste en l'obtention de matériaux solides en solution via des réactions d'hydrolyse et de condensation de précurseurs moléculaires de types alcoxydes à base de silicium, titane, aluminium, zirconium... conduisant à la formation d'un réseau polymérique d'oxydes. Cette technique d'élaboration permet l'obtention de matériaux hybrides organo-minéraux présentant des propriétés chimiques ou physiques très variables combinant les propriétés du réseau inorganique (mise en forme, transparence, densité...) et les propriétés des sous unités organiques (propriétés optiques, électroniques...).

Un matériau silicaté est synthétisé à partir de précurseurs de type alcoxy-silanes. La réaction d'hydrolyse des précurseurs, dans un solvant organique, en présence d'eau, et d'un catalyseur (H^+ ou OH^-) conduit à la formation de silanols ($Si-OH$) par substitution nucléophile (eq. 1).



Les silanols formés réagissent ensuite, via une substitution nucléophile, entre eux (eq. 2) ou avec un alcoxy-silane non hydrolysé (eq. 3) en libérant soit une molécule d'eau soit une molécule d'alcool et formant des ponts siloxanes. Ces réactions successives permettent la formation d'un réseau silicaté covalent tridimensionnel.



Ce procédé abouti donc dans un premier temps à la formation d'un sol (une suspension colloïdale de particules silicatées) se transformant ensuite en un gel (réseau tridimensionnel interconnecté qui emprisonne un solvant).

Dans notre procédé, nous utilisons une hydrolyse-condensation catalysée en milieu acide (acide chlorhydrique). Dans ces conditions, la vitesse d'hydrolyse est fonction de la concentration en H^+ et la charge partielle δ^+ portée par le silicium favorise la croissance en bout de chaîne permettant l'obtention de sols polymériques : chaînes silicatées faiblement ramifiées (Gallagher & Klein 1989). Ces sols polymériques sont ensuite atomisés (réacteur *spray-drying*) pour former des nanoparticules.

2.2. Nucléation et croissance cristalline

La nucléation et la croissance sont deux étapes du processus de cristallisation. La nucléation en solution est la première étape et correspond à l'apparition d'un germe solide cristallin stable thermodynamiquement au sein de la phase liquide. Pour qu'elle se produise, il faut que le milieu homogène considéré soit sursaturé. La probabilité dP d'avoir une nucléation dans un volume V de solution pendant le temps dt est $dP = J V dt$. On en déduit la probabilité

d'avoir une nucléation dans le volume après un laps de temps $t-t_0$ pendant lequel on applique la sursaturation :

$$P_{t_0}(t) = 1 - e^{-JV-(t-t_0)} \quad (\text{eq. 4})$$

Lorsqu'un nucleus parvient à dépasser son rayon critique de viabilité, il est définitivement plus stable thermodynamiquement que la solution homogène et peut donner lieu à la croissance des agrégats de soluté. Cette deuxième étape du processus de recristallisation consiste en l'adsorption de nouveaux atomes, d'ions et entités cristallisantes sur le cristallite initialement formé. Au fur et à mesure de l'agencement des atomes à la surface du cristal, celui-ci se développe en taille.

La méthode de cristallisation de nanocristaux utilisée dans notre laboratoire est un processus confiné dans le temps car il y a évaporation rapide du solvant et dans l'espace au sein des gouttelettes micrométriques (1-2 μm) formées lors de la nébulisation. Cela permet l'obtention de nanocristaux au sein des nanoparticules. Il faut d'abord atteindre rapidement une grande sursaturation de la solution par évaporation du solvant présent dans les sols. Ce processus et les moyens mis en œuvre seront décrits en détails dans le paragraphe suivant.

2.3. Le réacteur utilisé pour le procédé de *spray-drying*

Le séchage par atomisation est un procédé qui permet de fabriquer une poudre à partir d'un liquide, par séchage rapide sous atmosphère chaude par exemple. Un atomiseur permet de nébuliser à travers une buse le flux d'entrée de liquide en un brouillard de gouttelettes de taille contrôlée. Ces gouttelettes sont pulvérisées dans un courant de vapeur chaude. A partir du soluté, les solides sont formés tandis que le liquide est évaporé par le gaz chaud. Si le produit est sensible à l'oxygène, l'azote peut alors être utilisé comme gaz vecteur. Les réacteurs de nébulisation peuvent sécher un produit très rapidement par rapport à d'autres méthodes de séchage (Lee KH et al. 2008; Lee SY et al. 2010).

La synthèse de NPs cœur-coquille qui a été développée dans notre laboratoire (Ibanez et al. 2009) est basée sur la nucléation et la croissance confinée de nanocristaux (NCs) organiques fluorescents produits lors du séchage rapide dans un four tubulaire de gouttelettes générées par atomisation du sol (Figure 12). Au fil des années, cette méthode de synthèse, brevetée en 2009, a été améliorée et adaptée aux conditions d'expérimentation.

Le sol est préparé par dissolution d'alcoxysilanes dans le tétrahydrofurane (THF) en présence d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique. La composition chimique détaillée de ce sol sera développée dans le chapitre suivant (cf. Chapitre II - Elaboration et caractérisation des nanoparticules). Cette solution est placée préalablement à 60°C pendant 7 jours afin de former le sol constitué donc de chaînes polymériques silicatées dispersées en suspension colloïdale.

Le fluorophore organique est ensuite ajouté et dissout dans le sol initial juste avant son introduction dans le réacteur. Le réacteur utilisé pour la synthèse (Figure 12) a été conçu et réalisé au laboratoire. Le sol est introduit dans un flacon (Figure 12 (1)). Après avoir été aspirée par effet Venturi via un flux d'azote (Figure 12 (2)), la solution est pulvérisée à travers une buse (Figure 12 (3)). De petites gouttelettes (1-2 μm) traversent un four sous flux laminaire (Figure 12 (4)). Juste après l'atomisation du sol (Philippot et al. 2010; Philippot 2010; Philippot et al. 2012), chaque goutte contient une solution homogène avec les précurseurs silicatés partiellement hydrolysés et condensés dans le solvant THF, représentés dans la Figure 12 comme des bouts de chaînes noires, et des molécules de fluorophore dissoutes. Ces gouttes commencent leur séchage dans le flux laminaire à l'entrée du four horizontal ($T = 150^\circ\text{C}$). La polycondensation du réseau silicaté interconnecté est plus rapide près de la surface de la goutte, sous l'influence de la forte évaporation du solvant. Cela implique la formation graduelle d'une croûte organosilicatée à la surface des gouttes (Figure 12 (8)). Puis, lorsque le séchage des gouttes est très avancé dans le four horizontal, il y a nucléation et croissance de nanocristaux, confinés au cœur des gouttes car la probabilité de nucléation y est maximale (Figure 12 (9)). En effet, c'est au cœur des particules en cours de séchage que se trouvent les volumes de pores les plus élevés. Finalement, après l'évaporation complète du THF au travers des pores de la coquille silicatée en cours de formation, nous obtenons des NPs cœur-coquille à la sortie du four horizontal (Figure 12 (10)). On obtient ainsi, grâce à ce procédé d'auto organisation, des nanoparticules cœur-coquille hybrides en une seule étape qui sont constituées par un cœur organique monocristallin entouré d'une coquille amorphe silicatée. Les NPs sont ensuite collectées sur un filtre électrostatique utilisant une tension de 10 kV. La température est maintenue élevée (110 à 140°C, Figure 12 (5)) pour éviter toute condensation de solvant en sortie du four tubulaire. De plus, cette technique est rapide (quelques heures pour obtenir 25 mg de NPs à

l'échelle du laboratoire) et générique. Elle peut être adaptée à tout type de fluorophore pouvant être dissout dans un solvant organique compatible avec le procédé sol-gel et plus particulièrement dans le THF qui est un bon solvant volatil.

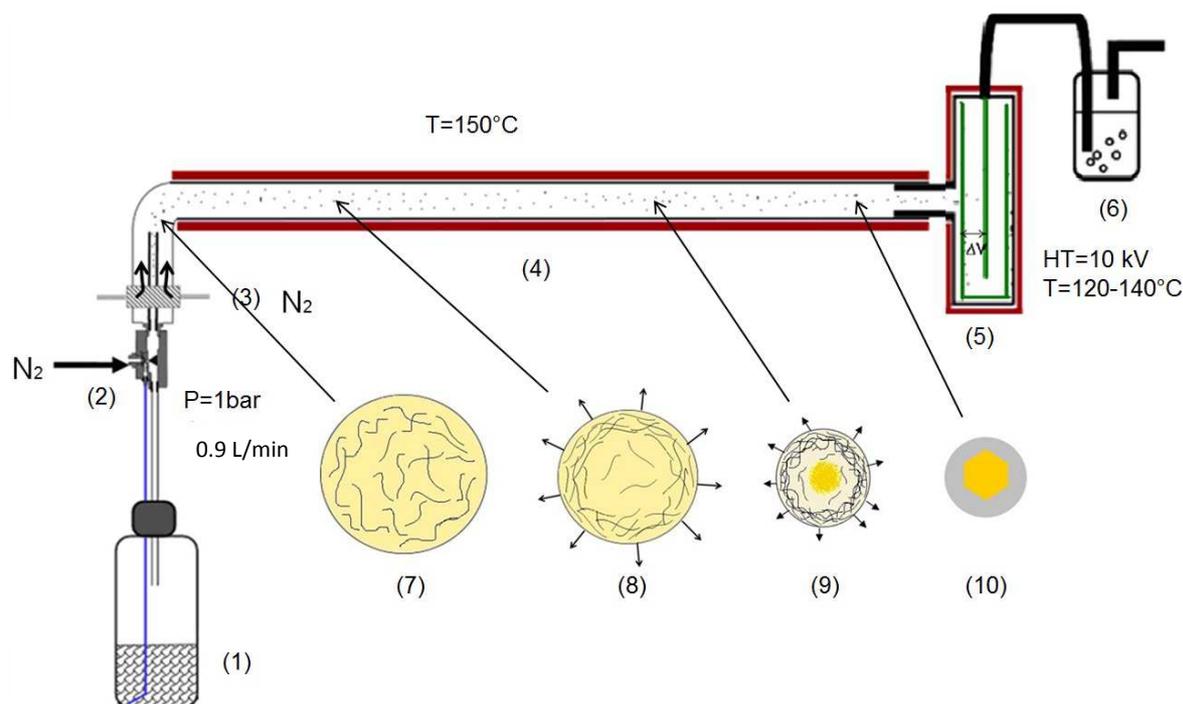


Figure 12: Réacteur de synthèse de nanoparticules cœur-coquille hybrides : Les parties du réacteur. (1) Flacon contenant le sol initial à nébuliser, (2) injection d'azote dans l'atomiseur pneumatique de TSI, modèle 3076, (3) injection annulaire du gaz vecteur, (4) four tubulaire de 160 cm de longueur chauffé à 150°C, (5) filtre électrostatique (10 kV) chauffé à 120 ou 140°C, (6) sortie du gaz vecteur et des vapeurs. Représentation schématique du séchage contrôlé de gouttelettes sol-gel micrométriques (7), formation d'une croûte organosilicatée à la surface des gouttes (8), nucléation confinée et croissance des NCs au cœur des gouttes (9) et NPs cœur-coquille résultantes (10).

De nombreux paramètres physiques d'utilisation du réacteur "*spray-drying*" ont été optimisés durant la thèse de Cécile Philippot (Philippot 2010) afin d'obtenir des particules sphériques avec une distribution de taille entre 10 et 100 nm. Nous reviendrons sur ces paramètres dans le Chapitre II.

Après avoir synthétisé les nanoparticules cœur-coquille, il faut procéder à la fonctionnalisation de celles-ci en vue de leur application *in vivo*. La partie suivante a pour objet de présenter quelques stratégies connues de fonctionnalisation.

2.4. Stratégies de fonctionnalisation

Plusieurs défis fondamentaux rendent l'utilisation de NPs de silice *in vivo* difficile. Il s'agit notamment de l'élimination trop rapide des NPs par l'organisme ou bien d'une accumulation dans les organes comme décrit précédemment. La fonctionnalisation de la surface des nanoparticules (Yu 2012) peut répondre à ces problématiques. La fonctionnalisation peut se faire par différentes méthodes qui seront développées ci-dessous : l'adsorption de polymères en surface (Bhattacharyya et al. 2012; Sarkar et al. 2013; Tripp & Hair 1993), la croissance de polymères directement sur la surface, la condensation d'alcoxydes (El Malti et al. 2011), ou le greffage d'autres molécules comme le phosphonate (Lu J et al. 2007). Nous précisons ci-dessous ces différentes stratégies de fonctionnalisation.

Une première approche consiste à greffer de manière non covalente, par des interactions électrostatiques, un polymère chargé positivement à la surface négative des nanoparticules de silice en suspension colloïdale. Par exemple Xue et al (Xue et al. 2007) ont fonctionnalisé des nanoparticules silicatées par le PolyÉthylèneimine (PEI). Néanmoins, le greffage d'un polymère de façon non covalente avec une liaison électrostatique peut facilement être déstabilisé *in vivo* (Thanh & Green 2010).

Une alternative à ce greffage non covalent est de faire croître le PEI directement à la surface de la particule via l'utilisation d'un précurseur de type aziridine dans le toluène (voir Figure 13) permettant ainsi un encreage covalent du polymère sur la surface tout en formant une surface fonctionnelle pour le post-greffage de biomolécules (Bergman et al. 2008).

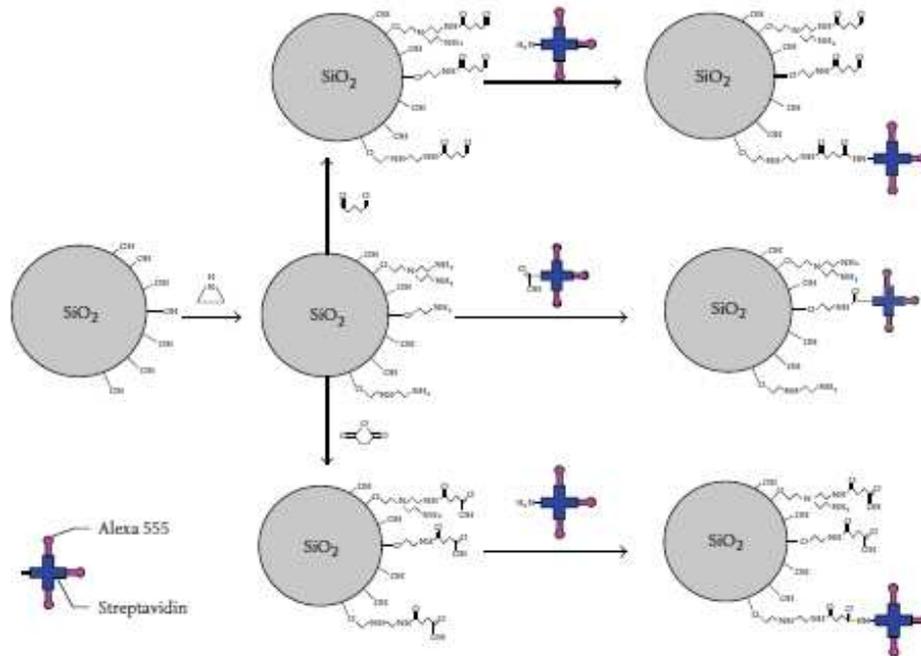


Figure 13: Croissance du PEI à la surface des nanoparticules de silice.

La stratégie la plus développée permettant la fonctionnalisation des nanoparticules de silice consiste en une condensation d'alcoxydes de silicium fonctionnels à la surface des particules (Figure 14). Cette réaction de greffage se réalise en général dans un solvant organique pour éviter toute condensation entre les molécules d'alcoxyde ("self-condensation") et favorisant le greffage à la surface des nanoparticules via la création de liaisons siloxanes Si-O-Si. Ces fonctions d'alcoxydes portent une fonction Y (NH_2 , SH , ...) à l'extrémité libre qui permet de coupler à ces NPs fonctionnelles une molécule pour accroître la stabilité colloïdale et la furtivité, voire greffer une biomolécule (Figure 14) ou une fonction de ciblage.

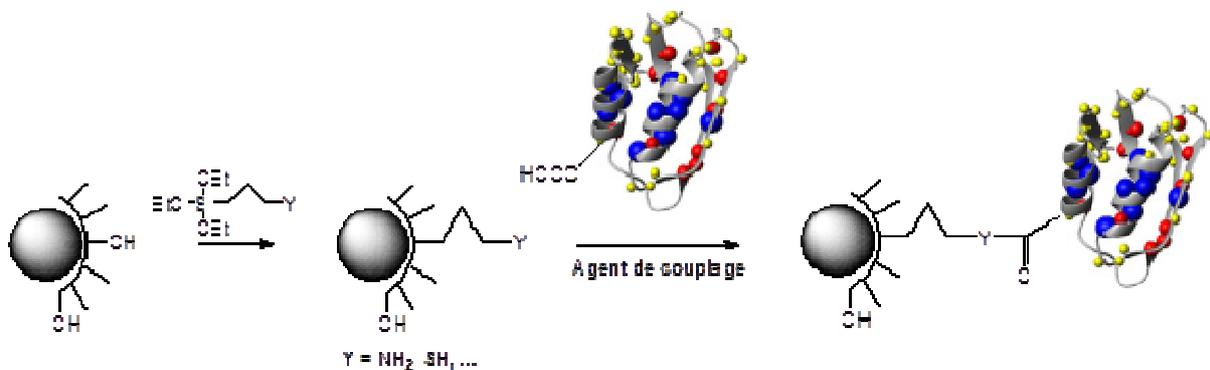


Figure 14: Schéma de greffage par condensation d'alcoxydes de silicium fonctionnels à la surface des nanoparticules.

De nombreuses études ont démontré que le greffage de polyéthylèneglycols (PEGs) via une condensation d'alcoxyde de silicium pégylé permet une amélioration de la stabilité colloïdale des particules silicatées ainsi qu'une diminution des interactions non spécifiques des nanoparticules (Bagwe et al. 2006; He et al. 2010; He et al. 2011). *In vivo*, les PEGs permettent d'augmenter l'accumulation dans les tumeurs (Jokerst et al. 2011), d'allonger le temps de circulation des NPs (Van Vlerken et al. 2007) et diminuer leur rayon hydrodynamique (Calvo et al. 2001). Cette réaction étant très spécifique sur la surface des NPs, elle peut néanmoins s'avérer délicate en milieu aqueux et donner lieu à une co-condensation des réactifs et/ou à un greffage non contrôlé de polymères de tailles variables à la surface des particules pouvant engendrer la sédimentation du système colloïdal.

L'addition de phosphonate (Figure 15,(Lu J et al. 2007)) à la surface des NPs permet également d'accroître la stabilité colloïdale en modifiant les surfaces des particules avec des trihydroxysilylpropyl méthylphosphonate (THMP) après leur formation. En effet, la répulsion électrostatique est plus élevée (Figure 15B), ce qui réduit le risque d'agrégations provoquées normalement par des interactions de liaisons hydrogène interparticulaires (Figure 15A), et augmente ainsi la stabilité des particules en solution aqueuse. Le même groupe de recherche a montré que l'acide folique permet également d'augmenter l'efficacité d'un traitement anticancéreux (Lu J et al. 2012). En effet, des nanoparticules mésoporeuses silicatées fonctionnalisées avec l'acide folique présentent une biocompatibilité supérieure pour des applications pharmacologiques, la possibilité de réduire les effets secondaires indésirables des médicaments anticancéreux, et une clairance rénale rapide.

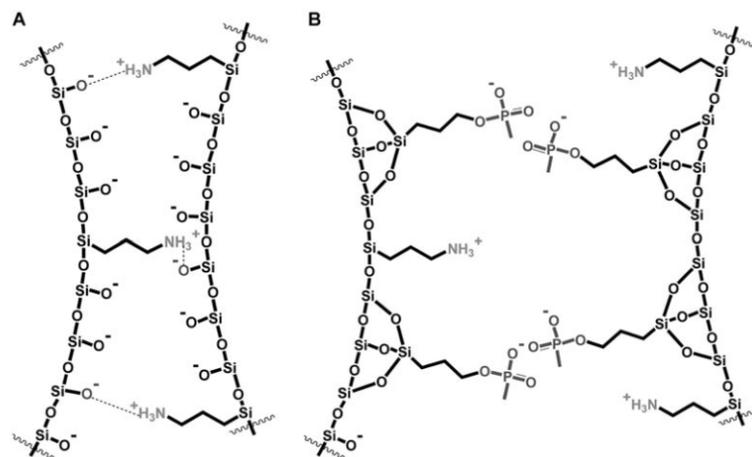


Figure 15: Interaction entre nanoparticule (a) sans fonctionnalisation et (b) avec ajout de phosphonate.

2.5. Conclusion et enjeux sur l'élaboration des nanoparticules

Ce premier chapitre nous a permis d'aborder les différents critères importants dans l'obtention de nanoparticules pour l'imagerie intravasculaire : contrôle de la forme des nanoparticules, obtention de nanoparticules de tailles optimum et le développement d'une chimie de surface permettant la fonctionnalisation des nanoparticules afin d'augmenter la furtivité des objets dans les milieux complexes.

On manque aujourd'hui encore de traceurs très fortement fluorescents pour augmenter la profondeur d'observation de la microvascularisation du cerveau en trois dimensions. L'utilisation de nanoparticules fluorescentes (QDs, micelles, silice,...) est ainsi une approche potentiellement intéressante pour développer l'imagerie intravitale à deux photons (Ftouni 2012; Maurin 2011). Cependant, les publications dans ce domaine restent limitées à cause de la difficulté de synthétiser des marqueurs brillants présentant de grandes efficacités d'excitation et d'émission de fluorescence à deux photons, de taille adaptée pour être non-diffusibles au travers les parois des vaisseaux, ainsi que de bonnes propriétés de biocompatibilité, furtivité et ciblage.

Le sujet de cette étude est donc de synthétiser de nouveaux traceurs hybrides comprenant un cœur organique cristallin enrobé d'une coquille silicatée. Le cœur organique de ces particules de quelques dizaines de nanomètres correspond à un agrégat d'environ 10^5 molécules fluorescentes. Ce nombre élevé de molécules améliore la section efficace d'absorption et d'émission des NPs par rapport aux molécules dispersées. Ces NPs très brillantes présentent une bonne photostabilité grâce à leur cristallinité. De plus, la coquille sol-gel silicatée est transparente dans le visible et proche infra-rouge, biocompatible et peut être rapidement fonctionnalisée pour améliorer la furtivité et le ciblage.

Chapitre II) Elaboration et caractérisation des nanoparticules hybrides cœur- coquille

Le voyage scientifique...

"L'expérience est une observation provoquée dans le but de faire naître une idée."

Claude Bernard

Dans ce chapitre, les différents paramètres importants pour la synthèse des nanoparticules cœur-coquille seront détaillés. Dans un premier temps, je présenterai les précurseurs silicatés sélectionnés ainsi que les paramètres chimiques importants pour la préparation des sols. Ensuite, je détaillerai les paramètres physiques du réacteur *spray-drying* qui influent sur le résultat des synthèses comme la pression d'azote, les températures du four et du filtre et le débit du gaz vecteur. Enfin, je consacrerai une partie du chapitre à la présentation des caractéristiques du CMONS, fluorophore principalement utilisé dans ce travail et je présenterai les caractérisations des nanocristaux obtenus avec cette molécule par différentes méthodes de microscopie et de spectroscopie, avant d'introduire de nouveaux fluorophores émettant dans le rouge à l'état cristallin. Ces derniers ont été mis en forme dans les nanoparticules par notre méthode.

1. Paramètres chimiques pour la synthèse de nanoparticules organosilicatées

1.1. Nature des alcoxydes

Trois différents alcoxydes de silicium sont utilisés pour la synthèse des nanoparticules. Le tétraméthoxysilane (TMOS, Figure 16a) et le 1,2-bis(triméthoxysilyl)ethane (TMSE, Figure 16b) sont des produits commerciaux (ABCR) tandis que le 1,16-bis(triméthoxysilyl)-4,7,10,13-tetraoxahexadécane (C_3O_4 , Figure 16c) a été synthétisé par l'équipe de B. Boury à l'institut Charles Gerhardt.

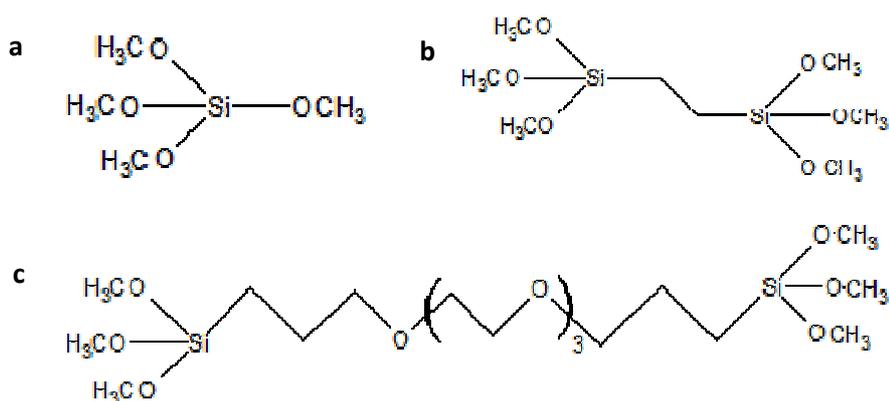


Figure 16: Alcoxydes de silicium utilisés pour la synthèse de nanoparticules. (a) TMOS ; (b) TMSE ; (c) C_3O_4 .

Des expériences antérieures (Philippot 2010) ont permis de sélectionner deux compositions molaires d'alcoxydes de silicium pour la préparation du sol permettant d'obtenir un bon confinement des nanocristaux (NCs) organiques dans des coquilles sphériques de silicate présentant un bon caractère hydrophile de la surface des

nanoparticules. Les compositions molaires mises au point à partir de ces trois alcoxydes sont : 2TMOS-1TMSE (le sol sera appelé S_{TMSE}) et 8TMOS-1 C_3O_4 (le sol sera appelé $S_{C_3O_4}$). Le TMSE et le C_3O_4 présentent des espaceurs organiques entre deux fonctions silylées (groupe éthyl pour TMSE et groupe tétraoxahexadécane pour C_3O_4), ce qui réduit les interactions entre la molécule de fluorophore et la matrice silicatée, tout en maintenant un caractère hydrophile à la surface des NPs. En outre, la sous-unité PEG dans le C_3O_4 augmente la biocompatibilité tandis que la flexibilité des chaînes organiques pourrait conduire à une porosité fermée de la coquille silicatée des nanoparticules. Cette porosité fermée pourrait ainsi permettre de disperser ce type de particules en solvants organiques afin d'utiliser différentes voies de fonctionnalisation sans dissoudre les nanocristaux de fluorophore préalablement nanocristallisés au cœur de ces particules silicatées.

1.2. Les paramètres chimiques à adapter

Les sols qui seront nébulisés sont préparés dans des flacons de 60 mL avec des bouchons avec un joint en PTFE résistant au tétrahydrofurane (THF) qui est le solvant utilisé dans la préparation des solutions initiales. Afin d'éviter tout contact des alcoxydes de silicium avec l'humidité ambiante, la manipulation des précurseurs est réalisée en boîte à gants sèche. Les différents réactifs entrant dans la composition de la solution initiale sont additionnés selon une séquence bien établie. Dans un premier temps, une quantité précise (cf. exemple Tableau 2) de TMOS et du second précurseur (TMSE ou C_3O_4) sont solubilisés dans une quantité précise de THF. Ensuite, l'eau d'hydrolyse et le catalyseur acide (acide chloridrique) sont additionnés simultanément afin de catalyser la réaction d'hydrolyse. Une fois la solution préparée, elle est placée à l'étuve (60° C) pendant une semaine pour réaliser les réactions d'hydrolyse et de condensation qui donnent lieu à la formation du sol.

Données sur les produits:	TMOS	TMSE	C ₃ O ₄	THF	HCl (1 M)
M (g.mol ⁻¹)	152,22	270,1	474	72,11	18
ρ (g.cm ⁻³)	1,032	1,032	1,06	0,88	1
h = [H ₂ O]/[OR]					1
s = [solvant]/[Si]					500
nSi/molécule	1	2	2		
n(-OR)/molécule	4	6	6		
Composition des sols:					
8TMOS/1C ₃ O ₄	172 μL		65 μL	59,6 mL	99,5 μL
2TMOS/1TMSE	107,5 μL	93 μL		59,7 mL	92 μL

Tableau 2: Détermination des quantités de réactifs pour l'obtention de 60 mL de sols S_{TMSE} et S_{C₃O₄} (s = 500, h = 1). ρ est la masse volumique des précurseurs, h le taux d'hydrolyse et s le taux de solvant choisi.

Concernant les proportions molaires des différents constituants des sols, j'ai utilisé les paramètres chimiques suivants :

Le taux de solvant, noté $s = [\text{solvant}] / [\text{Si}]$ avec $[\text{solvant}] =$ concentration molaire en solvant et $[\text{Si}] =$ concentration molaire en alcoxydes de Si. Dans notre cas nous fixons, dans un premier temps, s égal à 500 car cela permet d'obtenir une majorité de particules de diamètre inférieur à 100 nm sans réduire trop fortement la quantité de matière produite. De plus, ce taux de solvant élevé permet d'obtenir des sols possédant une faible viscosité afin de favoriser la nébulisation des sols. Le THF, solvant polaire aprotique, est utilisé dans notre cas en raison de la bonne miscibilité avec l'eau et des bonnes solubilités des fluorophores utilisés dans ce solvant. De plus, le THF possède un point d'ébullition assez bas de 66 °C permettant une évaporation rapide dans le réacteur de spray-drying dont la température du four est fixée autour de 150° C.

Le taux d'hydrolyse, noté $h = [\text{H}_2\text{O}] / [-\text{OR}]$ avec $[-\text{OR}] =$ concentration molaire en fonctions alcoxydes dans la solution de départ, conditionne les cinétiques relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation. Suite aux études précédentes du laboratoire (Philippot 2010), il a été fixé à $h = 1$, correspondant donc à autant de molécules d'eau que de fonctions -OR à hydrolyser, ce qui conduit à la formation de chaînes polymériques linéaires faiblement réticulées durant l'étape de vieillissement des sols dans l'étuve (1 semaine à 60° C).

Juste avant l'introduction du sol dans le réacteur de synthèse, une certaine quantité de fluorophore organique est introduite dans le sol. Sa quantité est défini par le paramètre $d = [\text{orga}] / [\text{Si}]$ avec $[\text{orga}] =$ concentration molaire en fluorophore organique et $[\text{Si}] =$ concentration molaire en alcoxydes de Si dans le sol. Pour chaque fluorophore, un d_{max} sera déterminé. Ce d_{max} correspond au maximum de fluorophore que l'on peut introduire en préservant un confinement total de la partie organique dans les nanoparticules organosilicatées, sans ségrégation de phase. Cette valeur est directement reliée à la solubilité de la molécule organique dans le THF : plus le fluorophore est soluble, plus grande sera la quantité de fluorophore que l'on pourra inclure sans perturber le processus de confinement.

2. Paramètres physiques du procédé de *spray-drying* pour l'obtention de nanoparticules organosilicatées

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

Le nébulisateur utilisé est le modèle "3076-constant output atomizer" commercialisé par la société TSI-Incorporated. La pression maximale pouvant être appliquée à l'entrée de ce système est de 2,4 bars de gaz. La pression de gaz appliqué influence la vitesse de la nébulisation mais aussi la distribution en taille des gouttelettes générées. Dans notre cas, la pression d'azote utilisée a été fixée à 1 bar (débit de $0,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) ce qui permet d'obtenir également une aspiration modérée du sol par effet Venturi (aspiration par différence de pression), sans trop de retour de solution non nébulisée dans le flacon initial (cf. Figure 12 Chapitre I). Une pression appliquée plus faible (de l'ordre de 0,6 bar) engendre une aspiration insuffisante du liquide pour provoquer sa nébulisation. A l'opposé, une pression plus importante permet l'obtention de nanoparticules mais augmente la distribution en taille de celles-ci en raison de turbulences et coalescence des gouttelettes en sortie de buse (coalescence des gouttes).

2.2. Températures du four et du filtre électrostatique

La longueur du four a été ajustée à 160 cm afin que les particules arrivant sur le filtre électrostatique soient complètement sèches, pour une température du four de $155 \text{ }^\circ\text{C}$. En effet, la température du four devra être inférieure de quelques degrés à la température de fusion du fluorophore et bien au-dessus de la température d'ébullition du solvant utilisé

(THF, $T_{\text{ébullition}} = 66 \text{ }^{\circ}\text{C}$) afin d'obtenir une évaporation très rapide de celui-ci. La température est réglée une heure et demi avant la synthèse des NPs afin qu'elle soit totalement stabilisée. La différence entre température de consigne et celle effectivement appliquée est régulièrement suivie par des étalonnages du four car la température de séchage est déterminante comme nous le verrons plus loin. Comme le montre la Figure 17, la température mesurée à l'intérieur du four tubulaire est homogène sur l'ensemble de la longueur, à l'exception évidemment de la sortie du four qui est partiellement ouverte au cours des mesures.

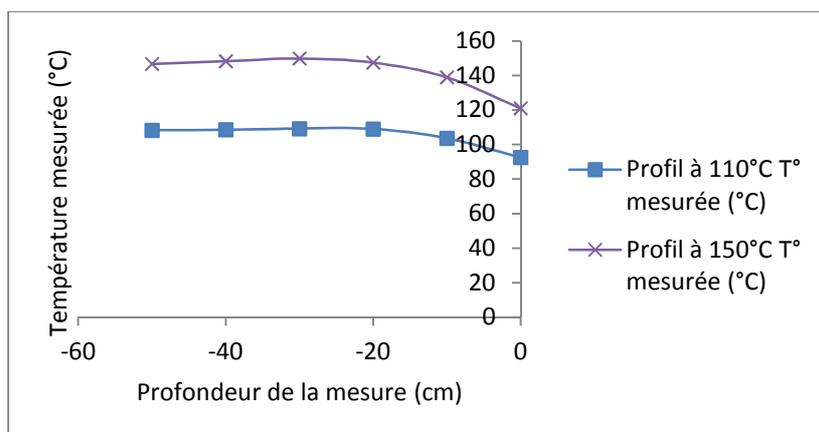


Figure 17: Profil de température du four tubulaire. L'ordonnée à l'origine représente la sortie du four.

La température du filtre électrostatique est fixée à $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sensiblement au-dessus du point d'ébullition de l'eau pour éviter toute condensation de liquide dans le filtre et sur les NPs. On obtient ainsi des particules totalement sèches sans risque de fusion de la phase organique. De plus, on applique une très forte tension entre les électrodes (10 kV). Il faut donc éviter toute condensation d'eau qui pourrait conduire à un arc électrique.

2.3. Débit du gaz vecteur

Nous avons appliqué un très faible débit d'air vecteur ($0,03 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) juste au-dessus du nébulisateur par une injection annulaire (Figure 12). Celui-ci, bien que très faible par rapport au flux d'azote assurant la nébulisation ($0,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), favorise de bons rendements de synthèse et le séchage complet des nanoparticules. Cette plage de débit favorise (Cécile Philippot, 2010) de plus un flux laminaire dans le four tubulaire qui limite la coalescence des gouttelettes ainsi que les chocs entre particules en fin de séchage. L'utilisation de débits trop élevés ne permet pas de récolter toutes les NPs qui sont alors rejetées dans un piège d'eau,

diminuant ainsi le rendement du procédé d'élaboration. De plus, pour des débits sensiblement supérieurs, les particules n'ont pas le temps de sécher complètement et on observe alors des impacts à leur surface suite aux chocs entre particules arrivant humides sur le filtre électrostatique. Ce phénomène d'impacts est observé (Figure 18) en microscope électronique à balayage (MEB, Carl Zeiss Ultra plus, cf. Annexe C). A l'opposé, lorsque l'on utilise des débits trop faibles, le rendement de synthèse chute également en raison d'un dépôt de matière sur les parois du four.

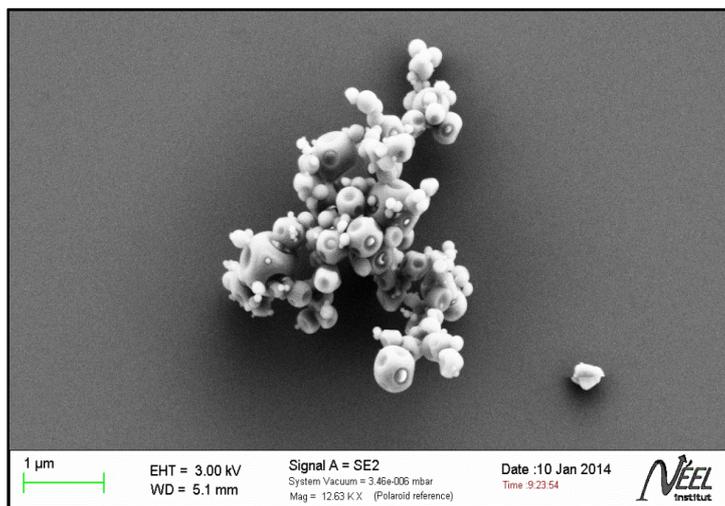


Figure 18: Observation par MEB des nanoparticules avec impacts visibles et incrustation des plus petites NPs dans celles de plus grande taille dont le séchage n'a pas été total lors de leur collection dans le filtre électrostatique.

2.4. Obtention de nanoparticules sphériques

Avant toute introduction de fluorophore, j'ai synthétisé des NPs dites "blanches", c'est-à-dire obtenues par nébulisation d'un sol sans fluorophore, afin d'optimiser les conditions de "spray-drying". Par la suite, j'utiliserai ces NPs "blanches" pour l'optimisation des conditions de dispersion et de stabilité colloïdale en solution aqueuse, ainsi que pour des premiers tests de fonctionnalisation (cf. Chapitre III).

Les nanoparticules "blanches" obtenues sont stockées sur le filtre électrostatique en sortie du four. Ces NPs sont ensuite récoltées à l'aide d'un pinceau et stockées soit sèches soit dispersées dans l'eau pure déminéralisée. Les nanoparticules obtenues sont observées à l'aide du MEB. Lorsque les conditions de synthèse sont optimales, l'on obtient, comme le montre la Figure 19, des particules sphériques d'une taille moyenne inférieure à 100 nm, bien séparées les unes des autres et ne présentant pas de traces d'impact.

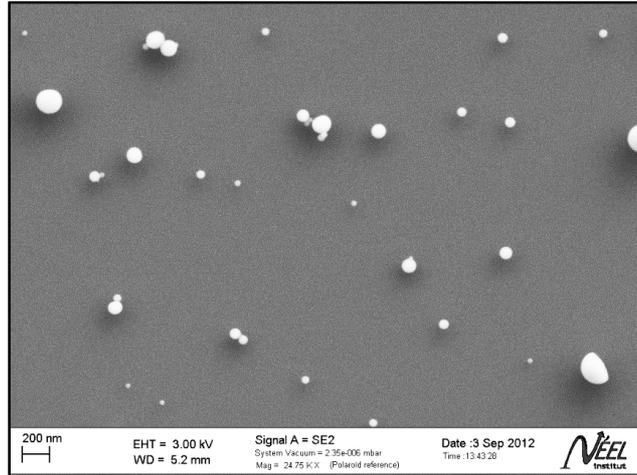


Figure 19: Observation par MEB des nanoparticules "blanches" sphériques et séparées. Matrice 8TMOS/1C₃O₄ avec $s = 500$. Conditions de synthèse : four à 156°C, filtre à 120°C, pression d'azote 1 bar, débit d'air comprimé 1,5 L/h.

2.5. Rendement de synthèse des nanoparticules

Le rendement de synthèse des nanoparticules est défini par la masse de NPs récoltées divisée par la masse de silicates introduits dans le sol nébulisé. Le rendement obtenu pour les deux types de sol (S_{TMSE} et S_{C3O4}) est compris entre 11 et 30 %. Ce maximum peut être obtenu lorsque les conditions sont relativement bien optimisées et sur un volume de sol de départ d'environ 300 mL. Pour des petits volumes de sols, 60 mL, le rendement baisse en raison des pertes au moment de la récolte des NPs. Ces rendements sont relativement faibles soit à cause de pertes lors de la récolte des NPs dans le filtre, soit à cause d'un dépôt des précurseurs sur les parois du réacteur. Ce problème de dépôt des NPs en cours de formation provient du régime de séchage des gouttelettes sous flux laminaire car les vitesses linéaires des NPs sont très faibles au niveau des parois dans ce cas. De nouvelles modifications du réacteur devront donc être envisagées, soit au niveau de la récolte des NPs (utilisation de filtres, débits optimisés), soit en réduisant le diamètre du four tubulaire afin de travailler sous régime de flux intermédiaire, entre flux laminaire et turbulent qui lui est à proscrire pour limiter les collisions entre particules.

2.6. Taille des nanoparticules en fonction de la matrice et du taux de solvant

L'analyse des clichés obtenus en MEB pour différentes nanoparticules "blanches" permet de mesurer la taille des particules à la sortie du réacteur. Sur chaque lot de nanoparticules, une analyse statistique de la taille d'au minimum cent particules a été effectuée afin d'obtenir la

taille moyenne des particules obtenues. Celles-ci sont représentées dans la Figure 20a pour une dizaine de lots de NPs par type de matrice. Ainsi, la taille moyenne des nanoparticules obtenues avec une matrice 2TMOS-1TMSE (diamètre moyen = 70 nm) est légèrement inférieure à celle obtenue avec la matrice 8TMOS-1C₃O₄ (diamètre moyen = 80 nm).

Une diminution de la taille moyenne des nanoparticules peut être obtenue en augmentant le taux de solvant *s*. En effet une augmentation du taux de solvant a pour conséquence de diminuer la quantité de matière dans chaque gouttelette nébulisée. L'augmentation du taux de solvant de 500 à 750 permet d'obtenir des nanoparticules de diamètre moyen d'environ 40 nm pour une matrice 2TMOS-1TMSE et d'environ 50 nm pour une matrice 8TMOS-1C₃O₄ (Figure 20 a). La répartition de taille, représentée ici pour une synthèse avec la matrice 2TMOS-1TMSE à *s* = 750 (Figure 20b) montre que 90% des NPs ont un diamètre inférieur à 100 nm, ce qui est l'objectif de cette thèse.

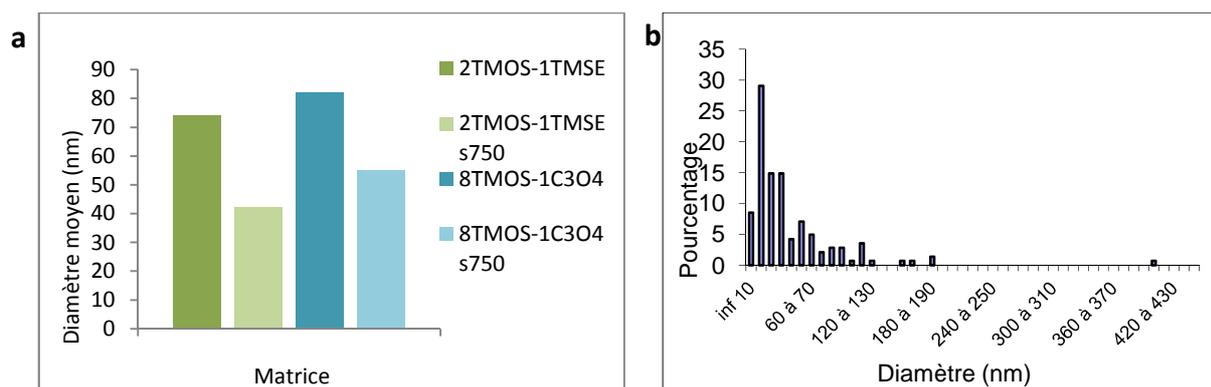


Figure 20: Diamètre moyen des nanoparticules "blanches" : a) Moyenne du diamètre mesuré sur clichés MEB avec la matrice 2TMOS-1TMSE et 8TMOS-1C₃O₄ ; b) Distribution de taille mesurée pour la matrice 2TMOS-1TMSE à *s* = 750.

3. Fluorophore organique utilisé pour l'élaboration de cœur-coquilles

A partir des paramètres chimiques de préparation des sols et des paramètres physiques du réacteur définis sur les particules "blanches", j'ai préparé des nanoparticules cœur-coquille par incorporation, dans le sol avant nébulisation, d'une quantité définie d'un fluorophore présentant des propriétés de fluorescence à l'état cristallin.

3.1. Fluorophore de référence, le CMONS

Nous avons choisi comme fluorophore de référence pour cette étude le 1-cyano-1-(4-nitrophenyl)-2-(4-méthoxyphényl)éthane (Figure 22) nommé CMONS dans ce manuscrit

(pour Cyano-MethOxy-Nitro-Stilbène). Ce fluorophore est fortement luminescent uniquement à l'état cristallin et possède, sous certaines formes polymorphiques, de bonnes propriétés de génération de seconde harmonique (Brasselet et al. 2004), il possède une température de fusion de 165°C, supérieure aux températures du four utilisées, présente une stabilité chimique et photochimique importante et est facilement synthétisable au laboratoire (synthèse en une étape à partir de produits commerciaux).

3.1.1. Synthèse du CMONS

Le CMONS est synthétisé et purifié au laboratoire. Il est obtenu par une condensation de Knoevenagel (Figure 21) entre le 4-méthoxybenzaldéhyde (Sigma) et le 4-nitrophenylacetonitrile (Sigma) dans la pyridine en présence de pipéridine (catalyseur).

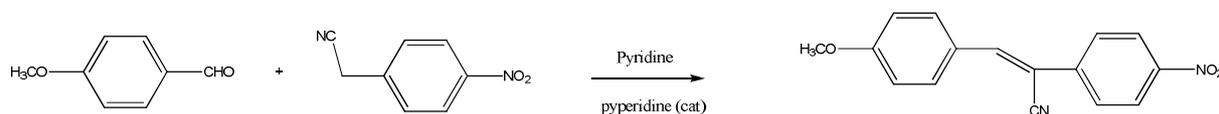


Figure 21: Obtention de CMONS par réaction de Knoevenagel. La pyridine est utilisée comme solvant, et la pipéridine comme catalyseur.

Dans un ballon, 1,392 g de 4-méthoxybenzaldehyde (10,22 mmol) sont dissous dans 100 mL de pyridine. Sous agitation 1,658 g de 4-nitrophenylacetonitrile (10,22 mmol, 1eq) et 5 gouttes de 50 µL de pipéridine (catalyseur) sont additionnés. Le milieu réactionnel est porté à reflux à 120 °C pendant une nuit. Après refroidissement du milieu réactionnel, de l'eau est additionnée au milieu et le produit est extrait par le dichlorométhane. On élimine ensuite l'eau des phases organiques recueillies par du sulfate de magnésium anhydre. Une attention particulière a été portée à la purification du CMONS car la moindre impureté peut avoir un impact important sur les propriétés de fluorescence de la molécule à l'état cristallin. Le CMONS a donc été purifié en 3 étapes : une première recristallisation dans l'acide acétique éliminant une grande partie des impuretés. Ensuite le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant dichlorométhane : cyclohexane 8 : 2) et enfin recristallisé une dernière fois dans le toluène. Le rendement de synthèse après cette série de purification varie entre 55 et 70 % en fonction des expériences réalisées. La composition et pureté du produit final ont été caractérisées par RMN (spectre en Annexe J).

3.1.2. Rappel sur le polymorphisme du CMONS

Cette molécule organique possède plusieurs polymorphes, chacun possédant des propriétés spectroscopiques spécifiques (Tableau 3, (Oliver et al. 1990; Sanz et al. 2001; Vrcelj et al. 2002)). Le polymorphe du CMONS dépend des conditions de cristallisation comme la nature du solvant de cristallisation, la température, et le niveau de sursaturation de la solution (proche ou très éloigné de l'équilibre à saturation). Afin d'étudier les effets couplés de la nucléation confinée et de la nature de la matrice silicatée sur le polymorphisme des nanocristaux de CMONS obtenus dans les différents systèmes cœur-coquille, les nanoparticules ont été caractérisées par microscopie électronique en transmission, spectroscopie d'absorption et de fluorescence et génération de seconde harmonique (SHG, formation de nouveaux photons avec le double de l'énergie des photons initiaux).

	Form I	Form II	Form III
Crystallographic system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /n	Cc	Cc
a (Å)	3.814(1)	4.6002(7)	3.859(1)
b (Å)	12.371(3)	31.947(4)	30.971(5)
c (Å)	28.132(5)	9.511(1)	11.346(2)
β (°)	91.50(2)	92.81(1)	91.17(2)
V (Å ³)	1327.1(6)	1396.1(3)	1355.7(4)
Absorption onset (nm)	503	524	493
Maximum fluorescence emission (nm)	557	596	539
SHG	No	Weak	Strong

Tableau 3: Rappel des paramètres structuraux et des caractéristiques optiques à l'état solide des 3 polymorphes identifiés lors de travaux antérieurs par cristallisation en solution et fusion (Sanz et al. 2001; Vrcelj et al. 2002).

Le CMONS présente trois polymorphes principaux. La forme (I), de couleur jaune très intense, présente une structure cristalline centrosymétrique avec le groupe d'espace P2₁/n, qui est thermodynamiquement le polymorphe le plus stable. Il est obtenu avec les solvants toluène ou DMF sous très faible état de sursaturation entraînant une nucléation et croissance lentes. D'autre part, les polymorphes (II) et (III), qui sont de couleurs jaune pâle et orange respectivement, présentent des structures cristallines non-centrosymétriques avec le groupe spatial Cc et sont donc potentiellement actifs pour la SHG. Ces différentes formes présentent donc des propriétés optiques différentes comme un décalage du maximum

d'absorption (d'où les changements de couleurs des poudres), mais aussi la présence ou non d'un signal SHG ainsi que des positions de bandes de fluorescence différentes (Sanz et al. 2001; Vrcelj et al. 2002) comme nous le verrons aussi plus loin pour les nanocristaux.

4. Synthèse de nanoparticules cœur-coquille hybrides avec le CMONS

4.1. Solubilité du CMONS

La solubilité des fluorophores étant un paramètre essentiel pour la synthèse de NPs cœur-coquille par notre méthode, il est important de mesurer celle du CMONS dans le THF. Pour cela, j'ai procédé de la manière suivante : 50 mg de CMONS sont dissouts dans 10 mL de THF dans un bain thermostaté (Figure 22a). Peu à peu, des petites quantités de CMONS sont ajoutées dans le milieu jusqu'à parvenir à la limite de saturation à laquelle il cristallise. Cette mesure a été reproduite à plusieurs températures afin d'obtenir une courbe de solubilité du CMONS dans le THF en fonction de la température. La solubilité du CMONS dans le THF a été déterminée à $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ à 25 °C (Figure 22b). Cette solubilité permet de dissoudre une quantité élevée de CMONS dans le sol afin d'obtenir des nanoparticules très brillantes car possédant un cœur organique cristallin important de diamètre de plusieurs dizaines de nm et sensiblement supérieur à l'épaisseur de la coquille silicatée.

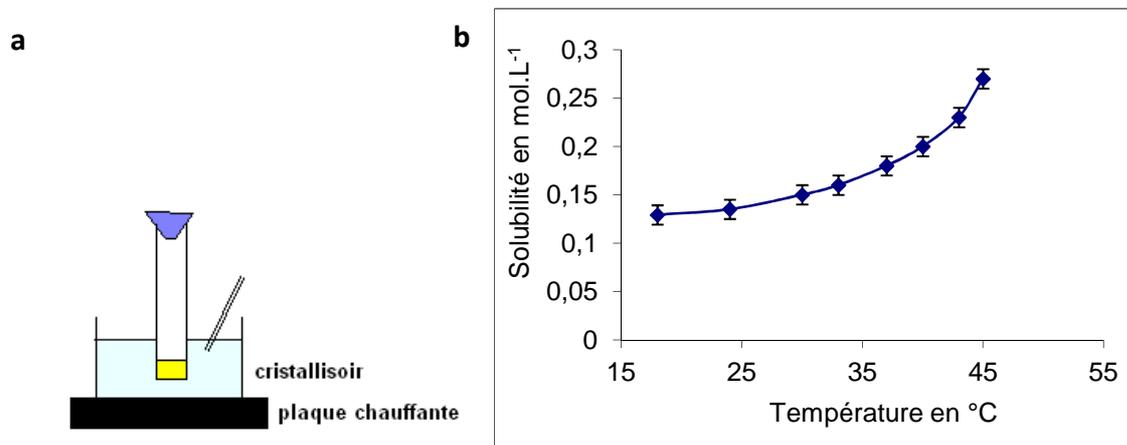


Figure 22: Solubilité du CMONS dans le THF en fonction de la température.

4.2. Rappel des paramètres de synthèse des NPs cœur-coquille

Pour synthétiser les nanoparticules cœur-coquille, des sols sont préalablement préparés dans les conditions décrites en début de ce chapitre avec un taux de solvant $s = 500$ et un taux d'hydrolyse $h = 1$. Le CMONS est dissout dans le sol juste avant son introduction dans le réacteur. Le four horizontal du réacteur est chauffé à 156 °C et le filtre

électrostatique à 120 °C. La pression en azote est de 1 bar et le débit de gaz vecteur est fixé à 1,5 L.h⁻¹. On récolte, en fin de synthèse, des nanoparticules jaunes sur le filtre électrostatique (Figure 23).

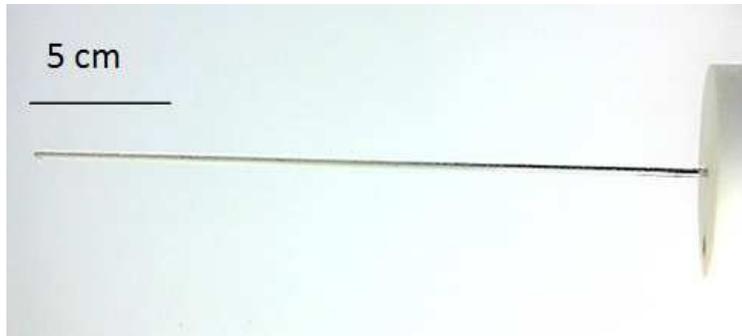


Figure 23: Nanoparticules de CMONS encapsulées récoltées sur le filtre électrostatique.

Le ratio entre la concentration molaire de fluorophore introduit dans le sol et la concentration molaire en atomes de Si introduit dans le sol sera appelé le taux de fluorophore d . Différentes valeurs de d ont été testées afin d'optimiser l'élaboration des nanoparticules de façon à ne pas avoir de fluorophore organique cristallisé en dehors des coquilles (Figure 24a). Ce taux de fluorophore maximal est appelé d_{max} . Le d_{max} pour le CMONS dans les matrices 2TMOS-1TMSE ($d_{max} = 0.086$) et 8TMOS-1C₃O₄ ($d_{max} = 0.088$) a été déterminé par analyse systématique des clichés MEB des nanoparticules obtenues pour différents d utilisés. Cette valeur de d_{max} permet une encapsulation complète du chromophore comme le montre la Figure 24b, correspondant à des nanoparticules cœur-coquille 8TMOS-1C₃O₄ pour un $d = 0,88$.

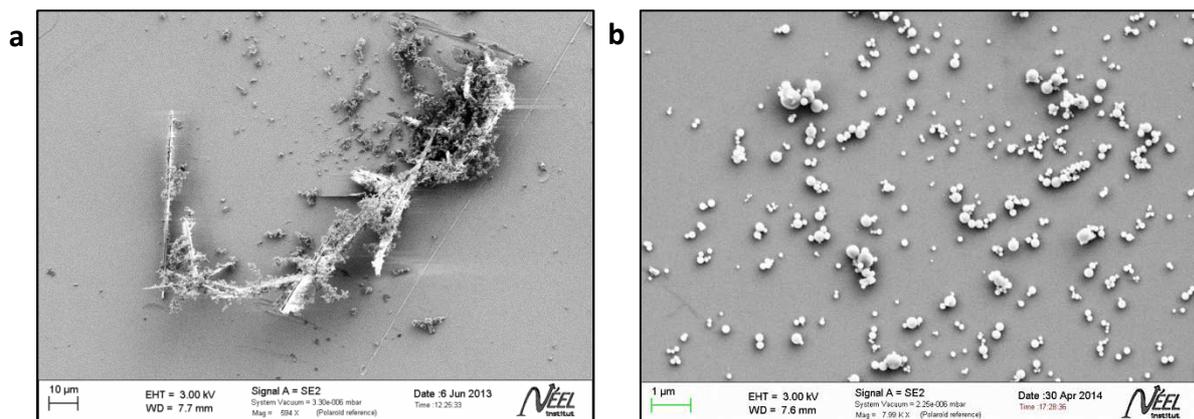


Figure 24: Nanoparticules contenant du CMONS. Matrice 8TMOS-1C₃O₄ avec $s = 500$. Conditions de synthèse : four à 156 °C, filtre à 120 °C, azote 1 bar, air comprimé 1 bar. Images MEB des NPs obtenues : (a) $d = 0,9$ trop important, présence d'aiguilles ; (b) $d = d_{max} = 0,88$ donnant de belles particules avec un bon confinement de la phase organique.

4.3. Taille des nanoparticules cœur-coquille en fonction de la matrice

Comme pour les nanoparticules "blanches" (cf. 2.4), la taille moyenne des NPs cœur-coquille obtenues en sortie de réacteur est déterminée par une analyse statistique des tailles des NPs sur la base des clichés MEB. Les tailles moyennes pour une dizaine de synthèses par type de matrice sont représentées dans la Figure 25. Pour ces NPs contenant du CMONS, les tailles sont semblables à celles des NPs "blanches". De plus, j'ai confirmé que la taille est plus faible pour un taux de solvant $s = 750$ que pour $s = 500$ (histogrammes vert pâle et bleu pâle, Figure 25a) ainsi que l'observation que la matrice 2TMOS-1TMSE permet d'obtenir des NPs plus petites (diamètre moyen d'environ 70 nm pour un $s = 500$) que 8TMOS-1C₃O₄ (diamètre moyen d'environ 100 nm pour $s = 500$). La mesure de la distribution de taille, représentée ici pour 2TMOS-1TMSE à $s = 750$ (Figure 25b), montre que 85 % des NPs ont un diamètre inférieur à 100 nm.

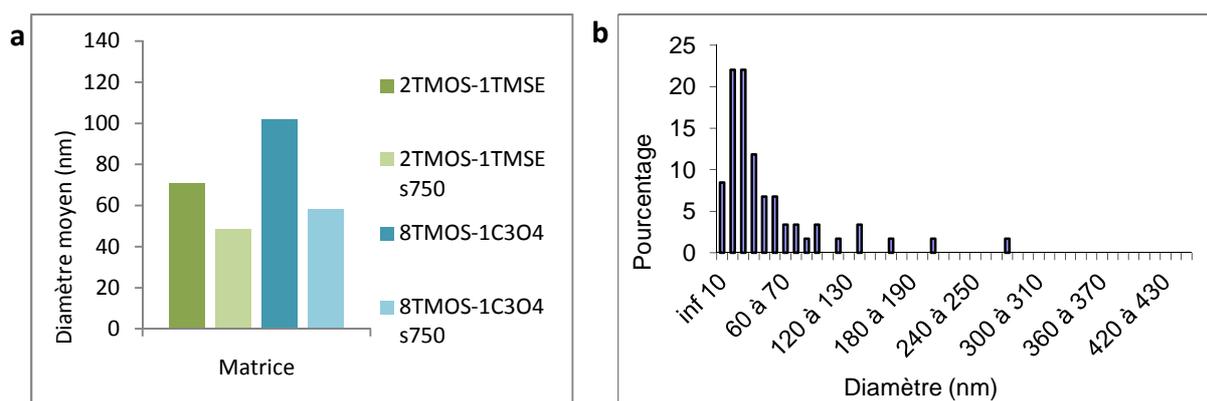


Figure 25: Taille des nanoparticules cœur-coquille avec CMONS. (a) Moyenne des diamètres pour les différentes matrices. (b) Distribution de taille mesurée pour la matrice 2TMOS-1TMSE à $s = 750$.

4.4. Dispersion colloïdale des nanoparticules

Les nanoparticules présentes sur le filtre électrostatique sont récupérées à l'aide d'eau déionisée. Pour disperser colloïdalement les particules (cf. Chap III), pour 1 mL de solution de NPs, 10 μ L de NaOH (1 M) sont additionnés et la solution est placée dans un bain d'ultrasons pendant 10 minutes et ensuite laissée sous agitation lente à température ambiante pendant 48 h. Ce traitement en solution basique permet de désagréger les particules par une dissolution légère de la coquille silicatée et permet de charger négativement les particules via la création de groupements Si-O⁽⁻⁾ en surface. Après deux jours, la solution devient limpide. Cette suspension colloïdale stable est ensuite traitée afin d'éliminer les particules les plus grosses. Pour cela, la suspension est centrifugée à

7000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 5 minutes afin d'éliminer d'éventuels agrégats encore présents dans la solution. Ensuite, la solution est filtrée successivement à 5 μm , 1.2 μm , et 0.8 μm pour éliminer les plus grosses particules. Enfin, la solution est neutralisée à un pH compris entre 7 et 8 à l'aide d'une solution d'HCl (1 M) sous contrôle d'un pH-mètre.

4.5. Caractérisation des nanoparticules cœur-coquille

Dans cette partie, sont présentées les caractérisations réalisées sur les nanoparticules cœur-coquille avec du CMONS : Mesure du rayon hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière, mesure du potentiel zêta et caractérisation du cœur organique cristallin : taille du cœur par rapport à la taille de la particule, cristallinité du cœur organique et enfin la spectroscopie des particules obtenues (absorption, fluorescence).

4.5.1. Rayon hydrodynamique des nanoparticules cœur-coquille

Les suspensions colloïdales obtenues après traitement en solution basique et filtration sont caractérisées par la méthode de Diffusion Dynamique de la lumière (DLS, annexe A) et par zétamétrie (mesure du potentiel zêta, annexe B) à l'aide d'un Zêtasizer NANO-ZS (Malvern instrument). La taille moyenne des particules obtenues en DLS avec les deux matrices (80 nm pour matrice 8TMOS-1C₃O₄ avec $s = 500$; 60 nm pour matrice 2TMOS-1TMSE avec $s = 500$) indique une bonne dispersion des nanoparticules dans le milieu (Figure 26). La taille moyenne obtenue en DLS est légèrement inférieure à la taille moyenne mesurée en MEB en raison de la légère dissolution de la coquille engendrée par le traitement en solution basique ainsi que des filtrations successives éliminant les plus grosses particules. Les échantillons obtenus sont, comme attendu par cette méthode, polydispersés autour de ce diamètre moyen.

Ces mesures confirment d'une part qu'un taux de solvant plus élevé permet d'obtenir des NPs plus petites, et d'autre part que la matrice 8TMOS-1C₃O₄ entraîne la formation de NPs légèrement plus grandes que la matrice 2TMOS-1TMSE.

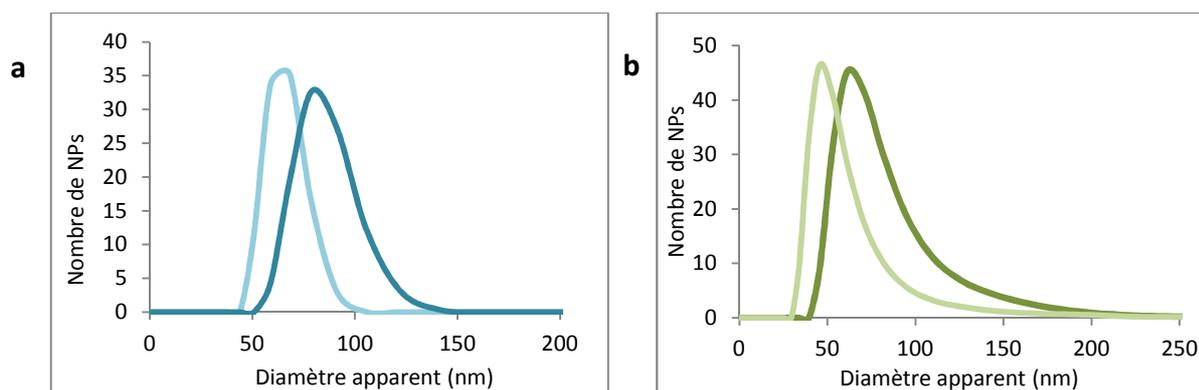


Figure 26: Diamètre apparent des NPs contenant le CMONS obtenu par DLS (courbes foncées avec $s = 500$ et courbes pâles avec $s = 750$). Matrice (a) 8TMOS-1C₃O₄ et (b) 2TMOS-1TMSE.

4.5.2. Charge de surface des NPs cœur-coquille

Le potentiel zêta des NPs cœur-coquille est mesuré sur le même appareillage que la DLS. Il est d'environ -35 mV (Figure 27) pour les deux matrices. Cette valeur de potentiel zêta montre une forte présence de charges SiO⁻ en surface des nanoparticules, suite au traitement en solution basique, et aide ainsi à dissocier les NPs et les stabiliser colloïdalement.

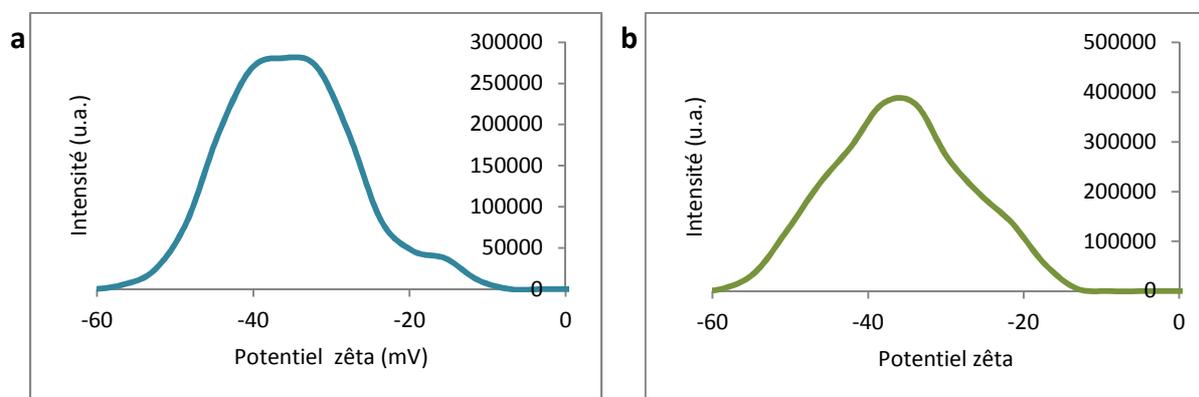


Figure 27: Potentiel zêta de NPs (a) CMONS-8TMOS-1C₃O₄ et (b) CMONS-2TMOS-1TMSE.

4.6. Caractérisation du cœur organique

4.6.1. Mise en évidence du cœur organique

Afin de mettre en évidence le cœur organique, les NPs ont été mises en présence de soude à 0.1 M pendant deux semaines. Il avait été montré lors de la thèse de Cécile Philippot (Philippot 2010) que ce traitement permet de mettre à nu le cœur des NPs (dissolutions sélective de la matrice silicatée). Le cœur est constitué d'un cristal pouvant être facetté dans le cas des plus grosses nanoparticules obtenues (Figure 28a). Pour comparer la taille des NPs

avant et après dissolution de la coquille, des mesures de DLS sur des NPs 8TMOS-1C₃O₄ contenant du CMONS ont été réalisées. Ces mesures en DLS (Figure 28b) montrent qu'une nanoparticule de 80 nm de diamètre apparent possède un cœur cristallin organique d'environ 60 nm de diamètre apparent (environ 75 % du diamètre de la particule).

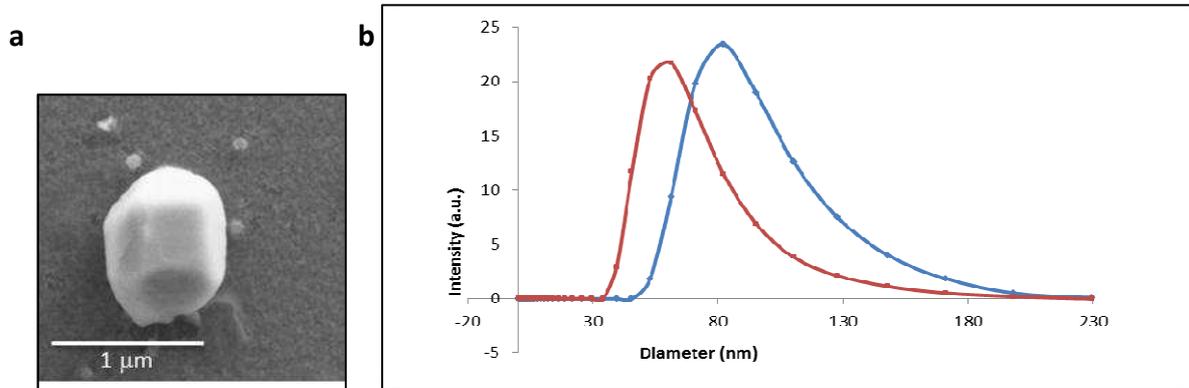


Figure 28: Caractérisation du cœur cristallin nu. (a) Observation en MEB d'un nanocrystal après dissolution de la coquille. (b) Distribution de taille en DLS NPs cœur coquille S_{C₃O₄} (courbe bleue) et nanocristaux de CMONS correspondants obtenus après dissolution totale de coquilles silicatées en solution avec NaOH (courbe rouge).

4.6.2. Polymorphisme du CMONS nanocristallisé en coquilles silicatées

4.6.2.1. Caractérisations spectroscopiques des nanoparticules cœur-coquille

La Figure 29 reprend les spectres d'absorption et de fluorescence normalisés des nanoparticules cœur/coquille. Comme le montre cette figure, le profil spectral en absorption et en fluorescence du CMONS nanocristallisé dans les deux matrices est différent. Un élargissement et un décalage vers le rouge des maximums d'absorption et d'émission sont observés pour les nanoparticules 8TMOS-1C₃O₄ en comparaison avec les profils spectraux obtenus dans le cas de la matrice 2TMOS-1TMSE. Comme mentionné dans la partie introductive de ce chapitre, le CMONS possède différents polymorphes à l'état cristallin possédant des caractéristiques spectroscopiques différentes. Il semblerait donc que la matrice silicatée utilisée influence la nucléation et la croissance du CMONS dans la particule et permet, en fonction de la nature chimique de la matrice, de modifier la nature du polymorphe du CMONS. La spectroscopie de fluorescence à deux photons (Figure 29) indique aussi des propriétés spectroscopiques différentes : le CMONS cristallisé dans une matrice 8TMOS-1C₃O₄ présente un signal SHG bien plus important que celui obtenu dans le cas d'une matrice 2TMOS-1TMSE indiquant la présence d'un polymorphe non-centrosymétrique, actif en SHG (forme II ou III) en proportion importante dans ce cas.

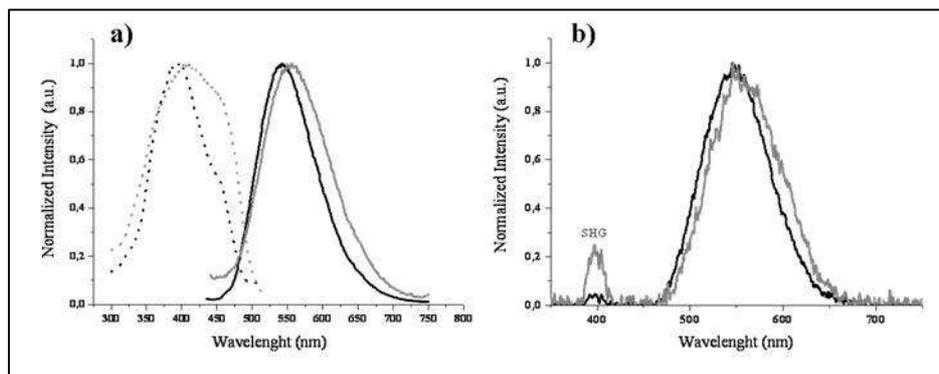


Figure 29: Caractéristiques spectroscopiques des nanoparticules cœur-coquilles de type CMONS : a) spectres d'absorption normalisés (traits pointillés) et de fluorescence normalisés (excitation à 400 nm, traits pleins) pour matrice 2 TMOS-1 TMSE (noir) et matrice 8 TMOS-1 C₃O₄ (gris) b) spectres de fluorescence à 2 photons normalisés (excitation à 800 nm) pour matrice 2 TMOS-1 TMSE (noir) et matrice 8 TMOS-1 C₃O₄ (gris).

Afin de caractériser les différents polymorphes présents dans les particules, des études complémentaires ont été réalisées en microscopie électronique à transmission en mode diffraction (TEM).

4.6.2.2. Diffraction et caractérisation structurale

La caractérisation du cœur organique cristallin a été réalisée par microscopie électronique en transmission (Philips CM 300) en mode diffraction électronique. Afin d'éviter au maximum l'amorphisation des nanocristaux sous le faisceau, il faut travailler à -173 °C avec un temps d'acquisition des diffractogrammes court (0,25 s).

La forme (I) semble être majoritairement présente dans les nanoparticules en coquille silicatée 2 TMOS-1 TMSE (Figure 30a). Ce résultat est en accord avec les données spectroscopiques indiquant la présence essentiellement de la forme I, centrosymétrique, non active en SHG. En ce qui concerne le CMONS cristallin obtenu dans une matrice 8 TMOS-1 C₃O₄, les diffractogrammes semblent indiquer une coexistence de cristaux de forme (II) et (III) non centrosymétriques (Figure 30b) qui présentent des structures cristallines très proches. Une fois de plus, ceci est en accord avec les données spectroscopiques indiquant la présence de polymorphes non-centrosymétriques (forme II ou forme III), actifs en SHG dans cette matrice.

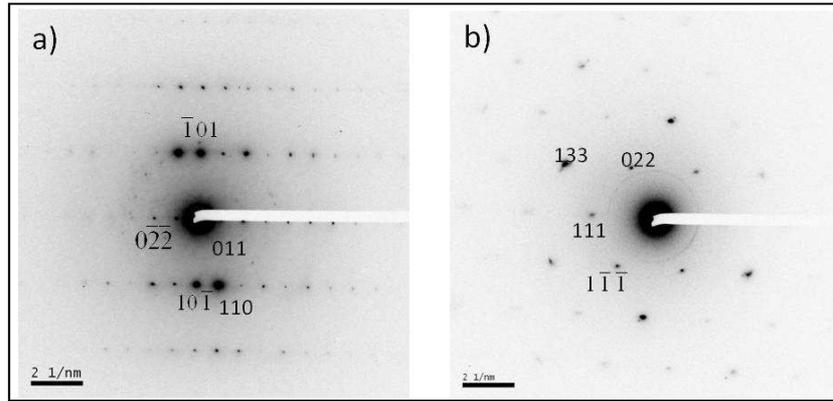


Figure 30: Clichés de diffraction électronique de (a) nanocristaux CMONS en matrice 2TMOS-1TMSE et cristallisé sous la forme I observé le long de l'axe $[\bar{1}\bar{1}\bar{1}]$; (b) Nanocristaux CMONS en matrice 8TMOS-1C₃O₄ cristallisés sous la forme II le long de l'axe $[0\bar{1}\bar{1}]$.

En réalisant une reconstitution d'image des nanocristaux (NCs) en matrice 8TMOS-1C₃O₄ en champs sombre à partir des diffractogrammes, des domaines alternés sont observés (Figure 31b) montrant une transition entre la forme (II) et (III). Ce phénomène de franges avait déjà été vu à l'échelle macroscopique par l'équipe de Sherwood (Vrcelj et al. 2002) sur des cristaux massifs de CMONS réalisés par la méthode Bridgman. Cette transition structurale du polymorphe (III) vers la forme (II) est due aux contraintes structurales exercées par les forces capillaires en fin de séchage des coquilles silicatées (Philipot et al. 2013). Un parallèle peut ainsi être établi entre la croissance de cristaux macroscopiques et la croissance de nanocristaux en coquille silicatée. Dans la matrice 8TMOS-1C₃O₄, le CMONS est donc présent sous les trois formes polymorphiques, mais avec une prédominance des formes II et III par rapport à la matrice 2TMOS-1TMSE, pour laquelle la forme I est favorisée. Ces conclusions structurales (TEM) sont en accord avec les données spectroscopiques.

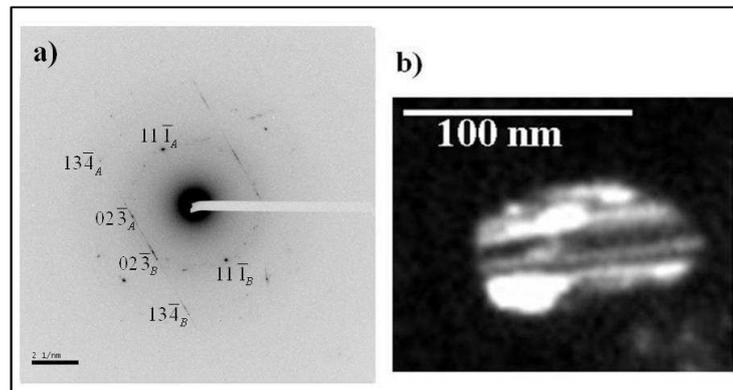


Figure 31: (a) Cliché de diffraction électronique enregistré sur des NCs de CMONS en matrice S_{C3O4}, cristallisé sous la forme (III) $[\bar{1}\bar{3}\bar{2}]$; (b) image correspondante TEM en mode champ sombre des NCs de CMONS.

Enfin, l'imagerie de polarisation (SHG) et de la microscopie de fluorescence à 2 photons (TPEF) sur NCs grandis dans la matrice 2TMOS-1TMSE et 8TMOS-1C₃O₄ montre que toutes les particules sont efficaces à la fois pour la SHG et TPEF (Figure 32). Ces expériences ont permis de confirmer qu'un faible signal SHG est aussi observé avec la matrice 2TMOS-1TMSE, mais en raison certainement d'une contribution de surface de NPs (Philippot et al. 2013). Par contre, le signal SHG bien plus important pour 8TMOS-1C₃O₄ pour laquelle on retrouve une signature des structures non centro-symétriques (II) ou (III).

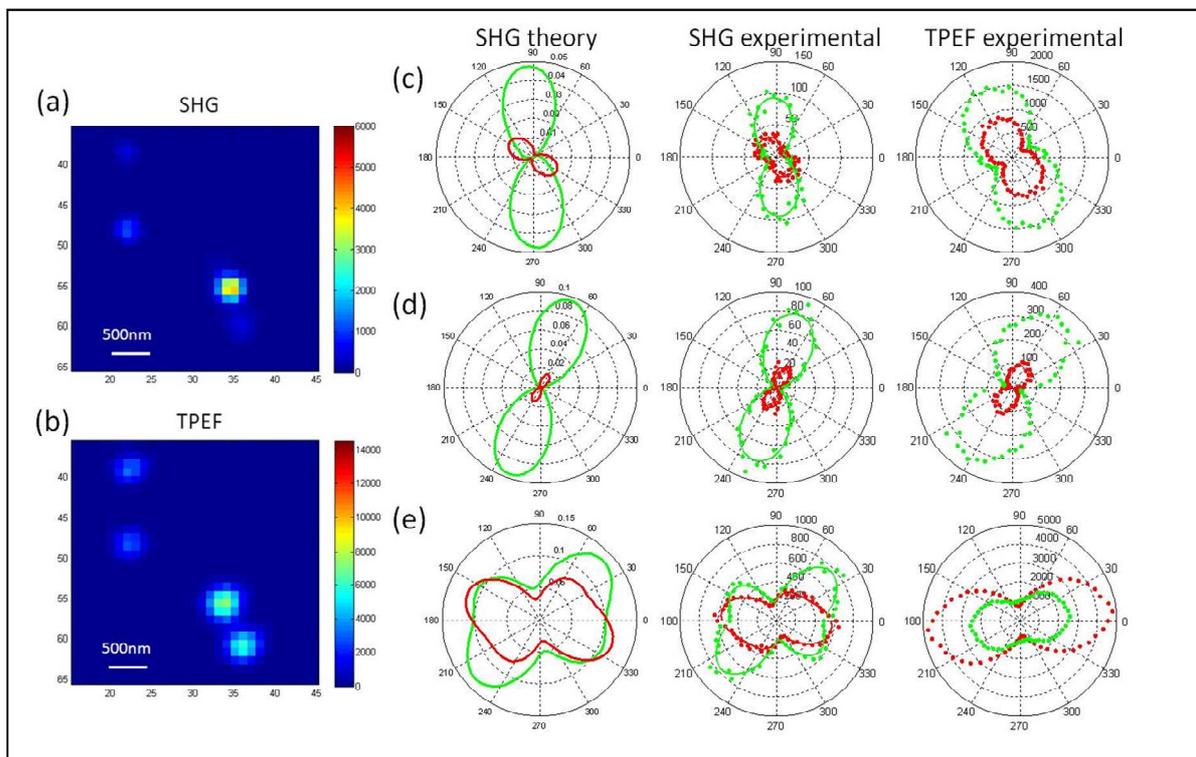


Figure 32: (a) image SHG et (b) image TPEF de NPs en matrice S_{C3O4}. L'échelle d'intensité est l'intensité totale sommée sur les 32 angles incidents de polarisation. (c-e) Réponses SHG and TPEF analysées dans les directions X horizontale (rouge) et Y verticale (vert). Les réponses à une polarisation incidente variant de 0° à 180° avec 32 étapes dans le plan de l'échantillon sont représentées comme graphes polaires. Gauche: ajustement SHG théorique. Milieu: SHG expérimentaux (marques) superposé avec une ligne continue obtenue par une transformation de Fourier. Droite: TPEF expérimentale (marques). La réponse complète 0-360° est reconstruite par symétrie centrale. Les graphes de gauche sont obtenus selon les paramètres suivants: (c) forme (II), angles d'Euler ($\theta = 0^\circ$; $\phi = 30^\circ$; $\psi = 0^\circ$); (d) forme (III), angles d'Euler ($\theta = 30^\circ$; $\phi = -15^\circ$; $\psi = 0^\circ$); (e): addition d'une forme (III) ($\theta = 70^\circ$; $\phi = -50^\circ$; $\psi = 0^\circ$) et forme (II) ($\theta = 40^\circ$; $\phi = 40^\circ$; $\psi = 0^\circ$). (Cécile Philippot et al., 2013).

4.6.2.3. Influence de la température sur la nanocristallisation

Pour continuer à comprendre l'influence des conditions de synthèse sur le polymorphisme des NCs de CMONS, j'ai tenté de déterminer l'effet de la température du filtre électrostatique. L'absorption a été mesurée sur des nanoparticules en solution avec les matrices 2TMOS-1TMSE et 8TMOS-1C₃O₄ obtenues sur un filtre chauffé à différentes températures : 110 °C et 140 °C. Dans le cas des deux matrices, on observe un spectre d'absorption moins élargi, lorsque les NPs sont récoltées à 110 °C que ce qui avait été observé pour une récolte à 140 °C. Une largeur du spectre ainsi qu'une double contribution de deux formes très visible dans le cas de la matrice 8TMOS-1C₃O₄ avaient été expliqués auparavant par la présence de deux polymorphes du CMONS : (I) + (II) pour 2TMOS-1TMSE et (III) + (II) pour 8TMOS-1C₃O₄. Il semblerait que le fait de récolter les NPs à 110 °C permette d'éviter en partie la transition de forme vers le polymorphe (II) et ainsi de diminuer sa présence dans la composition finale : soit on favorise à 110 °C la forme I pour 2TMOS-1TMSE et la forme III pour 8TMOS-1C₃O₄.

4.6.2.4. Détermination de l'influence de la température par microscopie électronique à transmission

En microscopie électronique à transmission en mode diffraction (Annexe D), nous avons en collaboration avec Stéphanie Kodjikian, microscopiste au laboratoire, également caractérisé les nanoparticules afin de comparer les formes de CMONS obtenues après récolte à 110 °C et 140 °C. Pour ces expériences, j'ai entièrement dissout la coquille des NPs afin d'éviter la diffusion des électrons par la coquille. La difficulté de cette caractérisation réside principalement dans la sensibilité de l'échantillon. Le cristal organique est très sensible au faisceau d'électrons. Il faut donc d'une part travailler avec un porte-échantillon refroidi à l'azote à -173 °C, d'autre part travailler avec un faisceau de faible intensité pour analyser l'échantillon. Nous avons sondé les échantillons en mode diffraction et enregistré les clichés lorsque l'on apercevait une forme cristalline isolée. La deuxième difficulté de cette expérience est donc de préparer une concentration de nanoparticules sur la grille adaptée : assez faible de façon à avoir des nanoparticules isolées, mais assez élevée pour pouvoir trouver des NPs sur la grille en scannant l'échantillon.

Des essais supplémentaires ont été menés au SIMAP à Grenoble sur un microscope JEOL 3010 avec une sonde de 20 nm. La manip permet d'une part de scanner une certaine zone de l'échantillon automatiquement, d'autre part de déterminer les polymorphes correspondants aux clichés observés à l'aide d'un logiciel d'indexation développé par l'équipe d'Edgar Rauch (Rauch & Véron 2014). Les paramètres de scan de la zone étaient un pas de 10 nm et une vitesse de 50 captures par seconde. La zone scannée est de $1 \mu\text{m}^2$. Après de nombreux essais infructueux où nous avons observé à de nombreuses reprises des particules amorphes, nous avons enfin aperçu un cliché de diffraction qui apparaissait sous le faisceau. Nous avons alors changé de stratégie et le faisceau a été placé sur une particule pour enregistrer l'évolution de la diffraction avec le temps. Nous avons réalisé sur une grosse particule une séquence d'images en compilant des scans temporels (faisceau fixe sur un point) et géographiques (balayage de la zone par le faisceau). Le constat est celui d'une évolution de la structure sous le faisceau, puisque quelle que soit la zone, on voyait des points de diffraction apparaître au fur et à mesure (Figure 33a). De plus, il semble y avoir un endommagement de la partie irradiée (Figure 33b). Ces observations sembleraient mettre en évidence que les nanocristaux se sont auparavant amorphisés lors de la dissolution de la coquille. Pour de futures observations en microscopie électronique en transmission, il faudra donc travailler à nouveau sur des NPs cœur-coquille ou seulement partiellement dissoutes.

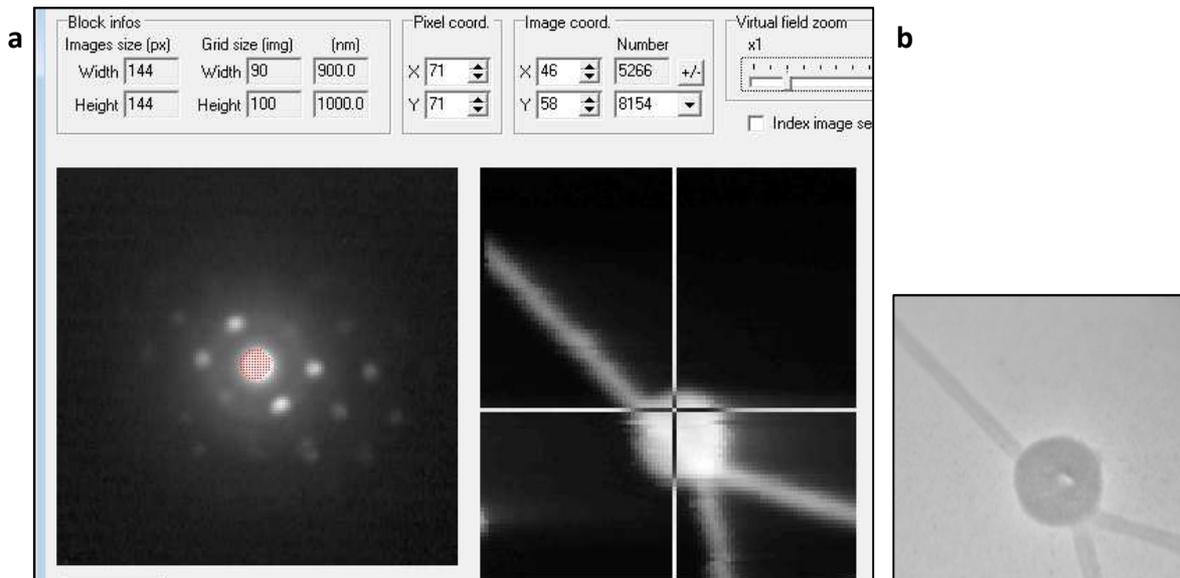


Figure 33 : (a) Images de diffraction TEM obtenues sur des NCs en matrice 8TMOS- $1\text{C}_3\text{O}_4$ récoltées à 110°C et image en champs sombre reconstituée. (b) Image reconstituée de la zone après irradiation.

4.6.2.5. Caractérisation par diffraction rayons X

Une analyse des NPs a aussi été réalisée par diffraction rayons X afin de mettre en évidence le caractère cristallin du cœur de CMONS dans les nanoparticules. Les spectres des trois formes du CMONS ont été au préalable simulés (Annexe G) afin de pouvoir les comparer par la suite aux résultats obtenus. Ici aussi, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de NPs obtenues à partir de la matrice 8TMOS-1C₃O₄. Des premières mesures de diffraction aux rayons X de ces NPS obtenues à 110° C et 140° C ont été réalisées par simple dépôt sur scotch avec un appareil de diffraction 2θ (Annexe G). Le signal était très faible en raison de la présence de la coquille de silice. La présence d'un bruit de fond important n'a pas permis de discriminer le polymorphe de CMONS. Afin d'obtenir un signal plus important, nous sommes donc passés à une autre méthode en introduisant les poudres de NPs dans un capillaire de diamètre 0,5 mm. Ces mesures ont été réalisées avec un diffractomètre Kappa CCD muni d'une source argent (Annexe G). Le temps d'acquisition était de 8 h. Cette méthode a permis d'obtenir (pour la première fois pour ces nanocristaux moléculaires) un signal assez intense pour que l'on puisse comparer les diffractogrammes obtenus pour les nanoparticules avec les diffractogrammes simulés des différents polymorphes du CMONS.

Pour les échantillons de NCs en matrice 8TMOS-1C₃O₄ récoltés à 110° C et 140° C, nous avons pu ainsi obtenir un diffractogramme typique du CMONS cristallin. Pour différencier correctement les pics de diffraction correspondant au CMONS nanocristallisé de ceux de la silice, nous avons aussi caractérisé une poudre de NPs "blanches" récoltées à 110° C. On remarque, en analysant la position des pics de diffraction, que la forme (I) est présente dans les poudres de NPs de CMONS qu'elles soient récoltées à 110° C ou 140° C (Figure 34). La superposition avec une simulation du polymorphe (I) confirme bien que cette forme est majoritairement présente dans les poudres de nanoparticules, forme la plus stable thermodynamiquement. Ces observations correspondent aux images TEM qui montraient cette forme sur de nombreux clichés.

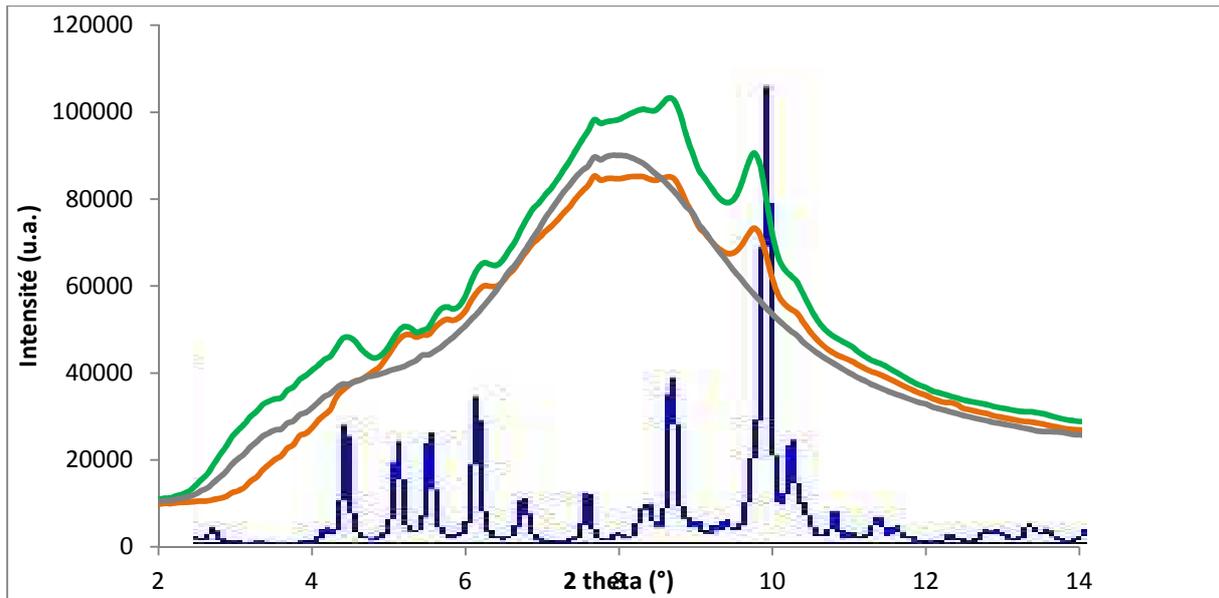


Figure 34: Diffraction par rayon X de NPs de CMONS en matrice SC_3O_4 . NPs récoltées sur un filtre à 110 °C (courbe verte) et 140 °C (courbe orange), ainsi que NPs "blanches" récoltées à 110 °C (courbe grise). Les courbes sont superposées avec une simulation de la forme (I) (courbe bleue).

4.7. Conclusion sur les nanoparticules cœur-coquille hybrides avec le CMONS

Des nanoparticules cœur organiques de CMONS cristallin - coquille silicatée ont été obtenues avec succès pour deux types de sol (S_{TMSE} et $S_{C_3O_4}$). Un taux de chargement important de CMONS, en raison de sa grande solubilité dans le THF, permet d'obtenir des nanoparticules très brillantes car le cristal organique occupe un volume de l'ordre de 75 % du volume total de la particule. Un traitement aqueux basique des particules permet l'obtention de suspensions colloïdales stables qui ont été caractérisées par DLS et zétamétrie. Des analyses spectroscopiques et structurales indiquent une influence de la composition de la matrice silicatée sur la composition polymorphique du CMONS dans la particule. Ceci a pour conséquence l'obtention de nanoparticules actives en SHG lors de l'utilisation d'une matrice 8TMOS-1 C_3O_4 . Concernant l'influence de la température du filtre sur le polymorphisme, nous avons observé en spectroscopie que la récolte à 110 °C favoriserait contrairement à 140 °C la forme (I) pour 2TMOS-1TMSE et la forme (III) pour 8TMOS-1 C_3O_4 en évitant dans les deux cas une transition partielle vers la forme (II). Néanmoins, les résultats de diffraction par rayons X montrent que pour la matrice 8TMOS-1 C_3O_4 , la forme majoritairement présente dans l'échantillon est la forme (I) pour les deux températures.

5. Synthèse de nanoparticules contenant des fluorophores émettant dans le rouge – proche infrarouge

Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit lors d'une imagerie par fluorescence *in vivo*, il est important de disposer de fluorophores émettant dans la fenêtre biologique (cf. Chapitre I). Dans ce cadre, nous avons initié une collaboration avec l'ENS de Lyon (Y. Bretonnière et C. Andraud, Lab de Chimie de l'ENS) afin de disposer d'une série de molécules fluorescentes dans l'état cristallin, émettant dans le rouge ou le proche infrarouge et répondant aux critères d'utilisation de notre réacteur de synthèse (solubilité dans le THF, température de fusion supérieure à la température de séchage requise par la géométrie du four horizontal). Ce travail a été réalisé par Gwenaëlle Eucat en thèse en co-tutelle avec l'ENS Lyon.

5.1. Ingénierie de nouveaux fluorophores

Gwenaëlle Eucat a réalisé une ingénierie moléculaire pour obtenir de nouveaux fluorophores avec de bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons et une émission intense dans le rouge ou proche infrarouge (IR) à l'état solide (Eucat 2014). Plusieurs paramètres ont guidé cette ingénierie : une bonne solubilité dans le THF facilitant l'encapsulation dans les nanoparticules organosilicatées, ainsi qu'un point de fusion supérieur à 160 °C afin d'éviter toute vaporisation et/ou dégradation dans le four de séchage. Plusieurs familles de chromophores ont ainsi été développées : des dérivés benzothiazoles, nitrophényls, et carbazoles. Les principaux chromophores sélectionnés à l'issue de cette ingénierie moléculaire réalisée à l'ENS-Lyon sont listés ci-dessous (Tableau 4). Les résultats de synthèses de nanoparticules cœur-coquille avec ces chromophores seront détaillés ensuite.

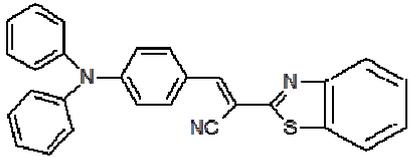
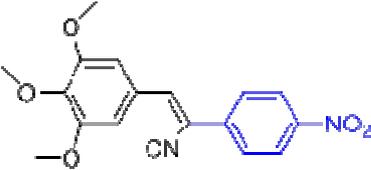
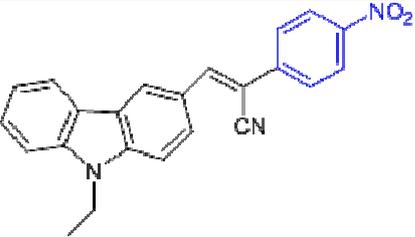
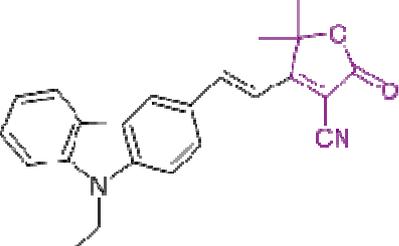
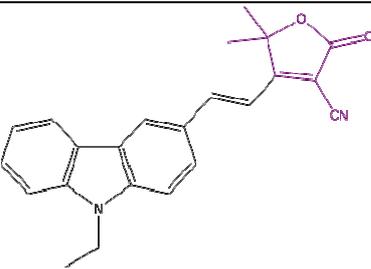
Composé	Température de fusion	Solubilité dans le THF à 25°C	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde max d'émission
 GE1	173 °C	$1,5 \cdot 10^{-1} \text{M}$	450 nm	640 nm
 GE13	161 °C	$0,9 \cdot 10^{-2} \text{M}$	530 nm	605 nm
 GE27	244 °C	$9 \cdot 10^{-3} \text{M}$	530 nm	605 nm
 GE28	203 °C	$8 \cdot 10^{-3} \text{M}$	515 nm	585 nm
 GE32	250 °C	$3 \cdot 10^{-2} \text{M}$	540 nm	600 nm

Tableau 4: Fluorophores sélectionnés à partir de l'ingénierie de G. Eucat et leurs caractéristiques.

5.2. Optimisation des paramètres de synthèse avec les nouveaux fluorophores

Toutes les synthèses des nanoparticules décrites dans cette partie ont été réalisées avec la matrice 8TMOS-1C₃O₄. Les nouveaux chromophores doivent présenter une solubilité dans le THF comparable au CMONS (0.15 mol.L⁻¹ à 25 °C) afin de favoriser un bon confinement du processus de nucléation – croissance du cœur organique au sein de la particule en fin de séchage des gouttelettes conduisant à la formation d'un système cœur coquille sans séparation de phase (ségrégation à l'extérieur des NPs). Pour chaque fluorophore, plusieurs tests de synthèse ont été réalisés afin d'ajuster au mieux le taux de fluorophore maximum (d_{max}) qui peut être correctement encapsulé dans les NPs.

Le fluorophore GE1 a été un cas particulier, car l'encapsulation avec ce fluorophore n'a pas pu être réalisé correctement malgré les ajustements de taux de fluorophore, l'image ci-dessous montrant des NPs obtenues à une température de four et filtre respectivement à 156 °C et 120 °C (Figure 35 a). Nous avons donc eu d'abord dans un premier temps des doutes sur caractère générique de la synthèse avec le réacteur. Des analyses complémentaires (Eucat, 2014) semblent indiquer la formation d'un nouveau type de polymorphe durant le processus confiné de synthèse des nanoparticules par *spray-drying*. Ce nouveau polymorphe (en cours d'analyse) semble posséder une très faible solubilité dans le THF conduisant à une ségrégation de phase ainsi que des propriétés spectroscopiques très décalées par rapport à la signature spectrale obtenue sur poudre cristalline de GE1 initiale (Figure 35). Ce fluorophore a donc été rapidement écarté pour en privilégier d'autres.

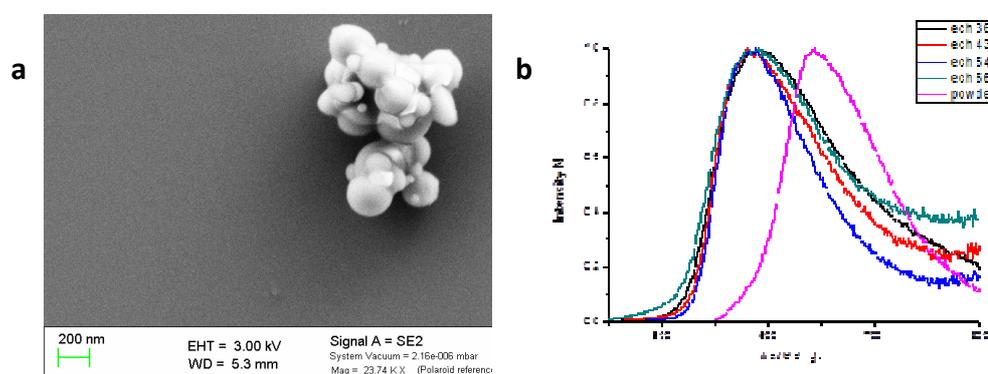
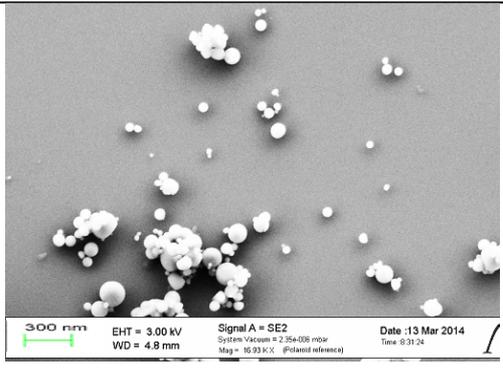
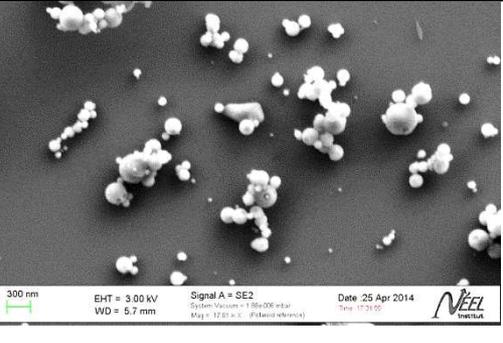


Figure 35: Nanoparticules 8TMOS-1C₃O₄ contenant le GE1. (a) Image MEB montrant des NPs agglomérées. (b) Spectre de fluorescence du composé GE1 sur poudre (courbe rose) et sous forme de NPs (courbes bleue, rouge, verte).

Pour tous les autres fluorophores, le processus de synthèse a confirmé le caractère générique de notre procédé pour des fluorophores relativement solubles car nous avons pu rapidement ajuster les conditions d'élaboration de NPs cœur-coquille. Dans les cas où le fluorophore possède un point de fusion élevé, nous avons pu augmenter la température du four afin de faciliter le séchage des NPs. Ainsi les synthèses avec les fluorophores GE13, GE27, GE28, G32 ont été réalisées avec un four chauffé respectivement à 150 °C, 175 °C, 175 °C et 156 °C. Pour chacun de ces chromophores, le d_{max} a été adapté après plusieurs essais de synthèse, afin d'atteindre le limite maximale possible de fluorophore que l'on peut inclure, de la même façon que décrite pour le CMONS en début de ce chapitre. Le Tableau 5 montre les conditions de synthèse avec les principaux fluorophores retenus, le d_{max} défini, ainsi qu'une image MEB des NPs obtenues.

Composé	Température four/filtre	d_{max}	Images MEB
GE13	150/120 °C	0.045	
GE27	175/120 °C	0.017	

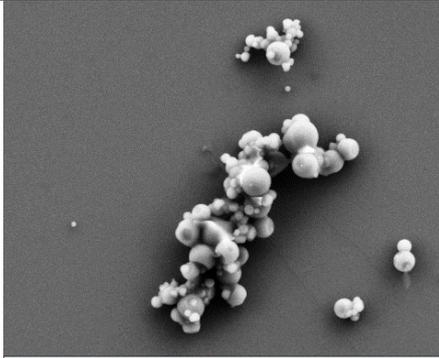
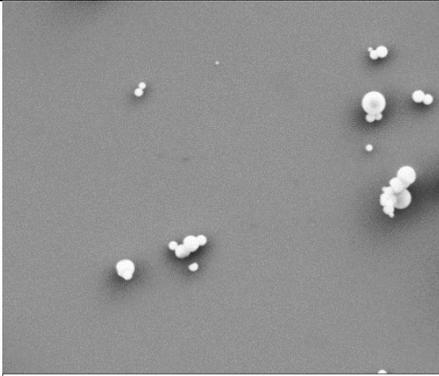
GE28	175/120 °C	0.02	 <p>300 nm EHT = 3.00 kV Signal A = SE2 Date :20 System Vacuum = 2.25e-006 mbar Time: 9:33:37 WD = 5.9 mm Mag = 16.39 K X (Polaroid reference)</p>
GE32	156/120 °C	0.03	 <p>200 nm EHT = 3.00 kV Signal A = SE2 Date :14 Apr System Vacuum = 2.19e-006 mbar Time: 10:31:53 WD = 6.5 mm Mag = 17.86 K X (Polaroid reference)</p>

Tableau 5 : Nanoparticules synthétisées avec les différents fluorophores à partir de la matrice 8TMOS-1C₃O₄ à s = 500

Le d_{\max} obtenus pour chaque fluorophore varie fortement. La valeur de ce d_{\max} semble être directement reliée à la solubilité du chromophore dans le THF. Comme le montre la Figure 36, nous observons une dépendance quasi linéaire entre le d_{\max} obtenu expérimentalement et la solubilité du produit. En effet, plus la solubilité du fluorophore est importante, plus le processus de nucléation et croissance du chromophore dans la gouttelette sera confiné spatialement et temporellement permettant une encapsulation importante de fluorophore dans la particule.

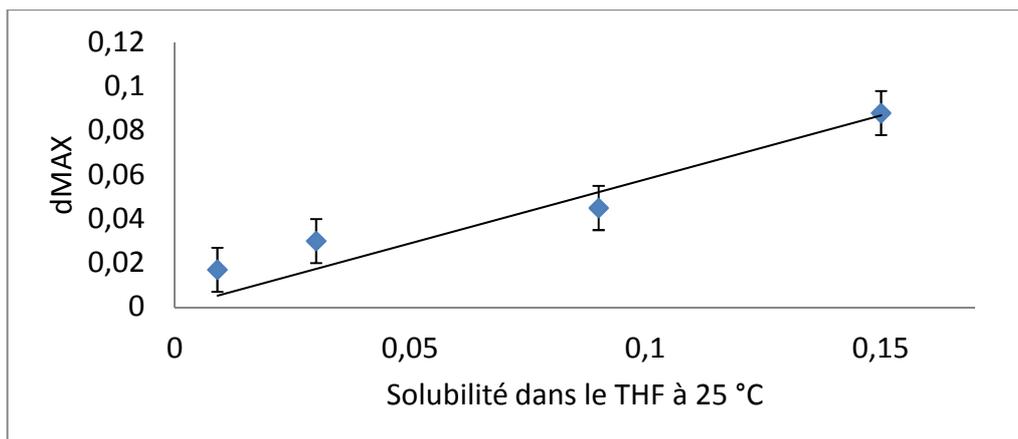


Figure 36 : Dépendance du d_{\max} obtenu pour différents fluorophores en fonction de la solubilité des molécules dans le THF.

Après récolte et dispersion dans l'eau déionisée, ces NPs ont été traitées afin d'obtenir une bonne stabilité colloïdale. Pour 1 mL de suspension de NPs, 10 μL de NaOH (1 M) sont additionnés et la solution est traitée pendant 10 minutes aux ultrasons avant de laisser 48h sous agitation lente. Après centrifugation de la solution à 7000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 5 minutes, elle est filtrée successivement à 5 μm , 1,2 μm , et 0,8 μm puis la suspension colloïdale est neutralisée avec HCl (1 M).

5.3. Spectroscopie des nanoparticules avec les nouveaux fluorophores sélectionnés

L'étude par spectroscopie de fluorescence des nanoparticules obtenues a été réalisée à l'ENS Lyon (thèse Gwenaëlle Eucat). Les spectres d'émission normalisés des composés en poudre microcristallisés, et sous forme de nanocristaux encapsulés confirment que les conditions de cristallisation en température ($T = 150\text{-}175\text{ }^{\circ}\text{C}$) et sous confinement en coquille sol-gel n'affectent pas les propriétés de fluorescence de ces quatre fluorophores (Figure 37 et Figure 38). En effet, pour les quatre composés, le spectre de fluorescence sur poudre est similaire à celui sur nanoparticules encapsulant le fluorophore. Cela montre qu'il n'y a pas de changement de polymorphe. Des caractérisations spectroscopiques plus importantes (rendement quantique de fluorescence, durée de vie, spectroscopie de fluorescence à deux photons) de ces NPs sont développées dans la thèse de Gwenaëlle Eucat.

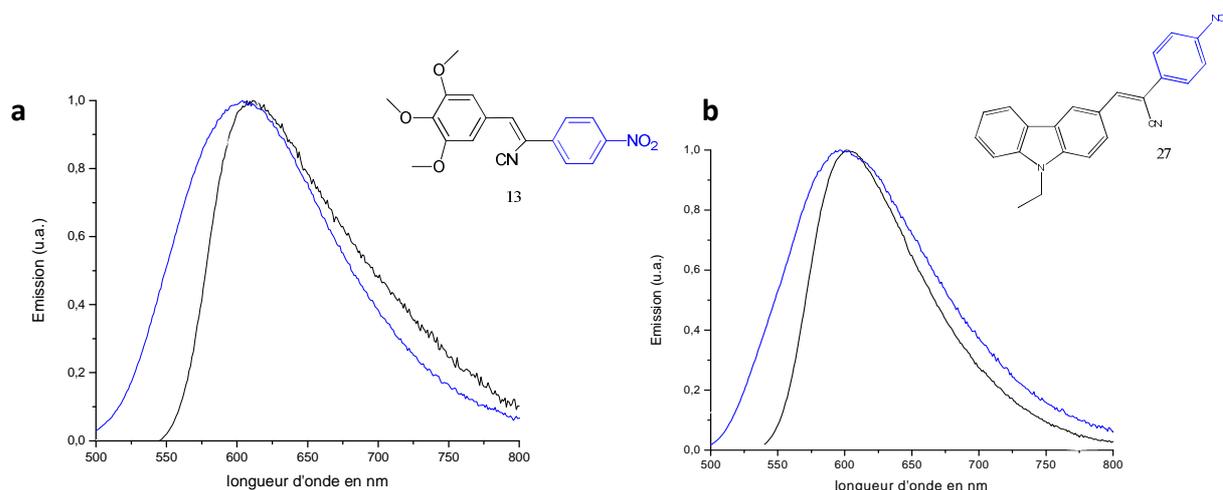


Figure 37: Comparaison des spectres d'émission normalisés sur poudre (noir) et encapsulé dans une matrice silicatée en suspension dans l'eau (bleu) du composé (a) 13 et (b) 27.

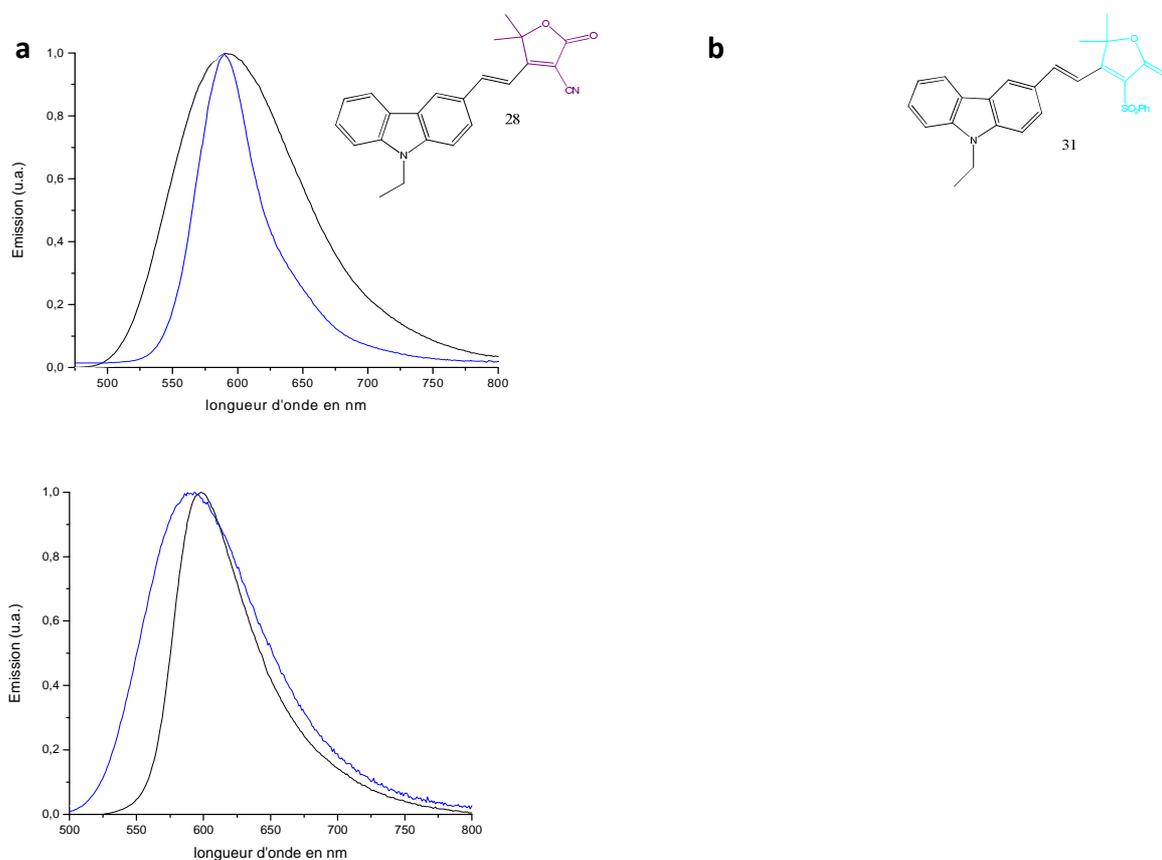


Figure 38: Comparaison des spectres d'émission normalisés sur poudre (noir) et encapsulé dans une matrice silicatée en suspension dans l'eau (bleu) du composé (a) 28 et (b) 32.

5.4. Taille des nanoparticules avec les fluorophores émettant dans le rouge – proche infrarouge

La mesure du diamètre des nanoparticules avec le fluorophore GE32 inséré dans la matrice Sc_{304} a été réalisée. En MEB, on obtient une taille moyenne de NPs de 50 nm. Après dispersion et filtration, une mesure en DLS montre que ces nanoparticules présentent une

distribution de taille autour de 35 nm (Figure 39) ce qui est en accord avec une moyenne de 50 nm avant traitement. Le résultat avec le GE32 est très prometteur en raison d'un d_{max} élevé qui devrait mener à des NPs brillantes. De plus, la taille moyenne de ces NPs autour de 40-50 nm permettra que celles-ci circulent plus facilement *in vivo* (meilleure furtivité). Avec les autres fluorophores, nous avons pu obtenir des NPs de diamètre apparent d'environ 100 nm. On confirme ainsi que la méthode de synthèse est générique et peut être appliquée à la plupart des fluorophores moléculaires, lorsqu'ils sont relativement solubles.

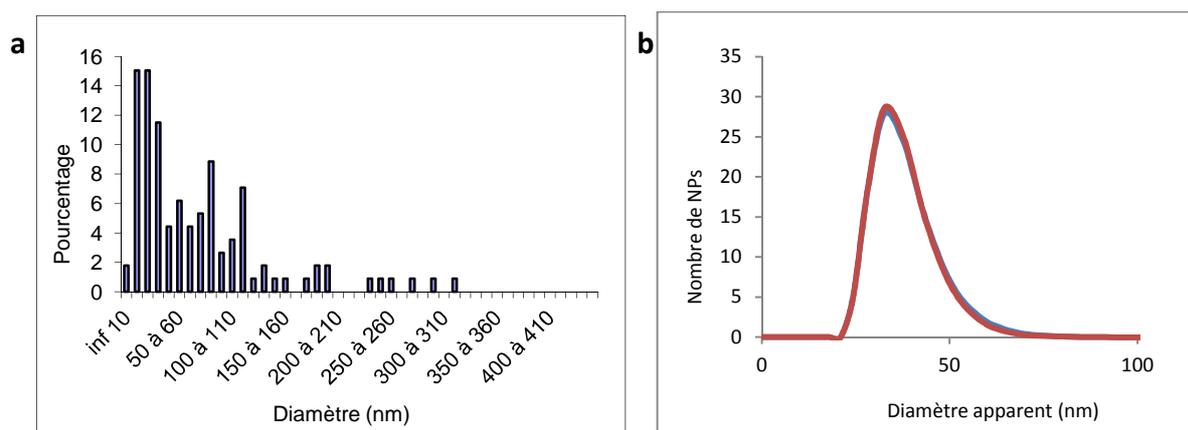


Figure 39: Diamètre obtenu des nanoparticules GE32 - 8TMOS-1C₃O₄ obtenues. (a) Diamètre mesuré à partir d'images MEB avant traitement en solution basique. (b) Diamètre apparent mesuré en DLS après sélection en taille.

6. Conclusion sur la synthèse de nanoparticules

Ce deuxième chapitre a permis de décrire tous les paramètres chimiques et physiques essentiels pour la synthèse des nanoparticules cœur-coquille avec le réacteur *spray drying*. Les caractéristiques du fluorophore de référence ont été précisées afin de comprendre l'influence que peuvent avoir les paramètres chimiques et physiques sur la nanocrystallisation au sein des NPs. Enfin, l'ingénierie de nouveaux fluorophores émettant dans le rouge – proche IR a été introduite ainsi que la mise en œuvre de nanoparticules cœur-coquille avec ces nouveaux fluorophores. Ces résultats confirment clairement le caractère générique de notre procédé d'auto-organisation de nanoparticules hybrides cœur-coquille pour des fluorophores moléculaires relativement solubles dans un solvant compatible avec la chimie sol-gel. Le chapitre suivant permettra de présenter le traitement et la fonctionnalisation de ces NPs en vue d'une stabilisation colloïdale en solution et *in vivo*.

Chapitre III) Porosité et fonctionnalisation des nanoparticules

Le voyage scientifique...

"Dans les sciences, le chemin est plus important que le but.

Les sciences n'ont pas de fin."

Erwin Chargaff

Un des objectifs principaux de ce travail est de rendre les nanoparticules furtives dans le système sanguin des souris car les nombreuses barrières biologiques décrites au Chapitre 1 sont difficiles à passer (Bergman et al. 2008). Il a été démontré de nombreuses fois dans la littérature, que des nanoparticules ne présentant aucune fonctionnalisation en surface peuvent s'agglomérer ou être éliminées rapidement *in vivo* lorsqu'elles sont mises en présence de milieux complexes. Ce phénomène se produit en raison des nombreuses interactions entre les nanoparticules et les protéines (Lynch & Dawson 2008). Pour minimiser ces interactions et augmenter la stabilité colloïdale dans les milieux complexes, de nombreuses stratégies de greffage ont été développées ces dernières années sur un grand nombre de colloïdes (Sharma et al. 2006; Sperling & Parak 2010; Sperling 2008). Dans cette partie, je présenterai dans un premier temps la dispersion des nanoparticules colloïdale et les conditions pouvant influencer leur stabilité colloïdale. Ensuite, je décrirai une étude de la porosité des nanoparticules. La porosité des NPs sera déterminante pour décider des conditions dans lesquelles on peut fonctionnaliser leur surface. Enfin, je présenterai les différentes stratégies envisagées pour fonctionnaliser les nanoparticules cœur organique - coquille silicatée : D'abord, je décrirai les tentatives de post fonctionnalisation par greffage via un greffage d'organosilanes qui s'est avérée très difficile en raison de l'impossibilité de travailler en milieu organique à cause d'une dissolution du cœur cristallin dans ces milieux. Ensuite, je développerai les stratégies prometteuses de co-condensation directe de molécules fonctionnelles par modification de la composition du sol de départ.

1. Dispersion en milieu aqueux et stabilité colloïdale des nanoparticules

1.1. Dispersion des nanoparticules en solution

Afin d'obtenir une suspension stable de nanoparticules, il faut passer par une étape de dispersion dans un milieu fortement alcalin (NaOH à 10^{-2} M, pH = 12) durant 48 h (cf. Chapitre II). Ce traitement permet de dissocier les agrégats de nanoparticules par dissolution partielle de la coquille silicatée par la soude et de charger fortement les particules permettant ainsi l'obtention d'une suspension colloïdale stable. Les solutions sont ensuite centrifugées pendant 5 min afin d'éliminer les plus gros agrégats non dissociés par le traitement basique. Ensuite les solutions de nanoparticules sont filtrées successivement à plusieurs tailles jusqu'à 800 nm pour terminer cette sélection en taille. Enfin, pour stopper

l'attaque de la coquille silicatée par la soude, le pH de la solution est abaissé à pH = 7-8 qui est compatible avec une application biologique.

1.2. Diamètre hydrodynamique des nanoparticules dispersées en suspension colloïdale

Les suspensions colloïdales obtenues sont caractérisées par *Diffusion Dynamique de la Lumière* (DLS, Annexe A). Les diamètres apparents des nanoparticules mesurés en DLS sont de 60 nm pour la matrice 2TMOS-1TMSE (Figure 40a) et de 80 nm pour la matrice 8TMOS-1C₃O₄ (Figure 40b). Ce diamètre apparent semble indiquer l'obtention d'une dispersion de nanoparticules isolées. De plus l'absence de tailles supérieures à 130 nm que l'on mesurait pour certaines NPs sèches à partir des images MEB (cf. Chapitre II), les plus grandes NPs d'un diamètre supérieur à 130 nm ont été correctement éliminées dans ces suspension colloïdales, ce qui montre l'efficacité du traitement basique.

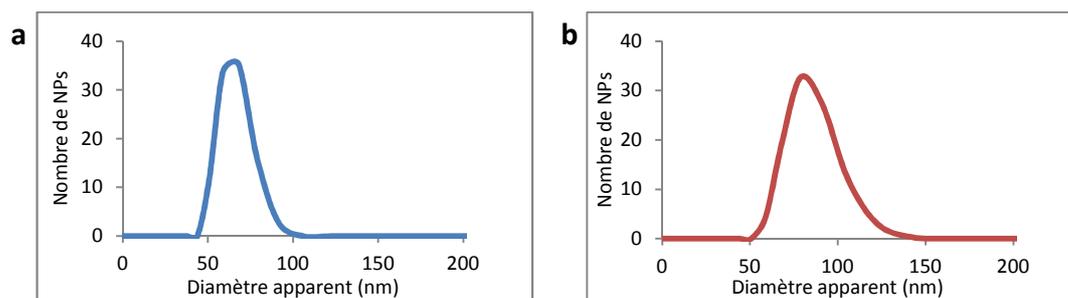


Figure 40: Caractérisation des NPs. Diamètre hydrodynamique de (a) CMONS-S_{TMSE} et de (b) CMONS-S_{C3O4}.

1.3. Charges de surface des nanoparticules dispersées en suspension colloïdale

Les charges de surface des nanoparticules ont été mesurées, par zétamétrie, afin de confirmer que les solutions se trouvent dans un état stable colloïdalement (Annexe B). Plus la valeur absolue du potentiel zêta est grande, plus la charge de surface est importante, ce qui favorise les forces de répulsion et assure la stabilité de la dispersion. On considère que la suspension colloïdale est relativement instable pour un potentiel zêta compris entre -25 et +25 mV. Néanmoins, une stabilité colloïdale peut être aussi obtenue pour un potentiel zêta plus faible grâce à l'encombrement stérique par des molécules en surface. Quelle que soit la nature de la coquille silicatée, 2TMOS-1TMSE et 8TMOS-1C₃O₄, il a été observé que les solutions présentent un potentiel zêta inférieur à -30 mV (Figure 41a-b) ce qui garantit la stabilité colloïdale des particules dans le milieu.

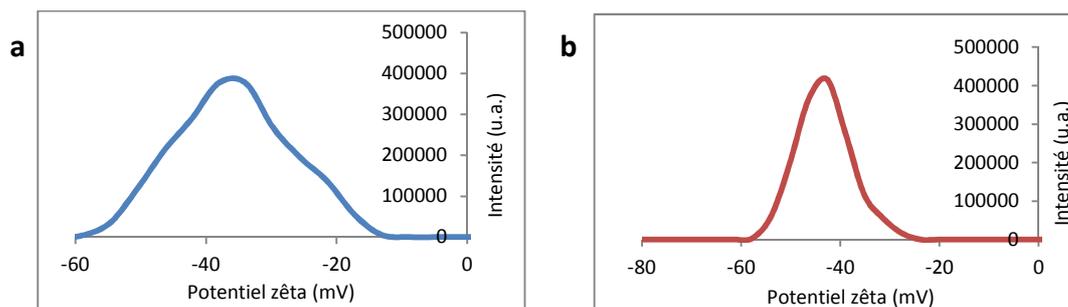


Figure 41: Caractérisation des NPs. Potentiel zêta de (a) CMONS-S_{TMSE} et de (b) CMONS-S_{C304}.

Néanmoins, la forte charge de surface des NPs (-30 mV) peut engendrer des interactions avec les protéines et les parois des vaisseaux sanguins. Des stratégies de fonctionnalisation de la surface doivent donc être entreprises afin de modifier le potentiel de surface des nanoparticules et diminuer les interactions de surface non spécifiques des nanoparticules silicatées pour renforcer la stabilité colloïdale et la furtivité des nanoparticules dans les milieux complexes.

1.4. Influence du taux de solvant et du pH sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules

Comme présenté précédemment, la taille des nanoparticules est a priori bien inférieure lorsque l'on augmente le taux de solvant à $s = 750$. Néanmoins, nous observons des problèmes d'instabilité colloïdale plus importants des suspensions pour les échantillons obtenus dans ces conditions. En mesurant l'évolution du diamètre des NPs ainsi que de leur potentiel zêta en fonction du pH de la solution colloïdale, nous observons que les NPs les plus grandes ($s = 500$) ont un diamètre apparent constant de 80 nm pour un pH allant de 5 à 10 (Figure 42a). Elles sont moins sensibles à la variation de pH que les nanoparticules obtenues à partir de $s = 750$ (Figure 42b). Ce phénomène est probablement dû au fait que les NPs synthétisées avec un taux de solvant plus élevé ont une coquille plus fine. Pour ces petites NPs, le domaine de stabilité observé se situe entre $\text{pH} = 5.5$ et $\text{pH} = 9$. De plus, des mesures de tailles en DLS sur différentes suspensions colloïdales obtenues pour $s = 750$ ont donné des résultats très peu reproductibles avec des tailles très différentes pour chaque échantillon. Le traitement basique utilisé pour obtenir une bonne dispersion de nanoparticules isolées n'est en effet plus adapté à ce type de particules car le pH de la solution est au-delà de leur domaine de stabilité. Ces problèmes de non reproductibilité

n'ont pas été résolus. Nous avons donc décidé de revenir à un taux de solvant $s = 500$ qui donne des particules en général entre 80 et 100 nm après traitement basique.

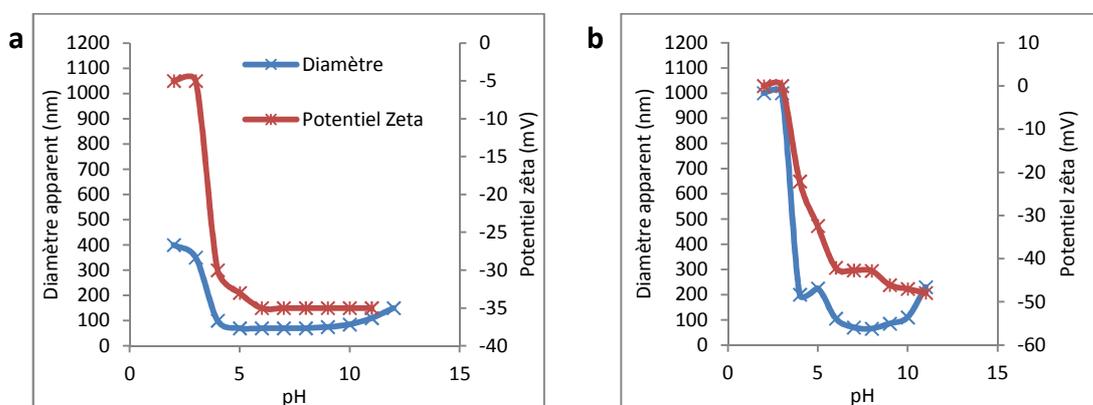


Figure 42: Mesure en parallèle du diamètre apparent des NPs ainsi que de leur potentiel zêta pour des NPs en matrice 8TMOS-1C3O4 avec un taux de solvant de (a) $s = 500$ et (b) $s = 750$.

2. Porosité des nanoparticules

2.1. Porosité des nanoparticules "blanches"

Afin d'envisager une fonctionnalisation des nanoparticules via un greffage d'organosilanes, nous avons, dans un premier temps, vérifié si la coquille silicatée protège le cœur organique du milieu de dispersion. En effet, de manière générale, les réactions de post-fonctionnalisation s'effectuent dans un milieu organique (éthanol, toluène, THF,...) à chaud pouvant entraîner la dissolution du cœur organique si le solvant diffuse dans les particules.

Dans un premier temps, la porosité des particules "blanches" obtenues pour différentes compositions de la matrice, a été sondée par adsorption d'azote à 77 K, et la surface spécifique calculée par la méthode BET (Brunauer-Emmet-Teller, cf. Annexe E). Ces mesures ont été réalisées par Bruno Boury à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier. Le schéma de montage et les détails expérimentaux seront donnés dans l'Annexe E. Dans un premier temps, 400 mg de nanoparticules sèches ont été dégazées à 120 °C pendant au moins 6 h sous vide poussé (10 $\mu\text{m Hg}$), afin d'éliminer toute impureté (eau, solvant) de la surface. Ensuite, le tube contenant l'échantillon a été refroidi dans l'azote liquide, et les isothermes d'adsorption et de désorption ont été obtenus en introduisant des quantités croissantes d'azote gazeux et en mesurant les pressions correspondantes après équilibration du système (Figure 43).

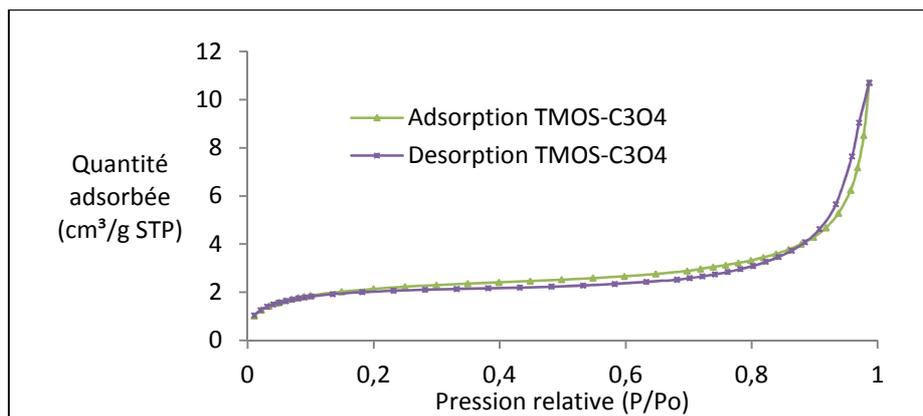


Figure 43: Isotherme d'adsorption et de désorption à 77 K obtenu pour des nanoparticules de matrice 8TMOS-1C₃O₄.

Les surfaces spécifiques obtenues pour les différentes matrices sont très faibles (Tableau 6), les valeurs sont évaluées à $\pm 5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Les nanoparticules "blanches" présentent donc une porosité très faible. L'imprécision de ces très faibles valeurs vient du fait que l'on se situe à la limite de détection. Ces valeurs sont comparables à celles pour les grains de silice présents dans le sable, connus pour ne présenter aucune porosité. Les mesures ont été réalisées sur trois types de matrices : TMOS seul qui présente un réseau fortement interconnecté, 2TMOS-1TMSE contenant le TMSE – un espaceur court et rigide, et 8TMOS-1C₃O₄ contenant le C₃O₄ qui est un espaceur long et flexible. Pour chaque matrice, la mesure a été réalisée deux fois de suite. A l'incertitude près, on trouve les mêmes surfaces spécifiques pour ces trois types de matrices, il ne semble donc pas y avoir d'effet lié à l'espaceur. Cependant, à la température d'analyse (77 K), les chaînes organiques contenues dans les organosilanes sont rigides et peuvent donc bloquer des micropores, alors qu'elles pourraient être un peu mobiles en suspension à température ambiante. Il est donc nécessaire de vérifier par d'autres méthodes la présence ou non de pores dans les nanoparticules formées.

	Surface spécifique en m^2/g ($\pm 5 \text{ m}^2/\text{g}$)
Matrice TMOS	8
	9
Matrice 2TMOS-1TMSE	10
	9
Matrice 8TMOS-1C3O4	7
	8

Tableau 6: Surfaces spécifiques calculées par la méthode BET sur les poudres de nanoparticules avec trois matrices différentes. Pour chaque échantillon, la mesure est réalisée deux fois.

2.2. Porosité des nanoparticules cœur-coquille

Le CMONS présentant la caractéristique d'être uniquement fluorescent à l'état cristallin, mais pas à l'état dispersé, nous avons effectué des tests de mise en dispersion des NPs cœur CMONS - coquille silicatée dans différents solvants organiques utilisés pour les réactions de greffage d'organosilanes (éthanol, THF, toluène) afin de vérifier si la coquille silicatée protège le cœur cristallin de CMONS de la dissolution dans le milieu.

2.2.1. Etude de la dissolution du cœur organique par spectroscopie

Nous avons donc réalisé des mesures spectroscopiques (absorbance et fluorescence) sur des NPs cœur CMONS - coquille en solution dans divers solvants afin d'étudier une possible dissolution du cœur cristallin dans les solvants organiques. Pour cela, je rappelle d'abord les propriétés du CMONS en solution et sous forme de NPs cœur-coquille. Comme le montre la Figure 44, le CMONS dissous dans l'éthanol présente une bande d'absorption centrée à 360 nm. Une excitation du CMONS à cette longueur d'onde engendre une très faible fluorescence. La suspension colloïdale de nanoparticules cœur coquille (NP CMONS en matrice S_{C304}) présente un spectre d'absorption élargi avec un maximum décalé centré vers 400 nm. Une excitation à 400 nm de cette suspension colloïdale engendre une fluorescence importante. Ces différences spectroscopiques entre le CMONS en solution et la suspension colloïdale de NPs vont permettre d'étudier l'éventuelle dissolution du cœur CMONS de la nanoparticule par l'éthanol.

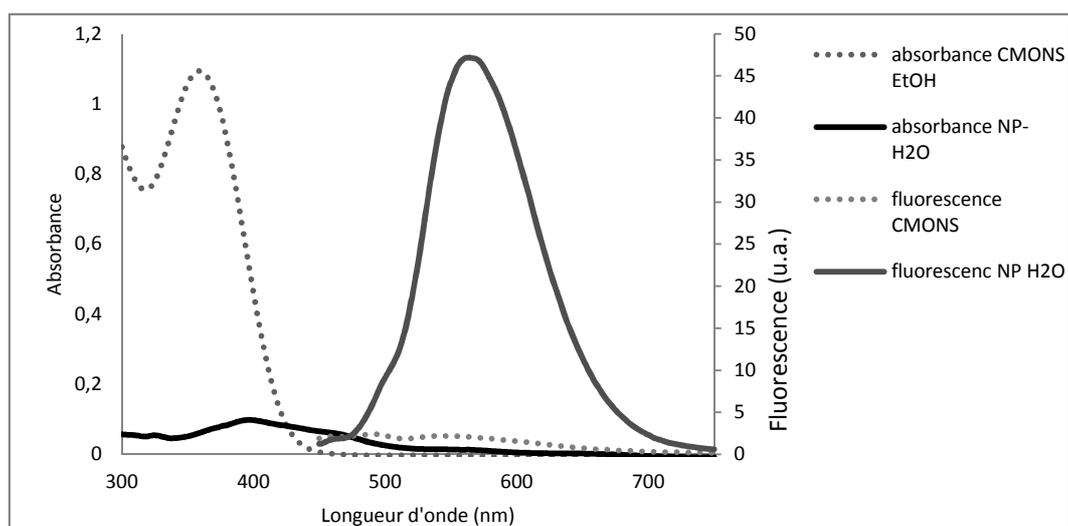


Figure 44: Caractéristique spectroscopique du CMONS dans l'éthanol et d'une suspension colloïdale de NP cœur coquille (CMONS-matrice S_{C304}).

Lorsque l'on disperse les NPs CMONS- S_{C3O4} dans de l'éthanol, on constate une extinction très rapide et quasi totale de la fluorescence des nanoparticules, sans agrégation visible de la suspension colloïdale. Afin de vérifier si cela est provoqué par la dissolution du cœur organique cristallin, une étude spectroscopique en présence de différentes proportions d'éthanol a été effectuée, ici présentées pour une matrice S_{C3O4} .

La suspension aqueuse de NPs CMONS- S_{C3O4} utilisée présente une densité optique à 400 nm de 0,283. Différentes solutions de 3 mL, comportant la même quantité de NPs et un taux croissant d'éthanol ont été préparées et sont reprises dans le Tableau 7:

Nom	Volume NP CMONS en S_{C3O4} (mL)	Volume H ₂ O (mL)	Volume éthanol (mL)
EtOH 0 %	1	2	0
EtOH 16 %	1	1,5	0,5
EtOH 33 %	1	1	1
EtOH 50 %	1	0,5	1,5
EtOH 66 %	1	0	2

Tableau 7 : Différents volumes d'éthanol ajouté dans la solution de NPs pour les tests de dissolution du cœur CMONS.

Les solutions préparées sont agitées lentement pendant 1 h à l'aide d'un agitateur magnétique avant d'effectuer les analyses spectroscopiques. La Figure 45 présente les spectres d'absorption de ces cinq solutions après une heure d'agitation ainsi que le spectre d'absorption du CMONS dans l'éthanol. Nous remarquons clairement que la présence d'éthanol modifie le profil spectral d'absorption des solutions. Les spectres obtenus pour des proportions égales ou supérieures à 50 % d'éthanol correspondent au spectre du CMONS en solution dans l'éthanol. Une proportion plus faible de 33 % d'éthanol semble correspondre à un mélange de CMONS cristallin et de CMONS dissous. Le cœur organique cristallin des NPs se dissout donc en présence d'éthanol.

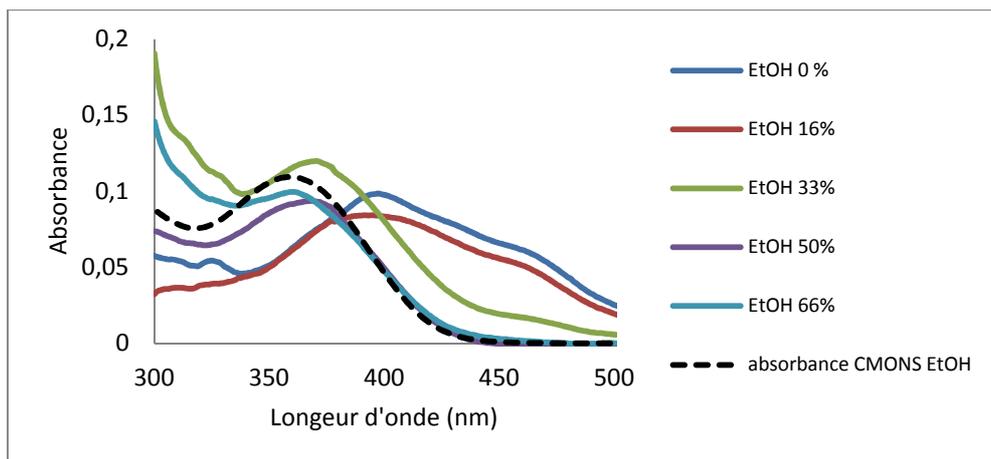


Figure 45: Spectre d'absorption des différentes solutions préparées.

Le CMONS en solution ne fluoresçant pas, la fluorescence des solutions devrait logiquement diminuer en fonction du taux d'éthanol présent. Afin de vérifier cela, les spectres de fluorescence des solutions ont été mesurés dans les mêmes conditions pour chaque solution : longueur d'onde d'excitation = 400 nm, tension du PM = 450 V, bande passante en excitation et en émission = 10 nm. Les résultats sont repris dans la Figure 46.

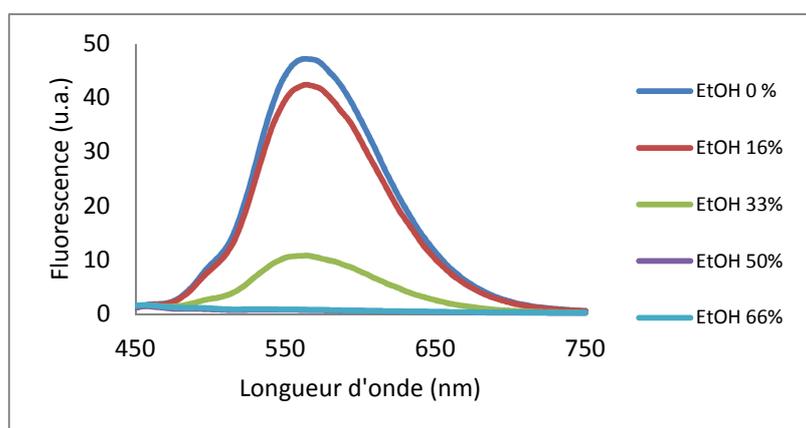


Figure 46 : Spectre de fluorescence des différentes solutions (excitation à 400 nm, tension du PM = 450 V).

Les résultats obtenus confirment les observations données par les spectres d'absorption. La présence d'une faible concentration en éthanol (16 %, 33 %) provoque une diminution de la fluorescence de la suspension colloïdale indiquant une dissolution partielle du CMONS. La présence d'une quantité plus importante d'éthanol (50 %, 66 %) éteint complètement l'intensité de fluorescence des solutions indiquant la dissolution quasi-totale des cœurs organiques dans ces conditions.

Une dernière vérification de la présence de CMONS dissous dans les solutions a été effectuée. Une centrifugation (7000 tr.min^{-1} , 30 min) des solutions a été réalisée. Dans ces

conditions de centrifugation, les NPs sédimentent et se collent aux parois, le CMONS libre reste en solution. Une première observation sous lampe UV (365 nm) des tubes Eppendorf après centrifugation montre en effet la présence de NPs fluorescentes sur les parois pour les solutions contenant 0 %, 16 % et 33 % d'éthanol. Aucune fluorescence n'a été observée pour les autres solutions centrifugées (solution à 50 % et 66 %). Cela indique bien l'absence de NPs cœur-coquille fluorescentes. Du CMONS libre dissout devrait donc se trouver dans le surnageant. Afin de vérifier la présence de CMONS libre dans les solutions centrifugées, les spectres d'absorptions des surnageants des solutions centrifugées ont été relevés et les résultats sont repris dans la Figure 47. La solution à 0 % d'éthanol ne présente pratiquement aucune absorption entre 330 et 500 nm indiquant donc bien la sédimentation des NPs après centrifugation sur les parois des tubes Eppendorf. Dans ces conditions, les NPs ont donc bien été enlevées de la solution par centrifugation. Toutes les autres solutions centrifugées présentent bien la signature du CMONS dissout. Cela indique en effet l'influence de la présence de l'éthanol sur la dissolution du cœur organique des NPs CMONS-S_{C304}. De plus, l'augmentation de la concentration en CMONS libre en solution semble proportionnelle à la concentration en éthanol présent.

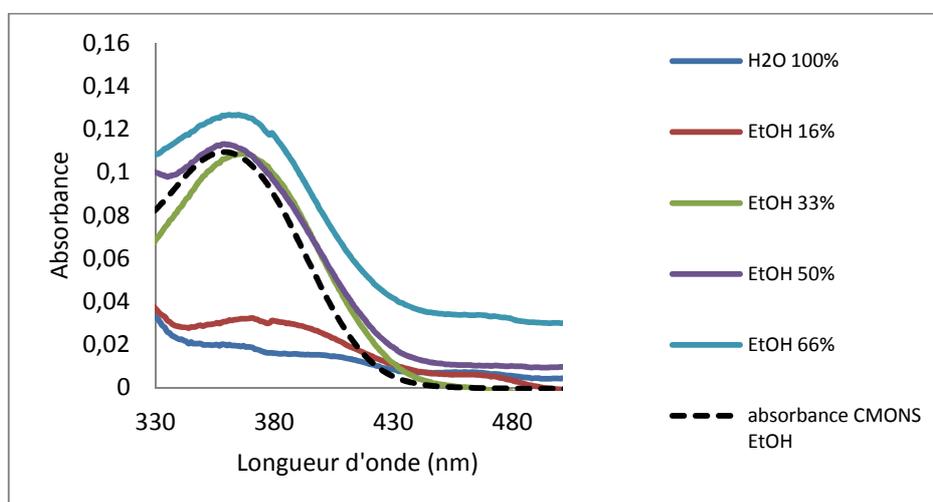


Figure 47 : Spectre d'absorbance des solutions centrifugées (7000 tr.min⁻¹, 30 min).

Pour résumer cette partie sur les tests de dissolution, ces résultats indiquent que le cœur CMONS des NPs est dissout en présence d'éthanol. Les mêmes observations ont été réalisées dans d'autres solvants (toluène, acétone, THF) et le même phénomène est observé avec des nanoparticules de type 2TMOS-1TMSE. Il y a donc certainement une porosité ou bien des microfissures au sein des coquilles des nanoparticules, permettant la diffusion du

solvant. Cette constatation exclut ainsi toute possibilité de fonctionnalisation dans un solvant organique.

3. Obtention de nanoparticules fonctionnelles

L'impossibilité de fonctionnaliser les nanoparticules cœur-coquille dans les milieux organiques nous oblige à développer des stratégies de greffage en milieu aqueux. J'ai ainsi travaillé sur différentes techniques de fonctionnalisation pour améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules dans les milieux complexes et augmenter la furtivité des NPs dans l'organisme (Figure 48).

La voie de fonctionnalisation des nanoparticules silicatées la plus répandue est la réaction de greffage d'organosilicates. Malgré la difficulté engendrée par la nécessité de travailler en milieu aqueux, j'ai testé cette méthode de post-fonctionnalisation afin de greffer des fonctions polyéthylène glycol (PEG) en surface des nanoparticules (Figure 48, Voie 2). Les PEGs sont en effet connus pour leur faible toxicité et la diminution des adsorptions non spécifiques, ce qui augmente ainsi la furtivité des nanoparticules (Qhobosheane et al. 2001). Comme il sera décrit à la suite de ce chapitre, cette post-fonctionnalisation en phase aqueuse est compliquée et peu reproductible. Nous avons donc développé d'autres stratégies : la première est une association électrostatique entre les nanoparticules chargées négativement et un polymère de chitosane chargé positivement. Ensuite une stratégie de co-condensation directe en modifiant la composition des sols de départ a été explorée. L'introduction de précurseurs pégylés (Figure 48, Voie 1), de précurseurs azotures ouvrant la voie à la fonctionnalisation par chimie *click* (Figure 48, Voie 3), ainsi que l'introduction de précurseurs phosphonates a été testée. La majorité des précurseurs silicatés a été fournie par nos collaborateurs de l'Institut Charles Gerhardt à Montpellier.

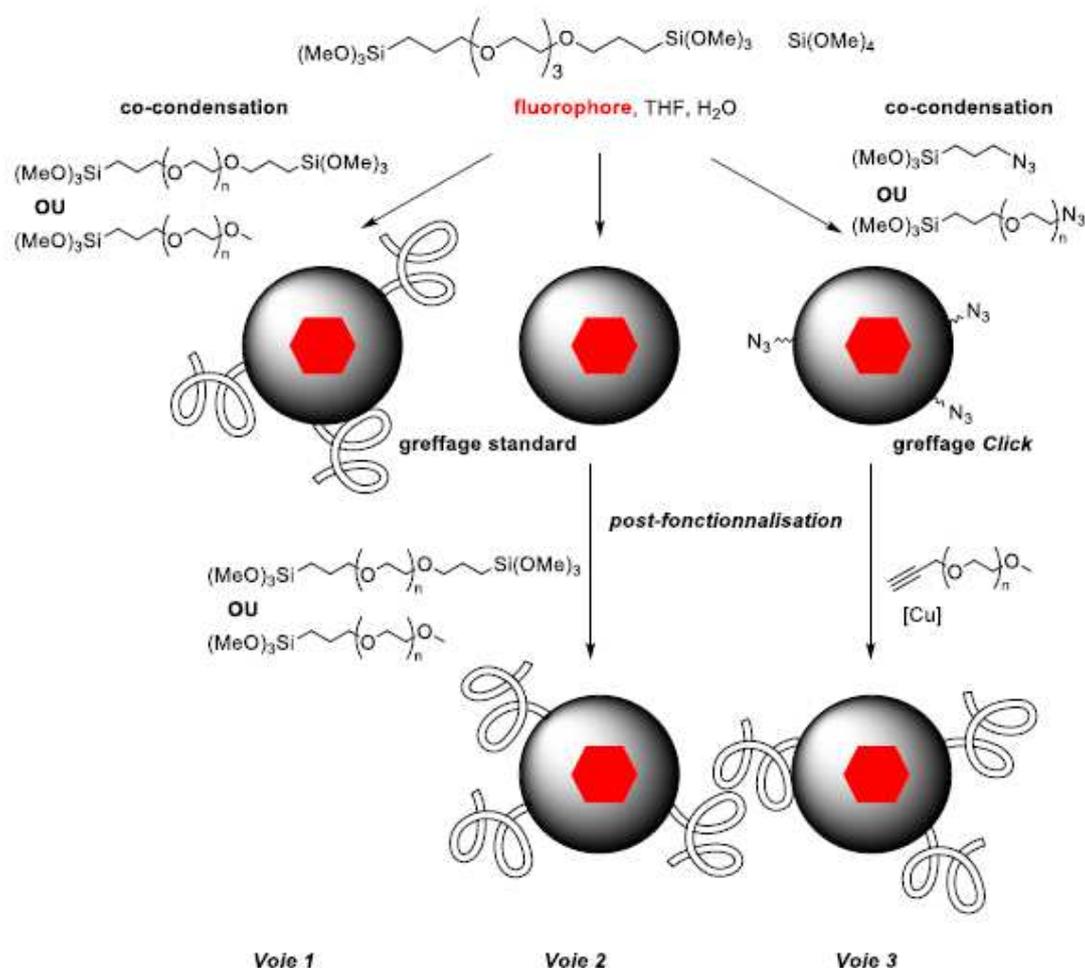


Figure 48: Schéma des voies de fonctionnalisation. Les voies de post-fonctionnalisation, co-condensation, et greffage par chimie click sont envisagées.

3.1. Fonctionnalisation post-synthèse

Le greffage d'organosilanes en milieu aqueux a donc été réalisé à l'aide des précurseurs pégylés suivants (Figure 49) avec une sous-unité PEG courte ($n = 9$, PEG400-Si) ou longue ($n = 45$, PEG2000-Si).

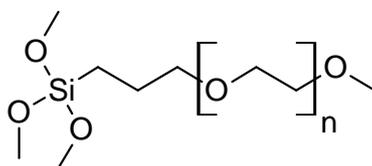


Figure 49: Schéma d'un précurseur PEG avec n variable.

3.1.1. Pégylation avec des sous-unités de PEG courtes (PEG400-Si)

Pour la fonctionnalisation avec les sous-unités PEG courtes, 35 μL de précurseurs silicatés pégylés ont été dilués dans une solution stock de méthanol puis dilués deux fois jusqu'à obtention de la solution B. Cette solution B a été ajoutée à une suspension colloïdale de

nanoparticules CMONS-S_{C3O4} (densité optique ~0,12) dispersées à l'aide de NaOH (pH = 12) non neutralisées. Plusieurs tests avec différents volumes de la solution B ont été réalisés afin de déterminer l'influence de la concentration en précurseurs sur la post-fonctionnalisation (Tableau 8). Les solutions obtenues ont été incubées pendant 24 h, puis les particules ont été lavées trois fois par centrifugation et re-suspension dans l'eau.

Concentration en précurseurs pégylés ajoutés (mol.L ⁻¹)	Diamètre apparent (nm) en DLS	Potentiel zêta (mV)
0 (NP de départ)	90	-35
1*10 ⁻⁵	90	-33
2*10 ⁻⁵	90	-28
6*10 ⁻⁵	90	-28

Tableau 8: Concentrations de précurseurs pour la fonctionnalisation des NPs, diamètre apparent et potentiel zêta des NPs obtenues.

Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par DLS et zétamétrie. Après pégylation dans le NaOH avec une concentration de PEG d'au moins 2*10⁻⁵ mol.L⁻¹, j'ai obtenu un potentiel de surface des nanoparticules de -28 mV (Figure 50b), supérieure donc à celui des nanoparticules de départ qui était de -35 mV (Figure 50a). La distribution de taille des particules pégylées comparée aux particules sans fonctionnalisation est sensiblement identique, centrée autour de 90 nm (Figure 50c-d), indiquant l'absence d'agrégation lors du processus de greffage d'organosilanes.

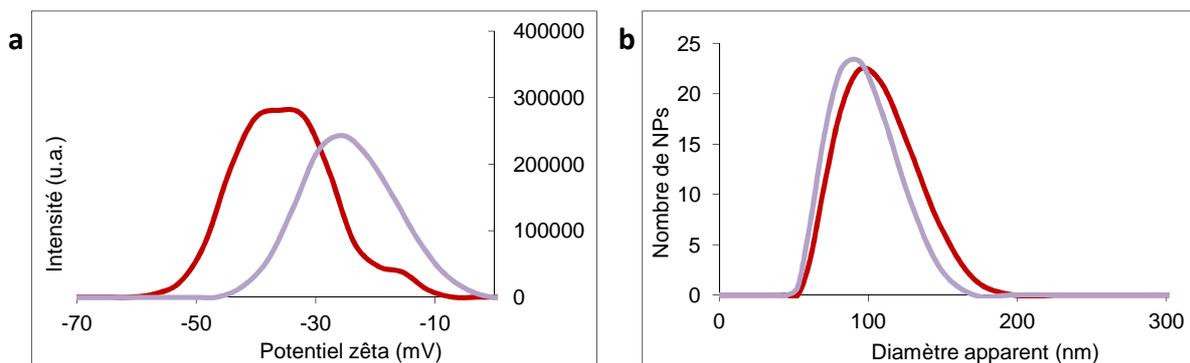


Figure 50: Caractérisation des NPs avant et après fonctionnalisation. (a) Potentiel zêta des nanoparticules non fonctionnalisées (rouge) et des nanoparticules fonctionnalisées par pégylation (violet). (b) Distribution de taille des nanoparticules sans fonctionnalisation (rouge) et des nanoparticules fonctionnalisées par pégylation (violet).

3.1.2. Fonctionnalisation avec des sous-unités de PEG longues (PEG2000-Si)

Avec les précurseurs silicatés possédant des sous-unités PEG plus longues (PEG2000-Si), nous avons post-fonctionné les NPs par le même protocole expérimental. Ainsi, 2 μL de PEG2000-Si ont été ajoutés à 5 mL de NPs CMONS-S_{C304} (densité optique $\sim 0,2$) dispersées dans l'eau basique (pH = 12) de façon à avoir une concentration finale de PEG de $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Suite à la réaction de greffage d'organosilanes, le diamètre hydrodynamique des NPs a augmenté, passant de 90 nm à 120 nm (Figure 51a). Cette augmentation sensible est en accord avec la formation d'une couche organique à la surface des NPs, étant donné la grande longueur des chaînes PEG utilisées ici. Le potentiel zêta des nanoparticules a aussi évolué, passant de -35 mV à -25 mV après la fonctionnalisation (Figure 51b). Néanmoins, les résultats se sont montrés par la suite peu reproductibles et le diamètre apparent des nanoparticules fonctionnelles obtenues était variable et souvent supérieur à 200 nm pour un grand nombre de tests. Les réactions de post-fonctionnalisation en milieux aqueux semblent donc permettre un greffage de PEG en surface mais sont, comme attendu, difficilement contrôlables et reproductibles.

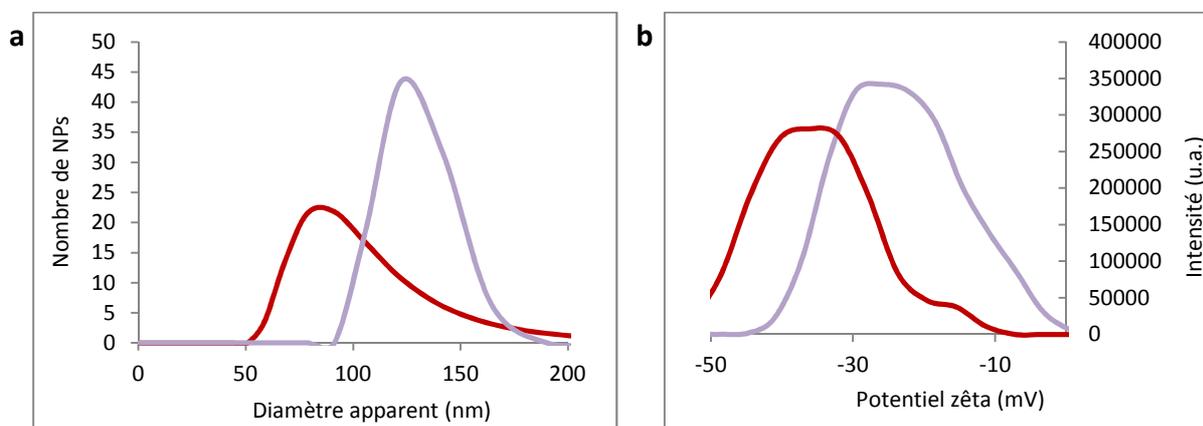


Figure 51: Caractérisations des NPs CMONS-S_{C304} fonctionnalisées avec PEG2000-Si (courbe violette) comparé aux NPs de départ (courbes rouges). (a) Diamètre apparent mesuré par DLS. (b) Potentiel zêta.

Ces mêmes tests de fonctionnalisation ont été réalisés sur des NPs avec la matrice S_{C304} contenant le chromophore GE31 puisqu'avec ce chromophore, le diamètre apparent de base des NPs était bien inférieur (35 nm) et semblait très stable. Dans ce cas, une post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes avec le précurseur silicaté possédant des

PEG2000-Si permet d'obtenir des nanoparticules de 45 nm en diamètre apparent avec un potentiel zêta de -20 mV (Figure 52).

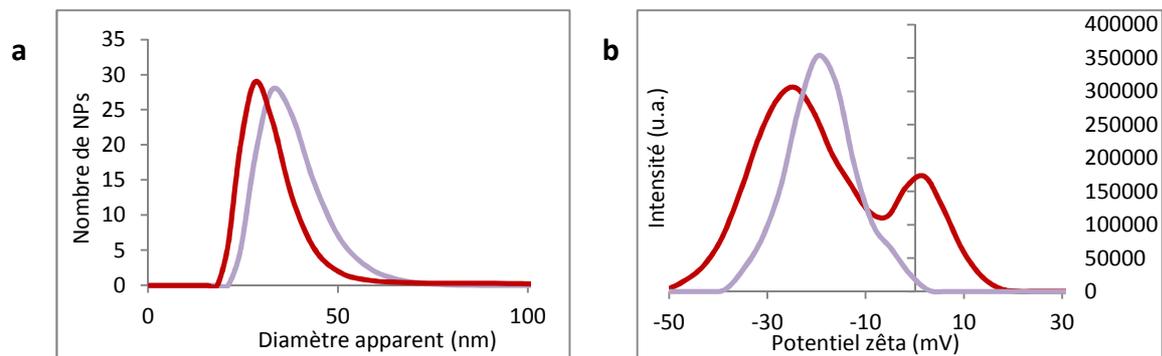


Figure 52: Caractérisations des NPs GE31-S_{C304} fonctionnalisées avec le PEG2000-Si (courbes violettes) comparé aux NPs de départ (courbes rouges). (a) Diamètre apparent mesuré par DLS. (b) Potentiel zêta.

Les expériences de fonctionnalisation par greffage de sous-unités PEG courtes et longues permettent de moduler le potentiel zêta des nanoparticules sans changer significativement leur taille apparente. Des nanoparticules élaborées à partir de ce processus ont donc été injectées dans les souris pour une imagerie *in vivo* afin de déterminer si le changement de potentiel zêta permet de faire circuler les NPs dans le sang des souris (cf. Chap IV).

3.1.3. Greffage de chitosane

La post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes étant difficile à maîtriser en suspension aqueuse, une autre stratégie de post-fonctionnalisation a été testée : l'addition de chitosane à la surface des NPs (Figure 53). Ce polysaccharide naturel, biocompatible, est souvent utilisé en médecine pour l'encapsulation de médicaments et d'agents imageants (Aldrich, *catalogue* 1999; Boca et al. 2011) et possède des propriétés intéressantes comme un potentiel électrique positif à pH neutre. Il est donc possible de recouvrir les nanoparticules chargées négativement par ce polymère chargé positivement par simple interaction électrostatique.

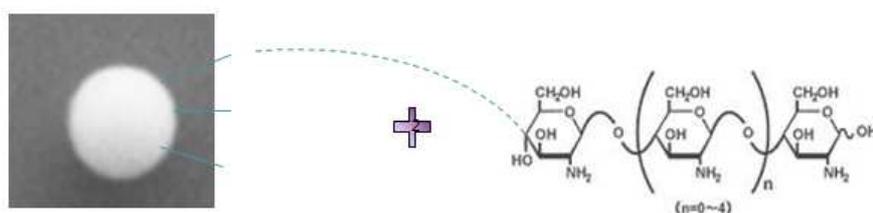


Figure 53: Fonctionnalisation avec le polymère chitosane.

Pour ce test, 2 mg de chitosane (Aldrich, *catalogue* 1999; Sigma-Aldrich, *page web*) ont été dissouts dans 1 mL d'acide acétique à 1% puis 1 mL de cette solution de chitosane a été ajouté dans 5.5 mL de solution de particules (densité optique 0.4) et mélangés pendant 15 min (Tableau 9). Après une centrifugation à 8000 tr.min^{-1} pendant 20 min, la solution a été lavée trois fois pour éliminer le chitosane surnageant.

le protocole:	5.5 mL de solution de particules sous agitation
	2 mg de chitosane dans 1 mL d'acide acétique 1% (pH = 3)
	mélange 15 min
	centrifugation 20 min à 8000 tr.min^{-1}
	lavage à l'eau

Tableau 9 : Protocole de la fonctionnalisation avec le chitosane.

A nouveau, ces nanoparticules fonctionnalisées ont été caractérisées par MEB, DLS et mesure du potentiel zêta. Sur des images MEB, on peut observer une sorte d'enveloppe autour de particules semblant indiquer la présence du polymère à la surface des particules, Cette couche soit voit peu pour les petites NPs de l'échantillon (Figure 54a) mais est particulièrement visible pour quelques plus grosses NPs (Figure 54b). Le potentiel zêta des nanoparticules a, comme attendu, évolué vers des valeurs positives (+10 mV) en raison de la présence du chitosane en surface (Figure 55). Les mesures en DLS indiquent une évolution de la taille des particules passant d'environ 80 nm avant fonctionnalisation à 120 nm après greffage du chitosane (Figure 56) ce qui montre bien que les NPs sont enveloppées par une nouvelle couche que l'on suppose donc être une couche de chitosane.

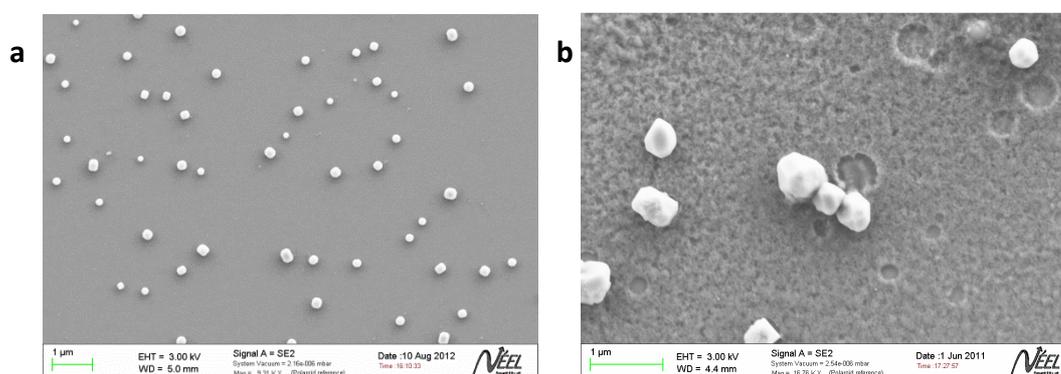


Figure 54: Images MEB de nanoparticules fonctionnalisées avec le chitosane. (a) Répartition globale des plus petites nanoparticules. (b) Image de quelques grandes NPs suggérant la formation d'une couche de chitosane.

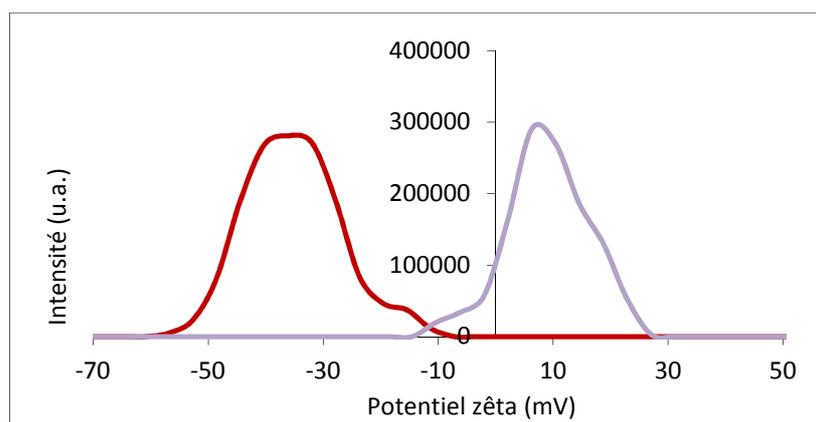


Figure 55: Potentiel zêta de nanoparticules fonctionnalisées avec le chitosane (courbe violette) comparé à celui des NPs de base (courbe rouge).

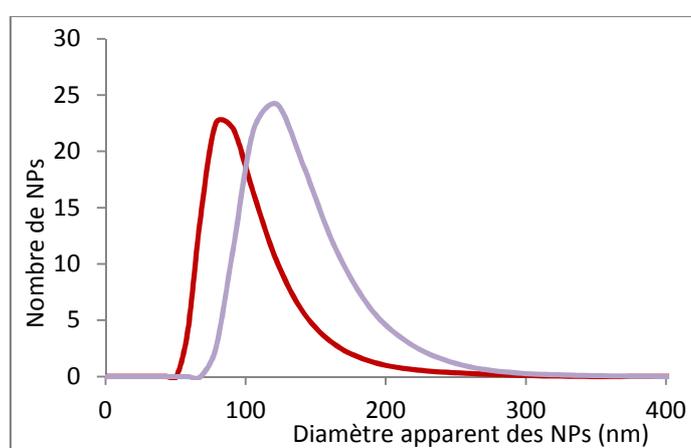


Figure 56: Distribution en taille des nanoparticules mesurée par DLS après fonctionnalisation avec le chitosane (courbe violette) comparée aux NPs sans fonctionnalisation (courbe rouge).

Les nanoparticules fonctionnalisées avec le chitosane présentent un diamètre apparent de 120 nm et un potentiel zêta positif de +10 mV. Ces conditions semblent être adaptées pour une future injection dans les souris. Les résultats de cette imagerie in vivo seront présentés dans le Chapitre IV.

3.1.4. Conclusion sur la post-fonctionnalisation

Les différentes stratégies de post-fonctionnalisation ont permis de moduler les charges de surface des nanoparticules. Néanmoins, ces expériences de fonctionnalisation dans l'eau ont conduit à des résultats peu reproductibles et le passage aux solvants organiques (toluène, méthanol) recommandés pour les réactions de post-fonctionnalisation n'est pas possible étant donnée la dissolution des cœurs organiques cristallins par ces solvants. Au vue de cette difficulté, nous avons décidé de tester la possibilité d'introduire directement lors de la synthèse des particules des groupements fonctionnels à la surface. Ainsi, je vais présenter

dans la suite de ce chapitre, les stratégies dites de co-condensation que nous avons envisagées.

3.2. Fonctionnalisation directe par co-condensation dans la matrice de départ

Deux stratégies différentes de co-condensation ont été étudiées durant ce travail. La première consiste à substituer une partie du précurseurs C_3O_4 par un autre précurseur bis-silylé contenant une sous-unité polyéthylène glycol plus longue que le C_3O_4 (Figure 57). L'introduction de sous unité PEG volumineuses devrait permettre de moduler la charge de surface des nanoparticules vers des potentiels de surface moins négatifs.

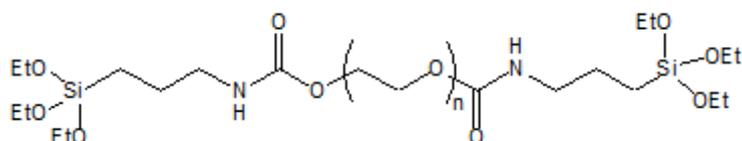


Figure 57: Précurseurs bis-silylé PEG-Si₂ contenant une sous unité PEG (n = 10 : PEG400-Si₂ ; n = 45 : PEG2000-Si₂).

La deuxième stratégie est d'introduire dans le sol de départ des précurseurs mono-silylés afin d'obtenir des nanoparticules possédant des groupements fonctionnels en surface (PEG, azoture, phosphonate, amine). Les différents précurseurs utilisés sont repris ci-dessous :

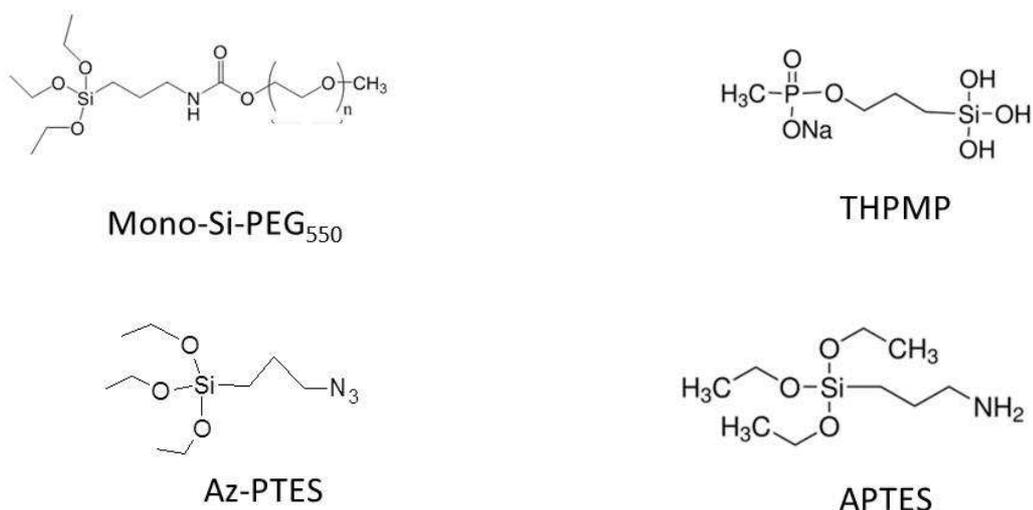


Figure 58: Précurseurs mono-silylés utilisés : PEG550-Si et Az-PTES, le phosphonate THPMP (Aldrich), APTES (commercial).

3.2.1. Insertion de précurseurs bis-silylés

Des proportions variables de PEG bis-silylés ont été ajoutées au sol de départ en même temps que le TMOS et le C_3O_4 . Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des particules "blanches", sans introduction de fluorophore. Nous avons introduit le précurseur bis-silylé à sous-unité PEG courte (PEG-Si₂ avec PEG = 400 dans la Figure 57). Le sol de départ est constitué de 5% de ce précurseur par rapport au C_3O_4 ce qui donne une matrice 8TMOS-0.95 C_3O_4 -0.05PEG400-Si₂. Les volumes pour le sol étaient: 121 μ L de TMOS, 47 μ L de C_3O_4 , 5 μ L de PEG400-Si₂, 67 μ L de HCl (1 M) et 60 mL de THF (Annexe F).

L'analyse des clichés MEB des nanoparticules obtenues indique la formation de particules sphériques avec un diamètre moyen mesuré d'environ 50 nm (Figure 59a). Le rayon hydrodynamique et le potentiel zêta des NPs, après dispersion par le même traitement basique que décrit précédemment, ont été ensuite mesurés. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules obtenues est de 70 nm (Figure 59b) indiquant une bonne dispersion de nanoparticules isolées et leur potentiel de surface est centré autour de -10 mV (Figure 59c), bien moins négatif que la charge de surface mesurée pour la matrice C_3O_4 .

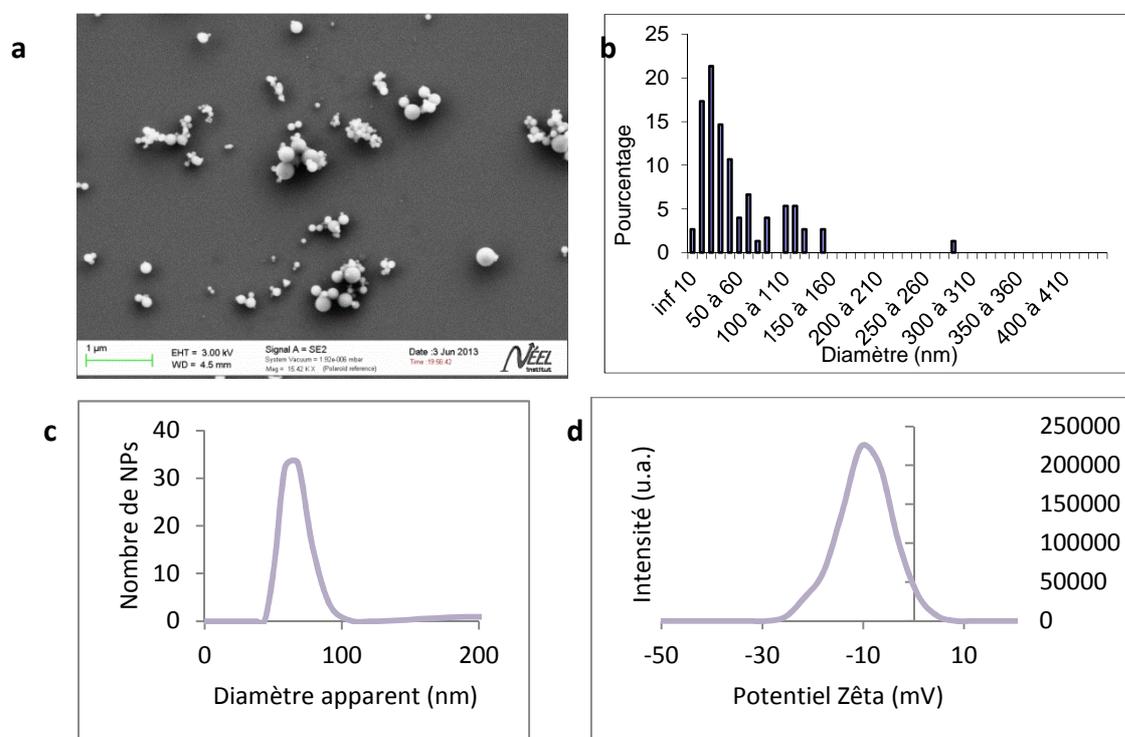


Figure 59: Caractérisation des nanoparticules contenant des PEG400-Si₂. (a) Images obtenue au MEB avant traitement en solution basique. (b) Distribution en taille à partir de l'image MEB avant sélection en taille et (c) mesure par DLS après traitement en solution basique. (d) Mesure des charges de surface.

Les nanoparticules formées avec cette nouvelle matrice présentent une bonne stabilité colloïdale malgré un potentiel de surface faiblement négatif. Suite à ces résultats encourageants obtenus sur des nanoparticules "blanches", j'ai introduit du CMONS dans les sols de départ afin d'obtenir des nanoparticules cœur-coquille avec ces nouvelles compositions de matrice. Des NPs cœur-coquille ont été synthétisées avec succès pour cette matrice (Figure 60a), avec une quantité de CMONS proche de la matrice classique ($d_{max} = 0,085$). Le diamètre moyen mesuré à partir des images MEB est de 40 nm (Figure 60b).

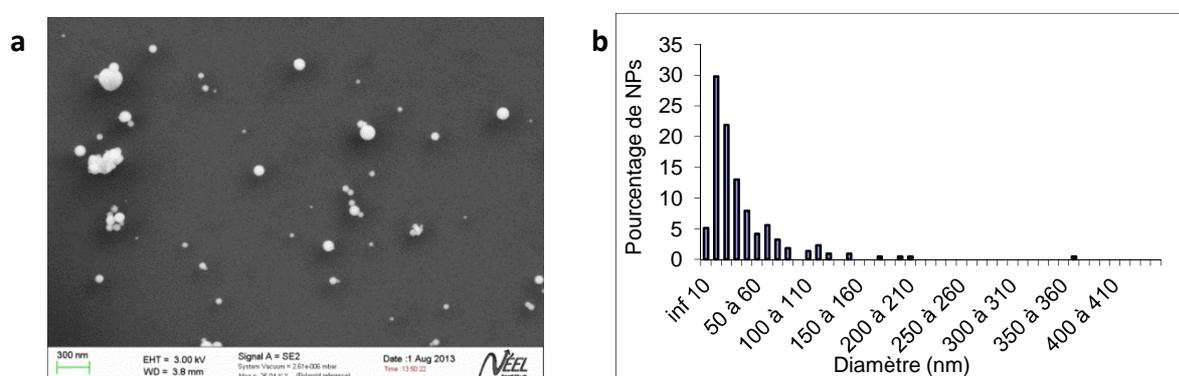


Figure 60: Caractérisation des nanoparticules cœur CMONS - coquille contenant des PEG400-Si₂. (a) Images obtenue au MEB avant traitement en solution basique. (b) Distribution en taille à partir de l'image MEB avant sélection en taille.

La stratégie de fonctionnalisation par co-condensation avec des PEG-Si₂ permet d'obtenir des nanoparticules faiblement chargée en une étape avec un diamètre hydrodynamique de 80 nm acceptable pour la circulation dans le sang des souris. Ce type de nanoparticules devra donc être testé *in vivo* à l'avenir (test non réalisé dans cette thèse).

3.2.2. Insertion de précurseurs mono-silylés

Afin d'obtenir des nanoparticules possédant des fonctionnalités de surface nous avons introduit en parallèle différents précurseurs silicatés mono-silylés dans les sols de départ.

3.2.2.1. Insertion du PEG500-Si dans la matrice

De la même façon que pour les précurseurs bis-silylés, nous avons intégré le PEG550-Si. Les proportions utilisées pour l'intégration de ce précurseur dans la matrice sont de 3% par rapport au C₃O₄ ce qui correspond à une matrice 8TMOS-0.97C₃O₄-0.03PEG-Si. Les volumes pour le sol étaient: 177 μ L de TMOS, 71 μ L de C₃O₄, 4 μ L de PEG550-Si, 100 μ L de HCl (1 M)

et 60 mL de THF (Annexe F). La taille des NPs "blanches" obtenues à partir des images MEB a été estimée à 40 nm en moyenne (Figure 61a). Le rayon hydrodynamique des NPs, dispersées dans les mêmes conditions basiques que précédemment, a été ensuite mesuré par DLS ainsi que le potentiel zêta. Le diamètre apparent mesuré des nanoparticules est de 180 nm (Figure 61b), bien plus élevé donc que la taille des nanoparticules isolées. Le traitement basique (pH = 12) utilisé pour cette mise en suspension ne semble pas être utilisable dans le cas de cette matrice et doit donc être ajusté. La charge de surface de ce type de nanoparticules montre deux contributions de -10 mV et -20 mV (Figure 61c) pouvant être encore expliquée par une mauvaise dispersion colloïdale des nanoparticules.

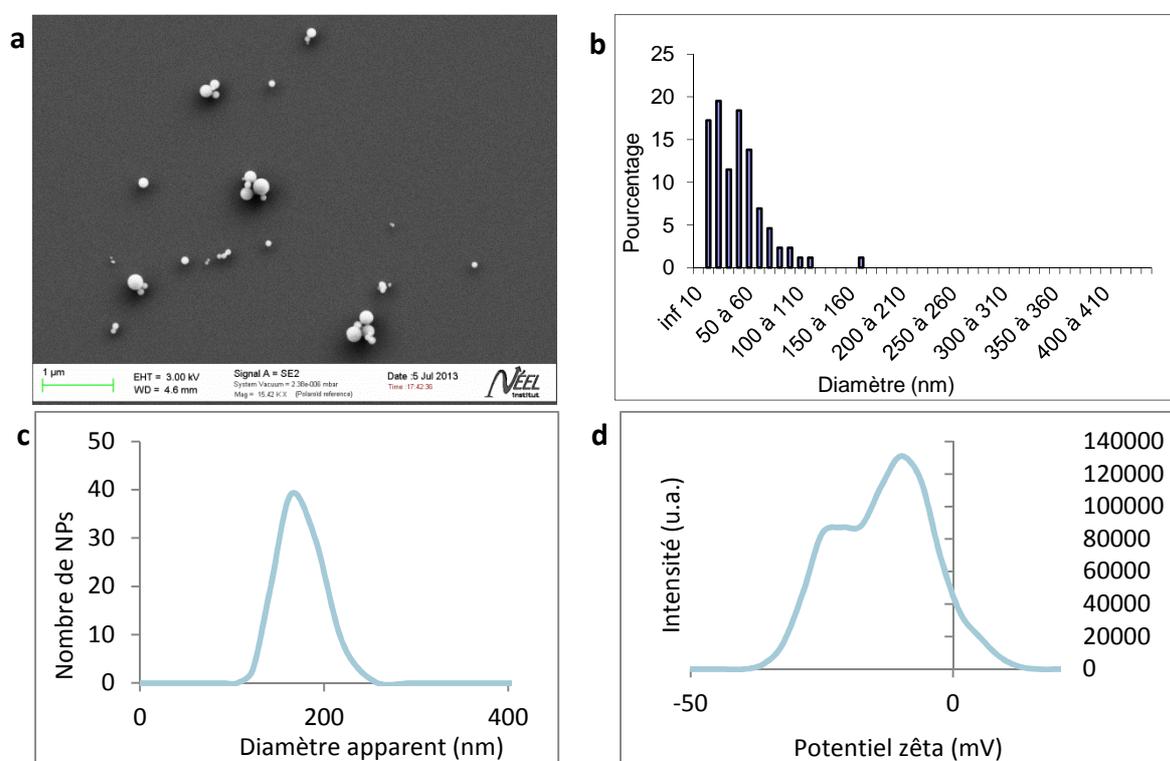


Figure 61: Caractéristiques des nanoparticules contenant des PEG550-Si. (a) Image MEB des nanoparticules obtenues avant traitement en solution basique. (b) Distribution en taille à partir des images MEB avant sélection en taille, (c) diamètre apparent obtenu par DLS et (d) charges de surface mesurées par potentiel zêta.

Ensuite, du CMONS a été introduit dans les sols de départ afin d'obtenir des nanoparticules cœur-coquille avec cette composition de matrice. Les NPs cœur-coquille ont été synthétisées avec succès pour cette matrice (Figure 62a), avec une quantité de CMONS proche de la matrice classique ($d_{\max} = 0,085$). Le diamètre moyen mesuré à partir des images MEB est de 40 nm (Figure 62b).

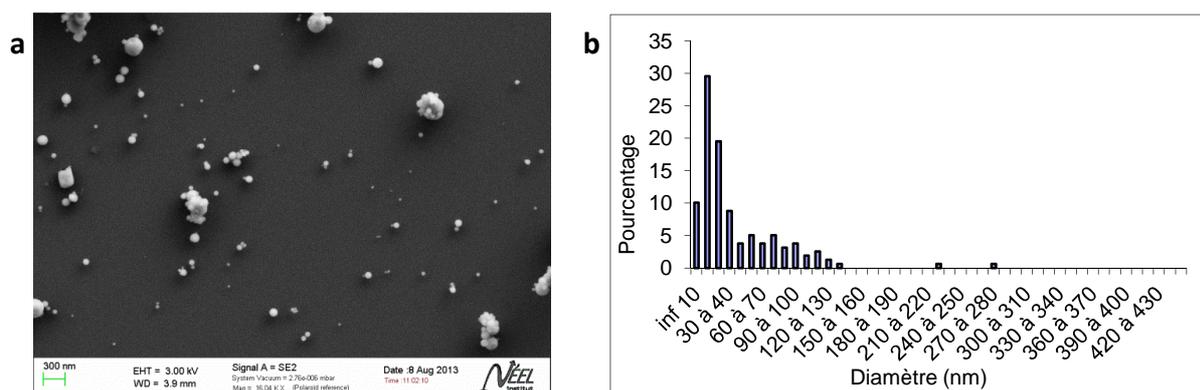


Figure 62: Caractérisation des nanoparticules cœur CMONS - coquille contenant des PEG550-Si. (a) Images obtenues au MEB avant traitement en solution basique. (b) Distribution en taille mesurée à partir des images MEB avant sélection en taille.

Pour mieux comprendre les problèmes de dispersion colloïdale observés avec cette matrice pour les nanoparticules "blanches", j'ai étudié l'effet du pH lors du traitement à la soude des NPs. Pour un lot de NPs synthétisées, j'ai mis une moitié à pH = 9 et une moitié à pH = 11. Ces solutions ont été soumises pendant 30 minutes aux ultrasons puis agitées pendant 24 h. En observant ces solutions au microscope après 24 h, on remarque qu'elles sont bien dispersées et sphériques pour le traitement à pH = 9 alors que les NPs semblent être plus collées pour un traitement à pH = 11.

Les problèmes de stabilité colloïdale observés dans un premier temps pour cette nouvelle matrice semblent donc être dus aux conditions du traitement de dispersion. Ce phénomène avait déjà été observé lors du changement du taux de solvant dans la synthèse des NPs (cf. Chapitre II). Les observations sur la fluctuation du diamètre apparent mesuré en DLS nous avaient poussés à adapter le pH lors de la dispersion des NPs ainsi que le temps de traitement. Ainsi, il est nécessaire d'adapter le protocole de dispersion en fonction de la nature de la coquille.

3.2.2.2. Intégration d'un mélange de THPMP et d'APTES

Outre l'introduction de PEGs à la surface des nanoparticules, nous avons testé l'introduction d'autres groupements chimiques pouvant potentiellement améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules dans les milieux complexes. Ainsi Bagwe et al. (Bagwe et al. 2006) ont démontré l'augmentation de la stabilité colloïdale de NP de silice dans les milieux salins et la réduction des interactions non-spécifiques de celles-ci lorsque la surface des particules est fonctionnalisée par une structure de type zwitterionique grâce aux

greffage en surface d'un mélange de fonctions phosphonates et de fonctions amines (Bagwe et al. 2006; Lu J et al. 2007, Lu J et al. 2012). Le groupe de Zink (Lu J et al. 2010) a ensuite utilisé *in vivo* des nanoparticules de silice mésoporeuses stabilisées par ces fonctions pour le traitement de tumeurs sur des souris. Afin de vérifier la possibilité d'introduire des fonctions phosphonates à la surface des nanoparticules, nous avons dans un premier temps introduit dans des sol une proportion de 18 % par rapport au C_3O_4 de 3-(trihydroxysilyl)propyl methylphosphonate (THPMP), ce qui donne une matrice sont 8TMOS-0.82 C_3O_4 -0.18THPMP. Les volumes pour le sol étaient: 140 μ L de TMOS, 48 μ L de C_3O_4 , 4 μ L de THPMP, 66 μ L de HCl (1 M) et 60 mL de THF (Annexe F). Les nanoparticules obtenues parfaitement sphériques et séparées (Figure 63a) présentent un diamètre moyen de 55 nm (Figure 63a). Après un traitement de 24 h à pH = 11, le diamètre hydrodynamique était de 120 nm (Figure 63c) et le potentiel zêta centré autour de -40 mV (Figure 63d). Dans le cas de cette matrice, nous observons à nouveau des problèmes de stabilité colloïdale, probablement dus ici aussi au traitement basique qui doit être adapté.

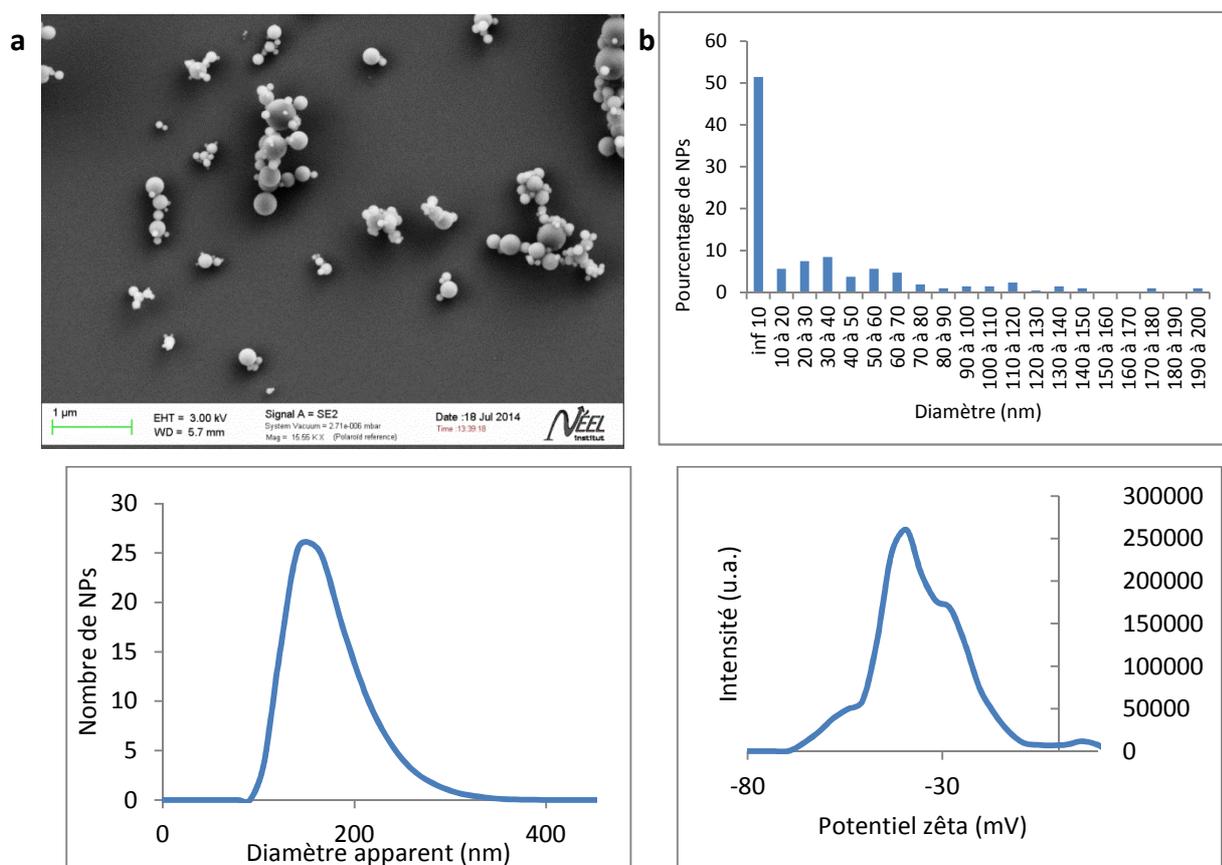


Figure 63: Caractérisation de NPs "blanches" en matrice 8TMOS-0.82 C_3O_4 -0.18THPMP obtenues par co-condensation THPMP. (a) Image MEB des NPs obtenues avant traitement en solution basique. (b) Répartition de taille des NPs avant sélection en taille. (c) Diamètre apparent en DLS et (d) potentiel zêta de ces NPs.

Des nanoparticules sont également en cours de développement avec une coquille contenant un mélange de THPMP et APTES. L'introduction de CMONS dans des NPs cœur-coquille avec ce type de matrice devrait permettre, à terme, d'obtenir des particules directement injectables dans les souris.

3.2.2.3. Insertion de précurseurs *clickables*

Le concept de chimie "*click*", introduit par l'équipe de Sharpless (Rostovtsev et al. 2002) rassemble une famille de réactions chimiques permettant d'assembler très facilement différentes entités moléculaires ou polymère/matériaux (on parle de chimie "Lego"). Ces familles doivent remplir un certain nombre de critères : de très bons rendements pour un grand nombre de molécules de départ, une facilité de mise en œuvre avec une purification aisée, une robustesse aux conditions expérimentales très importante et une adaptation facile aux milieux aqueux. Cette famille de transformations chimiques a, depuis quelques années, connu un développement très important en raison de sa grande flexibilité et son adaptation aux différents systèmes. Cette notion englobe les cycloadditions (1,3-dipolaire et Diels-Alder), la chimie des carbonyles (formation d'urées, de thiourées, d'hétérocycles aromatiques), les réactions d'addition sur des liaisons carbone-carbone multiples, etc.

La cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I) (Figure 64) est la réaction *click* la plus largement développée. Les azotures et les alcynes se sont révélés être des groupements chimiques très robustes pour une large gamme de conditions réactionnelles, permettant la fonctionnalisation de nanoobjets dans des conditions biologiques.

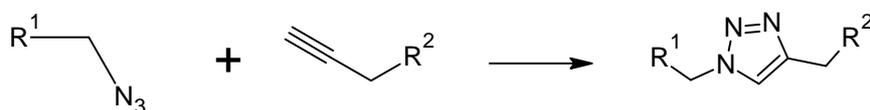


Figure 64: Schéma d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

L'introduction par co-condensation de fonctions "*clickables*", tels que des azotures, a donc été testée afin d'ouvrir la voie à une fonctionnalisation modulable (introduction de PEG mais aussi greffage de biomolécules, de molécules ciblantes...) de la surface des nanoparticules par chimie "*click*". Un précurseur (Figure 58) a été testé : l'AzPTES.

Les ratios de précurseurs dans le sol sont 8TMOS-0.82C₃O₄-0.18AzPTES. L'observation des NPs "blanches" obtenues au microscope a montré des NPs parfaitement formées avec une taille moyenne de 50 nm (Figure 65).

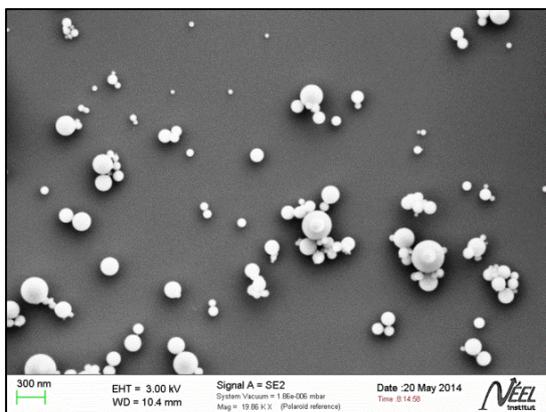


Figure 65: Images MEB de NPs "blanches" en matrice 8TMOS-0.82C₃O₄-0.18AzPTES avant traitement en solution basique.

Une analyse infrarouge des nanoparticules obtenues a été réalisée pour la composition 8TMOS-0.82C₃O₄-0.18AzPTES afin de déterminer si les fonctions azotures ont bien résisté au traitement thermique lors de la synthèse et ont bien été intégrées dans les particules. Le spectre a été comparé à celui de NPs "blanches" obtenues avec la matrice 8TMOS-1C₃O₄. Outre les pics présents pour les deux types de NPs (Si-OH à 900 cm⁻¹, Si-O-Si à 1000 cm⁻¹, CH₂ vers 2900 cm⁻¹ et OH à 3300 cm⁻¹) on retrouve pour les NPs contenant l'AzPTES un pic à 2100 nm qui est caractéristique de groupements N₃ (Figure 66a). Nous avons ensuite vérifié la présence de ce pic à 2100 cm⁻¹ dans les précurseurs C₃O₄ et AzPTES qui ont été utilisés pour la synthèse de ces NPs. En effet ce pic caractéristique de la fonction azoture est très marqué dans le précurseur AzPTES (Figure 66b). Le même pic s'étant retrouvé pour les nanoparticules contenant ce précurseur, on peut être certain que le N₃ a bien résisté à la température du four lors de la synthèse des NPs et est présent dans les coquilles.

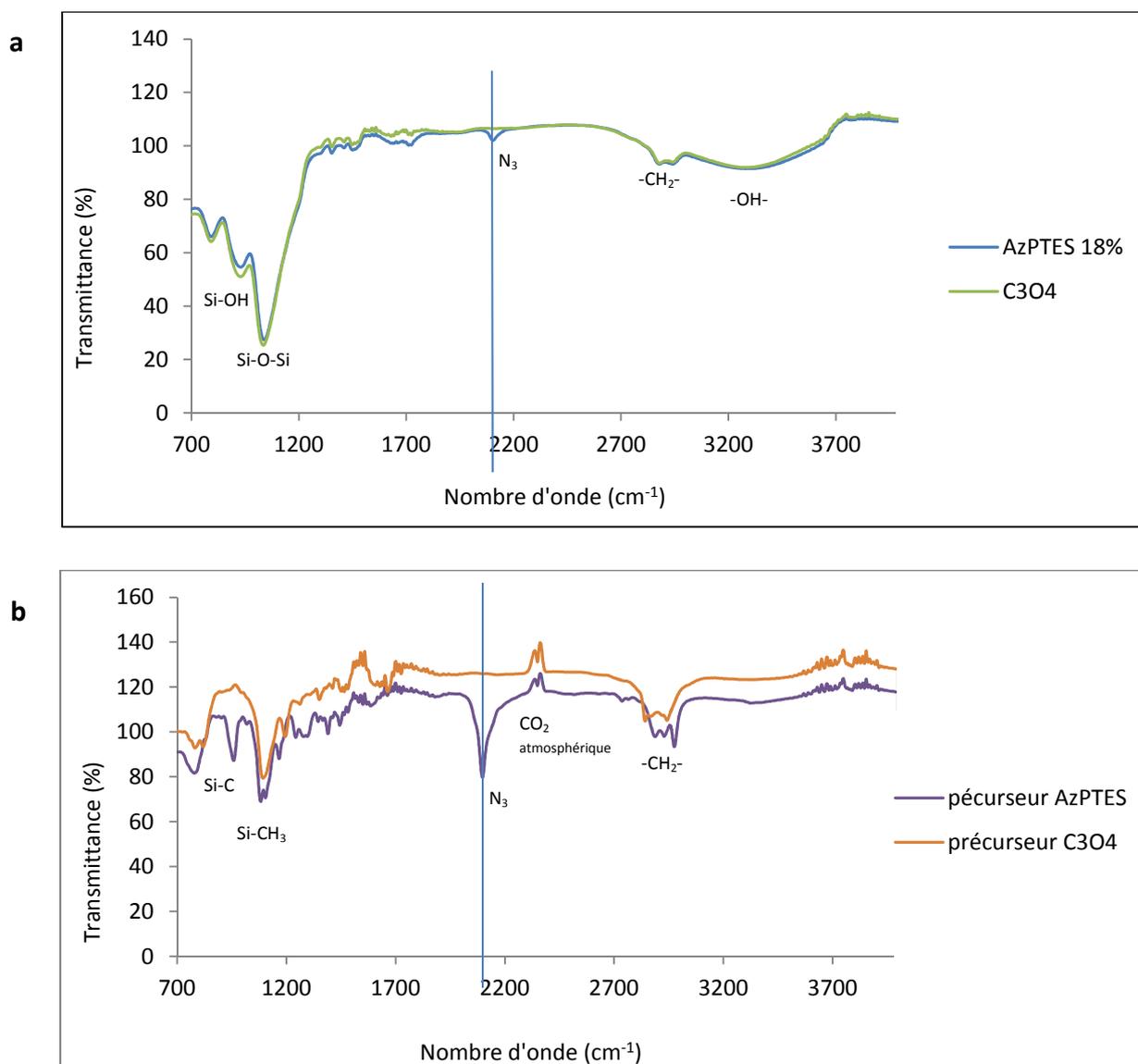


Figure 66: Spectres infrarouge pour la matrice contenant l'Az-PTES comparée à la matrice 8TMOS-1C₃O₄. (a) Spectre sur poudre de NPs "blanches" et (b) spectre sur les précurseurs en solution.

De premières nanoparticules cœur-coquille avec ces précurseurs azotures ont été synthétisées et sont en cours de caractérisation. Ces nanoparticules obtenues par co-condensation avec les azotures nous ouvrent des possibilités pour tester différentes fonctionnalisations (PEG, RGD...) par chimie "click" (en cours de développement).

3.2.3. Conclusion sur la co-condensation

Les différentes stratégies de fonctionnalisation par co-condensation ont permis d'obtenir une modulation du potentiel zêta des particules de silice tout en procédant à la synthèse de NPs cœur-coquille en une seule étape. Les stratégies d'incorporation de fonctionnalités directement par co-condensation ont ainsi été réalisées avec succès. L'obtention de ces NPs devrait permettre de meilleures stabilisations dans les milieux complexes ainsi qu'à un futur

développement de la chimie "*click*" et ouvre ainsi la voie au greffage de biomolécules ciblantes afin de rendre les nanoparticules cœur-coquille potentiellement plus furtives lors des applications *in vivo*.

Chapitre IV) Imagerie de la microvascularisation cérébrale chez le petit animal

Voyage au cœur du vivant...

"Le nerf optique est celui qui amène les idées lumineuses au cerveau."

Jean-Charles

Pour injecter les nanoparticules cœur-coquille dans le système sanguin des souris pour les applications d'imagerie, il faut au préalable s'assurer qu'elles soient colloïdalement stables dans des milieux proches du vivant. Des premières études (Philippot 2010) avaient montré des problèmes d'agrégation des NPs lorsqu'elles sont injectées. Pour mieux comprendre ces phénomènes d'agrégation dans le sang, j'ai étudié plus en détails les effets du sel et de la température. Ainsi, ce chapitre présentera, dans un premier temps, des études de stabilité colloïdale des NPs réalisées en milieu aqueux : eau pure déionisée et milieu salin (9 g.L^{-1} NaCl). Ensuite, je présenterai la préparation des échantillons et des animaux en vue des expériences *in vivo* avant de montrer les résultats obtenus pour l'imagerie des microvaisseaux.

1. Compatibilité des nanoparticules avec le milieu biologique

1.1. Stabilité colloïdale des nanoparticules dans le sel

Pour s'approcher des conditions de l'*in vivo* dans le sang, il a fallu étudier le comportement des NPs en milieu salin : à 9 g.L^{-1} de NaCl. L'étude qui suit a été réalisée avec des nanoparticules cœur-coquilles encapsulant le fluorophore GE32 dans la matrice 8TMOS- $1\text{C}_3\text{O}_4$ sans aucune fonctionnalisation. Ces particules présentaient un diamètre apparent en solution colloïdale de 35 nm mesuré en DLS. Afin d'évaluer l'influence de sel sur la stabilité de la dispersion, la concentration en NaCl de la solution a été amenée à 9 g.L^{-1} . La taille des nanoparticules a été à nouveau mesurée par DLS après ajout du sel. Comme le montre la Figure 67, la présence de sel n'influence pratiquement pas la taille des objets en suspension, ce qui indique une bonne stabilité colloïdale dans ce milieu.

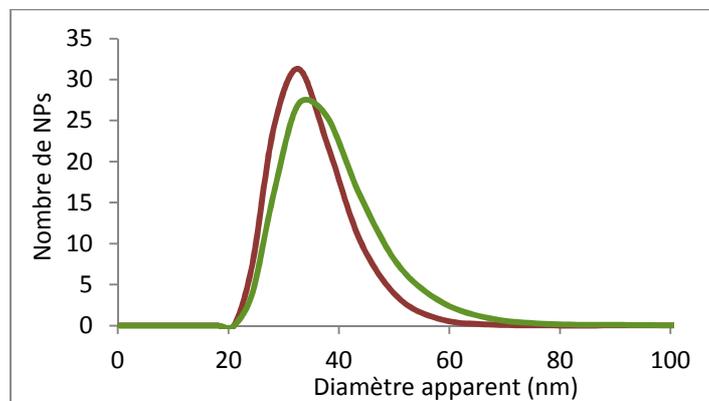


Figure 67: Diamètre apparent des nanoparticules GE32-8TMOS- $1\text{C}_3\text{O}_4$ à 25°C sans ajout de sel (courbe rouge) et avec 0,9% de NaCl (courbe verte).

1.2. Influence de la température sur la stabilité colloïdale

Lorsque l'échantillon est chauffé à 37 °C, le comportement des NPs est différent. Dans l'eau pure, l'augmentation de la température de la suspension de 20 °C à 37 °C ne modifie pas le comportement colloïdal des nanoparticules. Par contre, l'ajout de NaCl à 9 g.L⁻¹ augmente drastiquement le diamètre apparent des nanoparticules (>500 nm) à cette température ce qui révèle une déstabilisation du système colloïdal (Figure 68).

Des tests réalisés à 37 °C avec des concentrations en sel moins importantes (3 g.L⁻¹ et 6 g.L⁻¹) montrent clairement que plus la concentration en sel augmente, plus la taille des nanoparticules (des agrégats) est importante (110 nm pour 0,3 % et 200 nm pour 0,6 %). Cette déstabilisation en présence de sel à 37 °C risque donc d'être un problème majeur pour la circulation de ces nanoobjets dans le flux sanguin *in-vivo*.

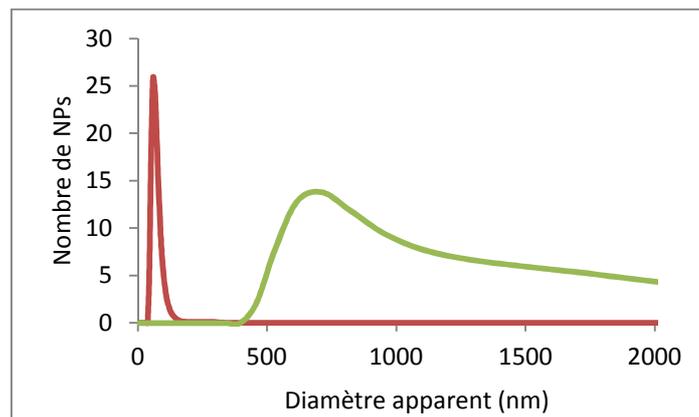


Figure 68: Diamètre apparent des nanoparticules GE32-8TMOS-1C₃O₄ à 37 °C sans ajout de sel (courbe rouge) et avec 0,9 % de NaCl (courbe verte).

1.3. Modification de la stabilité colloïdale des nanoparticules cœur-coquille après fonctionnalisation

La fonctionnalisation des NPs doit permettre d'augmenter la stabilité colloïdale des NPs en conditions biologiques. Dans un premier temps, une cinétique de l'émission de fluorescence ($\lambda_{exc} = 400$ nm, $\lambda_{émission} = 550$ nm) sur des NPs 8TMOS-1C₃O₄ contenant du CMONS montre l'influence de la fonctionnalisation (par chitosane et par post fonctionnalisation avec le précurseur silicaté PEG2000-Si) sur la stabilité colloïdale de l'échantillon en condition saline. Pour cette expérience, 1 mL de tampon biologique (PBS-buffer) a été ajouté pour 1 mL de NPs en solution. Les NPs non fonctionnalisées stabilisées dans l'eau ont une intensité d'émission de fluorescence quasi-constante avec le temps (courbe bleue, Figure 69). Lorsque

l'on ajoute la solution saline, on perd rapidement 10 % de signal ce qui montre une déstabilisation (courbe rouge, Figure 69). Or, pour les NPs fonctionnalisées avec le chitosane, ou avec un précurseur contenant des sous-unités PEGs longues (PEG2000-Si), la fluorescence reste stable même en présence de sel (courbes jaune et verte, Figure 69). Ces deux stratégies de fonctionnalisation semblent donc rendre les NPs plus stables colloïdalement.

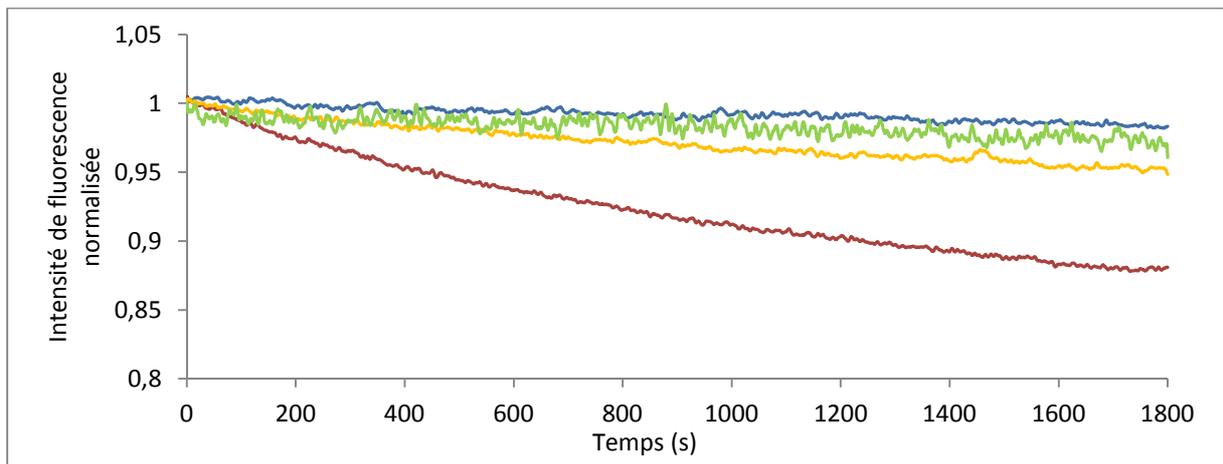


Figure 69: Cinétique de l'émission de fluorescence : NPs non fonctionnalisées dans l'eau (courbe bleu) puis en présence de sel (courbe rouge) ; NPs fonctionnalisées avec le chitosane (courbe jaune) et avec le précurseur contenant le PEG long (courbe verte).

Afin de compléter ces études, des expériences en DLS ont été réalisées en fonction de la température et de la concentration en sel. Les NPs cœur-coquille étudiées sont composées d'un cœur GE32 avec une matrice C_3O_4 post fonctionnalisée par greffage d'organosilanes avec des précurseurs silicatés PEG2000-Si. Les mesures de DLS des suspensions colloïdales obtenues sont effectuées avant et après ajout de NaCl (9 g.L^{-1}) à 25°C dans un premier temps. A cette température, comme dans le cas des particules non fonctionnalisées, les tailles obtenues en DLS sont quasi identiques en présence ou en absence de sel (centrées autour de 80 nm) (Figure 70).

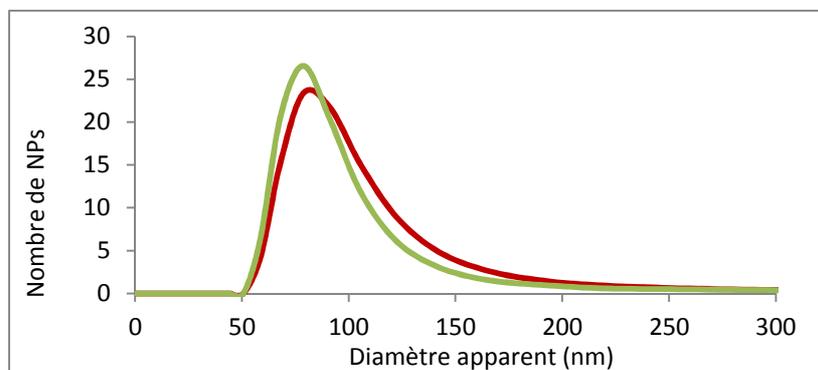


Figure 70: Diamètre apparent à 25°C des nanoparticules GE32-8TMOS- $1C_3O_4$ fonctionnalisées avec PEG2000-Si sans ajout de sel (courbe rouge) et avec 0,9 % de NaCl (courbe verte).

Le comportement des nanoparticules fonctionnalisées à 37° C est différent de celui observé pour les particules non fonctionnelles. En l'absence de sel, la taille mesurée en DLS augmente par rapport à la situation à 20° C passant de 80 nm à environ 110 nm. Par contre l'ajout de sel (9 g.L⁻¹) ne perturbe pas la suspension colloïdale, à cette température (Figure 71). La stabilité colloïdale des nanoparticules post fonctionnalisées semble donc être plus robuste à l'action combinée du sel et de la température.

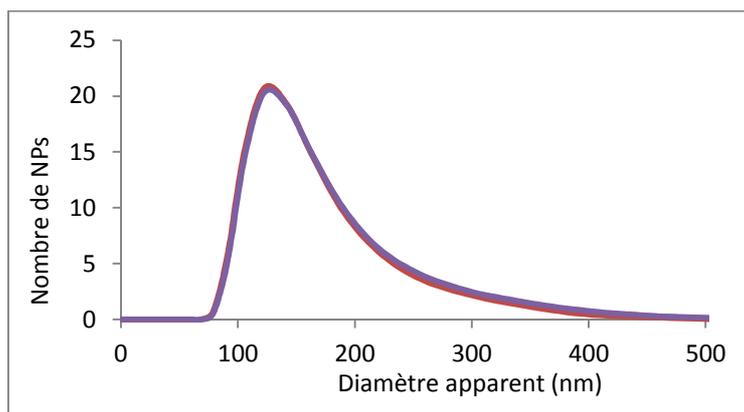


Figure 71: Diamètre apparent à 37 °C des nanoparticules GE32-8TMOS-1C₃O₄ fonctionnalisées avec PEG2000-Si sans ajout de sel (courbe rouge) et avec 9 g.L⁻¹ de NaCl (courbe bleue).

2. Imagerie *in vivo* : tests d'imagerie de la micro vascularisation cérébrale

Pour les expériences d'imagerie *in vivo* que je décrirai dans ce chapitre, je précise que celles-ci ont été réalisées avec l'un des partenaires de cet ANR : Boudewijn Van der Sanden, Plateforme de microscopie intravital (France Life Imaging) à l'Institut des Neurosciences à Grenoble. Les chirurgies ont été réalisées par Mathieu Maurin et Florence Appaix qui ont travaillé sur la plateforme d'imagerie de l'institut.

2.1. Préparation et concentration des nanoparticules

Après synthèse des nanoparticules, celles-ci sont dispersées et sélectionnées en taille par filtration tel que décrites dans le Chapitre II. Enfin, il faut concentrer les NPs afin d'injecter une solution la plus concentrée possible (10⁻⁴ mol.L⁻¹ de fluorophore, correspondant à une D.O. d'environ 2 à 415 nm) afin d'avoir une très forte concentration en nanoparticules dans les 200 µL injectés par la suite ce qui permettra la visualisation des microvaisseaux. La concentration est réalisée dans un premier temps grâce à une centrifugation d'une heure à 8000 tr.min⁻¹ puis les NPs sont récupérées dans un volume d'eau plus faible. De plus, il a été

ajouté avant l'injection du chlorure de sodium à raison de 9 g.L^{-1} afin de ne pas créer un choc osmotique entre la solution injectée et le sang (risque d'hémolyse des globules rouges). Pour chaque lot de nanoparticules injectées, la composition et les caractéristiques seront rappelées brièvement, et détaillées dans l'Annexe H.

2.2. Méthode d'observation

La microscopie à deux photons a été réalisée avec un microscope biphoton ZEISS LSM 7 MP (Annexe I). Un laser femtoseconde pulsé et infrarouge est focalisé dans le cerveau de la souris par un objectif à un grandissement de 20x. Le contact entre les tissus et l'objectif est réalisé avec un gel physiologique. La fluorescence est générée uniquement au point focal du laser, et une partie est ensuite collectée par l'objectif et dirigée vers les photomultiplicateurs. Le mouvement du faisceau dans le plan x-y est réalisé par une rotation de miroirs galvanométriques et permet d'obtenir une image de 512 fois 512 pixels en une seconde. La translation motorisée de l'objectif permet une variation de la profondeur d'observation et l'acquisition de piles d'images séparées d'un pas ajustable (minimum $2 \mu\text{m}$). La longueur d'onde d'excitation utilisée est fixée à 800 nm et la puissance incidente de l'excitation peut être modulée manuellement pendant l'acquisition.

2.3. Préparation des animaux

Les nanoparticules ont été injectées dans la circulation sanguine de la souris pour observer la microvascularisation corticale cérébrale par fluorescence. Pour cela, il est nécessaire de faire une craniotomie pour enlever une partie du sommet du crâne afin d'observer la fluorescence de nanoparticules à travers celui-ci. Les souris ont été anesthésiées par un gaz, l'isoflurane, qu'elles inhalent à travers un masque facial avec un mélange d'air (70 %) et d'oxygène (O_2 , 30 %). La concentration de l'isoflurane était de 5 % pour l'induction de l'anesthésie puis de 1,5 % pendant l'opération et l'observation. Une craniotomie de 3 mm de diamètre a été réalisée à la verticale au-dessus du cortex. Le cortex a été exposé de manière protégée par un gel salin physiologique. Les souris ont ensuite été placées sous l'objectif 20x de telle sorte que la partie émergente du cortex cérébral était située sous l'objectif en immersion dans un gel échographique. Pendant les observations, la température physique est contrôlée par une circulation d'eau chaude sous leur corps, tout en maintenant l'anesthésie. Une fois que les souris sont placées et le microscope réglé, les nanoparticules

sont injectées. Les observations sont effectuées quelques secondes après l'injection de nanoparticules. Durant cette phase de l'imagerie, la souris est vivante et le sang circule normalement.

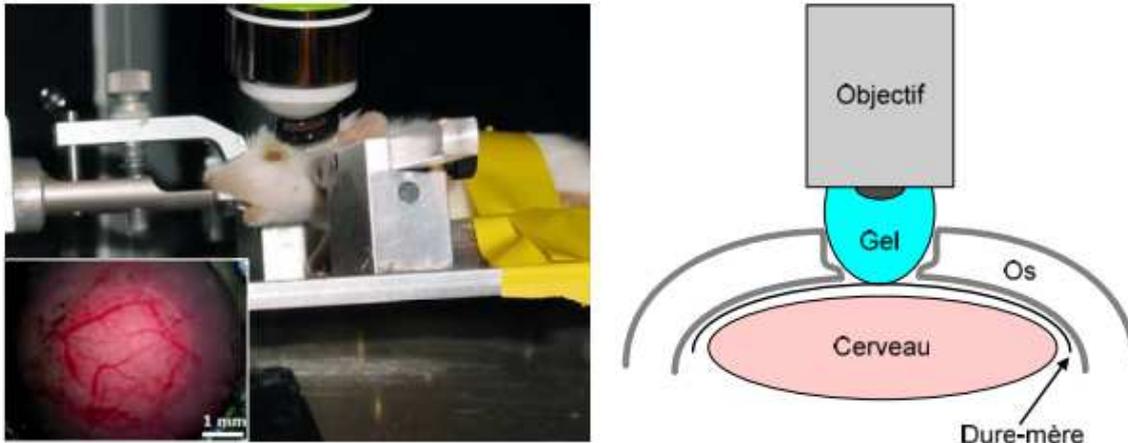


Figure 72: Montage réalisé pour l'imagerie in vivo. La souris est immobilisée après la chirurgie, puis l'objectif est mis en contact avec la surface du cerveau à l'aide d'un gel physiologique (Maurin 2011).

Dans plusieurs expériences, nous avons également procédé à une analyse des organes afin de comprendre la distribution des NPs dans l'organisme. Pour cela, après la première phase d'observation, une autopsie est réalisée sur l'animal sacrifié et l'on récupère les organes tels que le foie, les reins, le cœur, les poumons, et les muscles.

2.4. Acquisition et traitement des images

Après avoir opéré la souris et l'avoir placée sous l'objectif du microscope, nous avons pu procéder à l'imagerie des microvaisseaux. Pour l'imagerie, la principale difficulté consiste à immobiliser l'animal. La durée d'acquisition d'une image étant d'environ 1 s, on doit s'affranchir des mouvements parasites de l'animal (surtout la respiration). Pour cela, la tête de l'animal est généralement immobilisée dans un cadre stéréotaxique. L'utilisation d'une anesthésie appropriée permet aussi de limiter ces mouvements. Selon les paramètres du microscope, une image en 3 dimensions est réalisée environ en 50 s. Des images ont été enregistrées 5 min après l'injection du traceur, pendant 20 min, afin de suivre l'évolution du passage du traceur. Dans certaines expériences, nous avons soit injecté une deuxième fois des nanoparticules, soit injecté un liquide physiologique afin d'observer plus amplement le devenir des NPs. Après les observations, un traceur de référence (Rhodamine-B dextran 70 kDa, Aldrich-Sigma, France) est injecté pour comparaison avec les résultats obtenus. Au cours des expériences d'imagerie décrites dans ce chapitre, différents paramètres

physiologiques de la souris ont été suivis (rythme cardiaque, saturation d'hémoglobine en O₂) grâce à une sonde pour spectroscopie proche infrarouge placée au niveau d'une patte à l'aide d'une pince. Nous avons ainsi pu suivre l'évolution de la température corporelle des souris.

Les images obtenues sont ensuite analysées et traitées avec ImageJ ou Zen Lite, une version plus légère du logiciel fourni avec le microscope permettant d'accéder à la plupart des paramètres des images. On peut ainsi par exemple séparer les couleurs pour bien discerner les NPs du traceur de référence avant de superposer ces images pour réaliser la comparaison.

2.5. Résultats d'imagerie cérébrale

Lors des premiers tests, avec les particules non-fonctionnalisées (matrice 8TMOS-1C₃O₄ ou 2TMOS-1TMSE, $s = 500$, diamètre hydrodynamique = environ 80 nm) ayant un potentiel zêta d'environ -40 mV, aucun signal de fluorescence au niveau du cerveau des animaux avait été obtenu, 5 min après l'injection des particules dans le flux sanguin de la souris. Les particules ont donc certainement été éliminées du système sanguin de l'animal (Philipot 2010). L'injection des nanoparticules dans le flux sanguin des souris ne provoque, par contre, aucun effet néfaste sur le comportement vital de la souris. Suite à leur injection dans le système vasculaire du petit animal, les particules sont détectées comme corps étranger principalement par les macrophages et envoyées vers les organes filtrants tels que le foie et les reins, comme l'a démontré une autopsie de l'animal après l'injection. Il est donc impératif d'augmenter la furtivité des particules afin de rendre possible l'imagerie du système sanguin à l'aide de ce type de traceur.

2.5.1. Premiers tests *in vivo* après post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes avec des sous-unités PEG courtes (PEG400-Si)

Avec les particules (CMONS, matrice 8TMOS-1C₃O₄, $s = 500$, diamètre hydrodynamique = 90 nm) post-fonctionnalisées avec des chaînes pégylées courtes (PEG400-Si) avec un potentiel autour de -28 mV (cf. lot 1, Annexe H), des nanoparticules ont enfin pu être observées, 5 min après injection, au niveau du cerveau (Figure 73). Comme résultat intéressant et important, nous pouvons identifier les larges vaisseaux sanguins du cortex cérébral dans ces conditions. Cependant contrairement à ce que l'on pouvait prévoir, les

particules ne sont pas en circulation dans le flux sanguin et ne colorent donc pas l'ensemble des vaisseaux, mais sont collées sur les parois. L'existence de ces interactions non spécifiques est certainement due à l'utilisation de PEG court (PEG400-Si) combinée à une post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes en voie aqueuse peu efficace. Les nanoparticules obtenues sont certainement trop peu fonctionnalisées et possèdent un potentiel zêta négatif assez important (-28 mV) ce qui favorise les interactions non spécifiques sur les parois des vaisseaux.

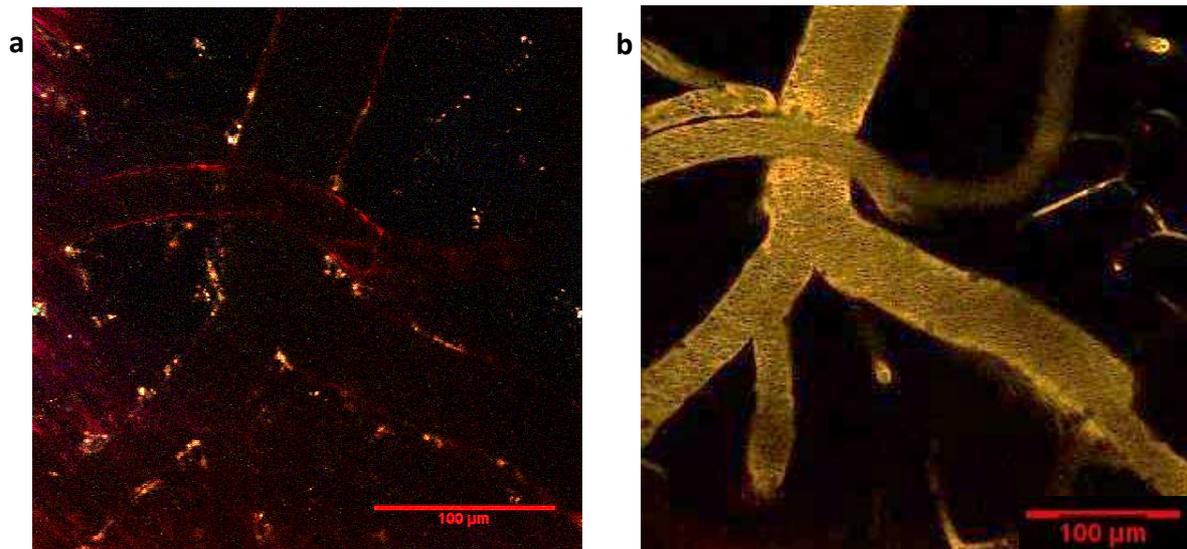


Figure 73: Imagerie de la microvascularisation. (a) Imagerie avec des NPs fonctionnalisées avec des précurseurs de PEG courts. Les NPs sont collées aux parois. (b) Imagerie de la même zone après injection du colorant de référence FITC-dextran.

Ce résultat préliminaire est cependant encourageant car les nanoparticules ont circulé, même sur un temps très court, puisqu'elles sont arrivées jusqu'au système vasculaire cérébral. L'amélioration de la fonctionnalisation devrait donc permettre une diminution des interactions non spécifiques entre les particules et les parois des vaisseaux et une augmentation de la durée de circulation.

2.5.2. Deuxième série d'imagerie *in vivo* avec différentes stratégies de fonctionnalisation

Lors d'une deuxième série de tests *in vivo*, l'accent a été mis sur la post-fonctionnalisation des NPs par les différentes stratégies décrites dans la partie 2.2 du Chapitre II: pégylation par post-fonctionnalisation aqueuse avec des sous-unités PEG plus longues (PEG2000-Si), et greffage du polymère chitosane. En effet, on peut s'attendre à une meilleure circulation des NPs grâce à encombrement stérique plus important (sous-unités PEG longues) ou un

potentiel électrique faiblement positif (chitosane), minimisant les interactions non spécifiques avec les parois des vaisseaux. Dans cette série, les NPs sont constituées d'un cœur cristallin de CMONS avec une matrice 8TMOS-1C₃O₄, un taux de solvant à $s = 500$. Les images sont réalisées 5 min après l'injection des NPs. Le traceur de référence injecté ensuite (10 min après l'injection des NPs) pour comparaison est le rhodamine-dextran, représenté en rouge sur les images *in vivo*.

2.5.2.1. Tests avec greffage de sous-unités PEG longues

Avec les particules post-fonctionnalisées par greffage d'organosilanes avec des sous-unités PEG longues (PEG2000-Si) avec un potentiel zêta autour de -25 mV (lot 2, Annexe H), nous avons pu observer, 5 min après injection, un signal de fluorescence correspondant au CMONS, au niveau du cerveau. Néanmoins, les nanoparticules, comme dans le cas de la post-fonctionnalisation par des PEGs courts, et ne sont pas en circulation dans le flux sanguin mais sont fixées dans le cerveau. Cependant l'image obtenue est différente que dans le cas d'une fonctionnalisation par PEGs courts. Les nanoparticules n'ont pas adhéré à la surface des grosses artères mais semblent dispersées sur l'ensemble du système sanguin du cerveau de la souris. L'image (Figure 74a) est le résultat obtenu après l'injection du colorant de contrôle (Rhodamine-dextran). Comme on peut l'observer, il n'y a pas de superposition entre le colorant de référence injecté, en circulation dans le flux sanguin et les nanoparticules (points verts). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les nanoparticules ont bouché des micro-vaisseaux empêchant la circulation du colorant de référence dans ces zones de la vascularisation. Ceci est peut être provoqué par l'agrégation des particules dans les micro-vaisseaux ou l'adhésion de ceux-ci sur les parois provoquant l'impossibilité de circulation du colorant de référence. Après dissection de l'animal, nous avons récupéré le rein et le foie. Une quantité très faible de nanoparticules se trouvaient dans le rein, mais nous avons pu observer une plus grande quantité de NPs dans le foie (points verts dans Figure 74b). Le foie est un des organes où s'accumulent normalement des objets de taille bien supérieure à 100 nm. Le fait que les nanoparticules se soient plus accumulées dans le foie que les reins indique probablement une agglomération partielle ou importante des NPs dans le sang.

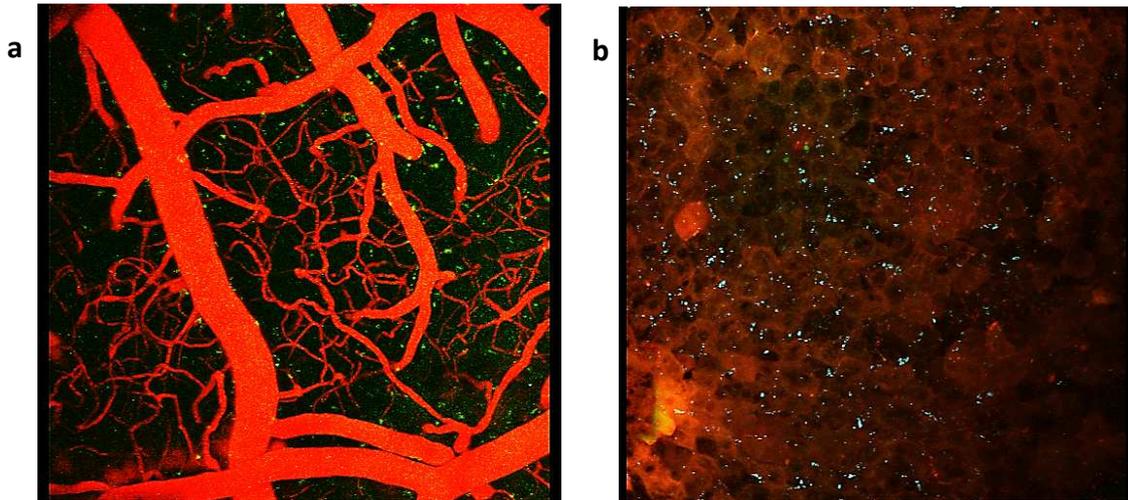


Figure 74: Imagerie *in vivo* avec les NPs CMONS-8TMOS-1C₃O₄ fonctionnalisées avec des précurseurs de PEG longs, le rouge étant le marquage par le rhodamine-dextran. Les particules dans le cerveau sont ici représentées par les points verts. (a) Image de la vascularisation. (b) Dans le foie, on observe des points verts.

2.5.2.2. Tests avec le chitosane

Les particules fonctionnalisées avec le chitosane (~100 kDa) présentaient un diamètre apparent de 120 nm et un potentiel zêta autour de 10 mV (lot 3, annexe H). Dans ce cas, comme pour l'expérience précédente avec une post-fonctionnalisation par des PEGs longs, les NPs se sont fixées dans le cerveau et ont certainement bouché des micro-vaisseaux (Figure 75a). En faisant un zoom sur une zone du cerveau (Figure 75b), on observe également des zones non marquées dans les micro-vaisseaux marqués à la rhodamine-dextran ce qui confirme l'hypothèse d'une embolie à l'intérieur de ces vaisseaux qui empêche le colorant de circuler. Néanmoins, après dissection de l'animal, les nanoparticules ont été retrouvées à forte concentration dans les reins (Figure 75, c). Les reins étant l'organe d'élimination de petits objets ayant circulé dans le sang, cela montre que les NPs ont bien circulé dans un premier temps. Néanmoins, la totalité des nanoparticules ne semble pas être dans les reins, il semble qu'une partie se soit à nouveau accumulée dans le foie.

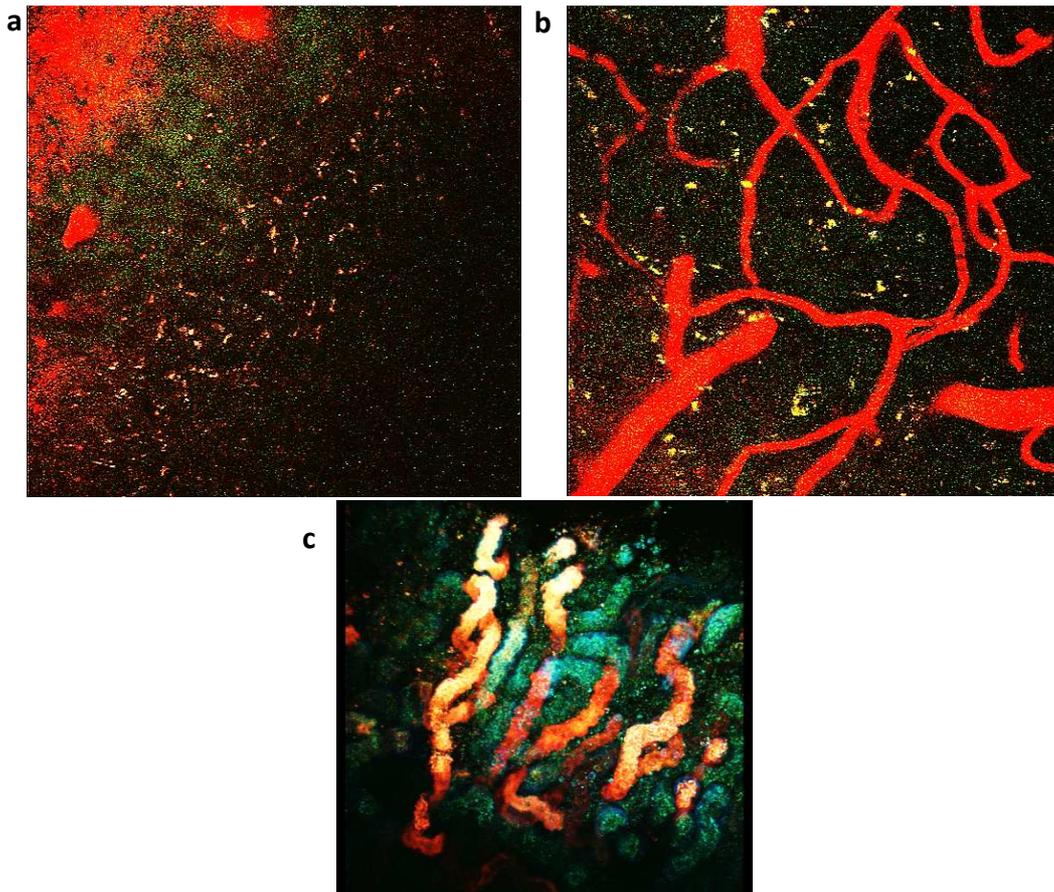


Figure 75: Images *in vivo* avec les NPs CMONS-8TMOS-1C₃O₄ fonctionnalisées avec le chitosane, le rouge étant le marquage par le rhodamine-dextran. Les particules dans le cerveau sont ici représentées par les points jaunes. (a) Imagerie de la vascularisation (b) Zoom sur une zone du cerveau avec des NPs en jaunes. (c) Dans les reins, on observe de nombreuses NPs (jaune-vert).

2.5.2.3. Conclusions sur la deuxième série de tests *in vivo*

Lors de ces premiers tests *in-vivo* sur des nanoparticules fonctionnalisées, nous observons une amélioration par rapport aux observations effectuées sur des nanoparticules non fonctionnelles. Le greffage de sous unités PEG courtes (PEG400-Si) a permis une circulation des nanoparticules jusqu'à la vascularisation cérébrale. Cependant, lors de la constitution de l'image, 5 min après l'injection, les nanoparticules ne sont plus en circulation dans le flux sanguin de la souris mais une partie adhère à la paroi des vaisseaux par des interactions non spécifiques. Le greffage de sous unités PEG plus longues (PEG2000-Si) ou de chitosane semble diminuer les interactions non spécifiques des nanoparticules mais la durée de vie de circulation des nanoparticules dans le sang reste courte, inférieure à 5 min puisqu'aucune circulation des nanoparticules n'est observée au moment de la prise d'image (5 min après l'injection). Il semblerait qu'une partie des nanoparticules soient venues boucher (par agrégation ou adhésion non spécifique) la micro-vascularisation cérébrale des animaux. La

post-fonctionnalisation par greffage d'organosilanes en solution aqueuse n'est donc pas suffisamment efficace pour garantir une durée de vie de circulation dans le flux sanguin importante ; mais a permis une circulation sur un temps bref comme l'atteste la présence de nanoparticules au niveau de la vascularisation cérébrale. Afin de visualiser la circulation des nanoparticules sur un temps court, nous avons donc effectué, par la suite, la capture d'image dès les premiers instants de l'injection des nanoparticules.

2.5.3. Cinétique de circulation des nanoparticules dans le flux sanguin

L'observation des nanoparticules au niveau de la vascularisation cérébrale des souris, ainsi que la présence de ces objets dans les organes filtrants semble indiquer qu'il y a eu circulation dans le flux sanguin, durant un temps court, inférieur à 5 min. En effet, les images sont prises 5 min après l'injection et démontrent qu'il n'y a plus de nanoparticules en circulation dans le flux sanguin à ce temps ΔT après l'injection. Une nouvelle campagne d'injection a donc été effectuée afin de tenter de visualiser la circulation des nanoparticules dans les premiers instants après l'injection. Afin d'espérer augmenter légèrement le temps de circulation des nanoparticules dans le flux sanguin, nous avons décidé d'utiliser des nanoparticules basées sur la matrice 2TMOS-1TMSE, présentant comme évoqué dans le chapitre II, des tailles inférieures à celles obtenues dans le cas de la matrice 8TMOS-1C₃O₄. Ces NPs présentent une répartition de taille autour de 60 nm en DLS (Figure 76).

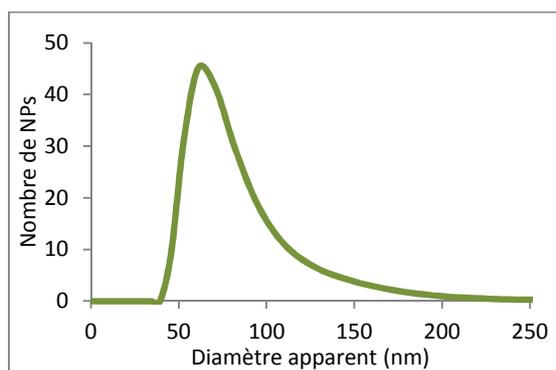


Figure 76: Diamètre apparent en DLS des NPs CMONS-2TMOS-1TMSE.

Ces NPs sont ensuite dispersées dans la soude et filtrées comme décrit dans les chapitres précédents, puis fonctionnalisées avec les sous-unités de PEG longues (PEG2000-Si) (lot 4, Annexe H). Après fonctionnalisation et lavages, les NPs ont été concentrées par centrifugation pendant une heure à 8000 tr.min⁻¹ puis reprises dans un plus petit volume d'eau (densité optique 2,5). Le diamètre hydrodynamique de ces

nanoparticules fonctionnalisées est de 80 nm (Figure 77a) et le potentiel zêta de -20 mV (Figure 77b). Enfin, les particules ont été mises en condition saline (9 g.L^{-1} de NaCl) ce qui n'a pas perturbé leur stabilité colloïdale.

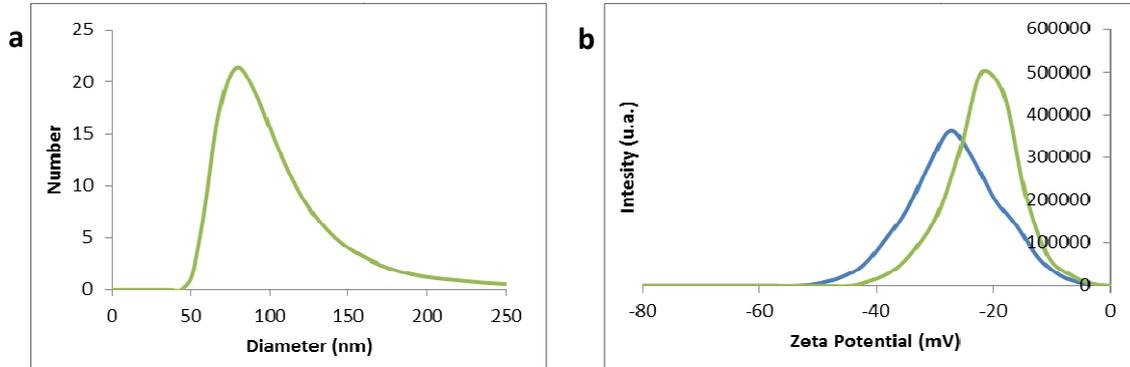


Figure 77: Caractérisation des NPs CMONS-2TMOS-1TMSE. (a) Diamètre apparent des NPs fonctionnalisées avec PEG2000-Si. (b) Potentiel zêta des NPs fonctionnalisées (courbe verte) comparé aux NPs non fonctionnalisées (courbe bleue).

Des expériences d'imagerie *in vivo* ont été réalisées avec ces nanoparticules mais contrairement aux premières expériences présentées, la collecte d'image a été débutée avant l'injection des NPs afin de pouvoir observer, dès leur premier passage dans le système sanguin, la circulation des NPs. Une image est constituée toutes les 51 s. Lors de l'injection des NPs (après l'acquisition de la première image), nous avons pu observer la circulation des NPs (Figure 78). Comme le montre cette succession d'images, les NPs semblent bien circuler dans le flux sanguin pendant un temps court. Une grande partie du signal disparaît après 1 min, puis progressivement pour pratiquement être nulle après 3 min. Comme le montre cette étude, une très petite partie des nanoparticules injectées reste collée à la surface des vaisseaux et micro vaisseaux. C'est logiquement ce signal qui avait été observée précédemment lorsque nous enregistrons les images 5 min après l'injection. Après 10 min, nous avons ensuite injecté le colorant de référence (rhodamine-dextran). La dernière image de cette série (Figure 78) permet ainsi de visualiser la position des vaisseaux pour comparer avec les images réalisées uniquement avec les NPs, qui ont effectivement circulé dans les vaisseaux auparavant. De plus, on voit à nouveau des NPs passer juste après injection du rhodamine-dextran. Ce résultat indique qu'une partie des particules s'étaient collées dans le circuit sanguin et sont décrochées par le passage du produit.

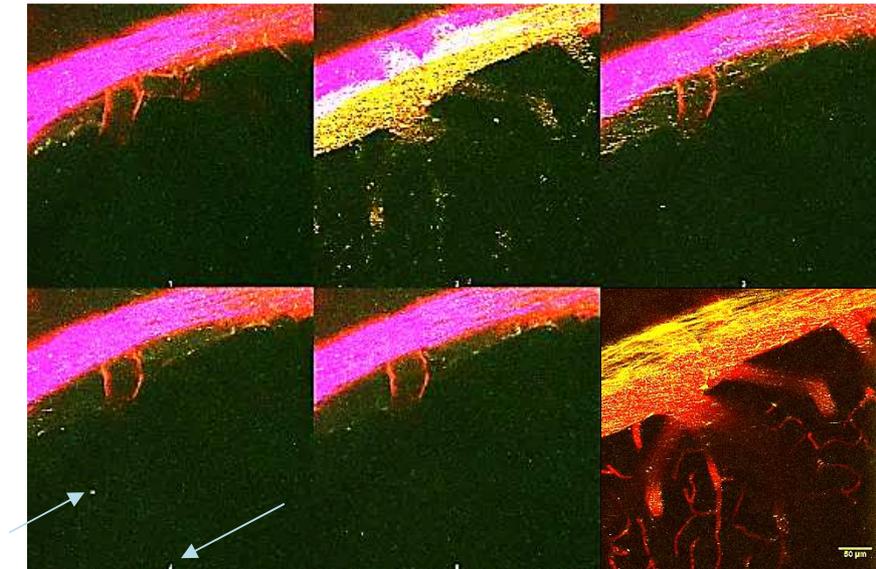


Figure 78: Imagerie des vaisseaux sanguins du cortex cérébral. Les NPs sont représentées en jaune, le rouge étant un bruit de fond (pas d'autre colorant ici). 51 secondes séparent deux images consécutives. La dernière image représente l'imagerie de la même zone après injection du colorant de référence (rhodamine-dextran).

Lors de la même série d'essais, les mêmes cinétiques d'imagerie ont été réalisées avec des nanoparticules non fonctionnalisées afin de compléter notre étude. Comme nous nous attendions à une durée de circulation encore plus courte en raison de l'absence d'une fonctionnalisation de surface, une image est constituée toute les 30 secondes afin d'espérer détecter la circulation brève de ces NPs. Les cinétiques ont été réalisées avec des NPs cœur-coquille CMONS pour les deux matrices silicatées 2TMOS-1TMSE sans fonctionnalisation (lot 5, Annexe H) et 8TMOS-1C₃O₄ sans fonctionnalisation (lot 6, Annexe H). Les résultats sont repris dans les Figure 79a et Figure 79b. Comme prévu, nous observons une circulation, dans les vaisseaux sanguins, très courte (30 s à 1 min). De plus, comme le montrent ces images, la coloration des vaisseaux sanguins n'est pas homogène mais constitué de gros grains semblant indiquer une agrégation rapide des NPs dans le sang. Une quantité plus importante de NPs, que dans le cas des NPs fonctionnalisées, reste collée sur les parois des vaisseaux en raison des phénomènes d'agrégation et d'interactions non spécifiques. La post-fonctionnalisation aqueuse par greffage d'organosilanes améliore donc légèrement la stabilité colloïdale de ces systèmes mais n'est pas suffisamment efficace pour obtenir des temps de circulation longs permettant de réaliser des imageries performantes.

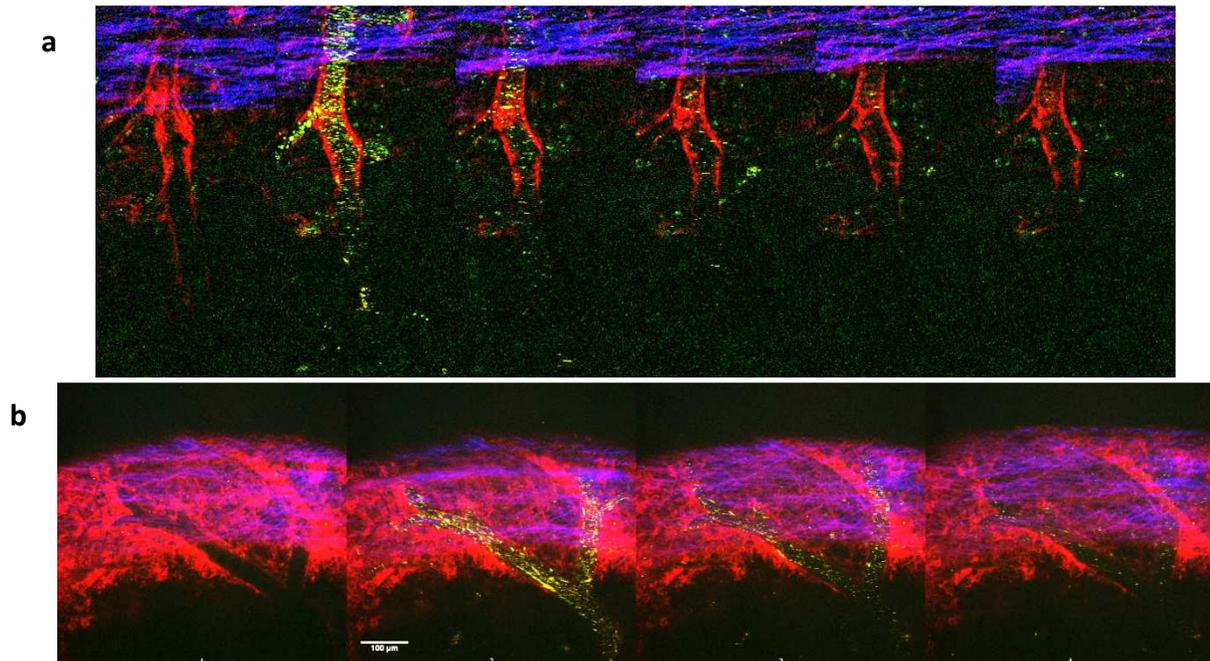


Figure 79: Imagerie des vaisseaux sanguins du cortex cérébral. Les NPs sont représentées en jaune, le rouge étant un bruit de fond (pas d'autre colorant ici). (a) NPs CMONS-2TMOS-1TMSE. 29 secondes séparent deux images consécutives. (b) NPs CMONS-8TMOS-1C₃O₄. 24 secondes séparent deux images consécutives.

Dans tous les cas, nous avons extrait les organes une heure après l'imagerie pour observer dans quels organes les NPs se sont accumulées parmi le foie, les reins, les poumons, le cœur, et le muscle. Les particules ont été en grande partie retrouvées dans le foie. Elles circulent donc assez longtemps pour ne pas s'accumuler auparavant dans les organes dans lesquels elles passent en premier après injection : poumons et cœur. Une imagerie des poumons et du cœur a confirmé l'absence de nanoparticules dans ces organes.

3. Conclusion sur l'imagerie de la microvascularisation avec les nanoparticules cœur-coquille

Dans ce dernier chapitre, nous avons abordé dans un premier temps une étude de la stabilité colloïdale en milieux complexes, essentielle pour la compréhension des phénomènes pouvant se produire *in vivo*. Lors des expériences d'imagerie de la vascularisation cérébrale, nous avons pu observer des premiers progrès en ce qui concerne la furtivité des nanoparticules après injection dans la souris. Il a été montré que le contrôle de la taille des nanoparticules, leur chimie de surface, et leur stabilité colloïdale en milieu salin sont de nombreux facteurs qui influencent le devenir des nanoparticules dans le sang. En effet une déstabilisation colloïdale au contact du sang peut entraîner l'agrégation des NPs qui a pour résultat une augmentation du diamètre apparent entraînant ainsi d'une part des

embolies des micro-vaisseaux, d'autre part une élimination trop rapide de la circulation sanguine. Le tableau ci-dessous résume les effets observés pour les différents lots de NPs, 5 min après injection pour les lots 1-3 et avec une imagerie débutée avant injection pour les lots 4-6.

N° lot	Composition	Chimie de surface	Diamètre DLS	Potentiel zêta	Effet observé
Observation APRES injection des nanoparticules					
1 5 min	8TMOS-1C ₃ O ₄ CMONS	PEG400-Si	90 nm	-28 mV	NPs collées aux parois
2 5 min	8TMOS-1C ₃ O ₄ CMONS	PEG2000-Si	120 nm	-25 mV	Embolies Présence dans le foie
3 5 min	8TMOS-1C ₃ O ₄ CMONS	Chitosane	120 nm	+10 mV	Embolies Présence dans reins et foie
Début de l'observation AVANT injection des nanoparticules					
4 -1 min	2TMOS-1TMSE CMONS	PEG2000-Si	80 nm	-20 mV	Circulation brève
5 -1 min	2TMOS-1TMSE CMONS	aucune	80 nm	-30 mV	Circulation brève + NPs collées
6 -1 min	8TMOS-1C ₃ O ₄ CMONS	aucune	80 nm	-38 mV	Circulation brève + NPs collées

Tableau 10 : Effets observés *in vivo* lors de l'injection des différents lots de nanoparticules.

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules avec des précurseurs de PEG courts (PEG400-Si) a dans un premier temps permis de visualiser enfin ces NPs au niveau du cerveau mais des interactions non spécifiques avec les parois restent importantes diminuant fortement la durée de vie de circulation. Les tests de fonctionnalisation suivants (sous-unité de PEG2000-Si et chitosane) ont permis une amélioration en diminuant les interactions non spécifiques. Néanmoins, une instabilité colloïdale au contact du sang entraînant une

agglomération des NPs ou des interactions non spécifiques encore présentes provoquent l'embolie dans les micro-vaisseaux. Des études complémentaires sur des temps très courts après l'injection ont permis de mettre en évidence la durée de vie de circulation très courte des nanoparticules dans le flux sanguin. Il semble que les NPs ne soient pas complètement furtives, ainsi elles sont rapidement éliminées de la circulation sanguine est réalisée par les macrophages lors de la circulation des nanoparticules (cf. Chap I). Ainsi, es études complémentaires devraient permettre de mieux comprendre le devenir des particules dans la circulation. Dans un premier temps, il s'agira d'étudier le comportement des suspensions de nanoparticules en présence d'un milieu plus proche du sang (plasma sanguin avec ou sans protéines) afin de mieux comprendre les interactions qui peuvent se produire avec les nombreux éléments contenus dans la circulation sanguine. D'autre part, il est important de bien différencier les phénomènes d'embolie dans les vaisseaux sanguins et la phagocytose par les macrophages. Par exemple, il pourrait être intéressant de marquer les macrophages, pour observer leur présence et leur devenir avant et après injection des nanoparticules cœur-coquille. Enfin, les autres voies de fonctionnalisation ("*click*" *chemistry*, phosphonate) seront testées afin de vérifier si elles améliorent la durée de vie de circulation des nanoparticules.

Conclusion générale et perspectives

"Les choses mystérieuses ne s'expliquent que par des choses plus mystérieuses encore."

Jean Ray

Les objectifs de cette thèse étaient de mettre au point et d'adapter les paramètres de synthèse de nanoparticules hybrides constituées d'un cœur organique monocristallin enrobé d'une coquille silicatée, de remplacer le fluorophore actuellement utilisé par de nouvelles molécules organiques émettant dans le rouge (fenêtre de transparence biologique) à l'état cristallin. Le but est d'améliorer le rapport signal/bruit lors d'une imagerie intravitale, et d'augmenter la stabilité colloïdale de ces objets dans les milieux physiologiques ainsi que leur furtivité pour leur utilisation en tant qu'agent imageant circulant dans les vaisseaux sanguins du petit animal.

La production par la méthode de *spray-drying* est maintenant bien maîtrisée et nous sommes capables de moduler la composition de la coquille silicatée afin de modifier les propriétés de dispersion en solution aqueuse, la charge de surface des particules ou les fonctions chimiques de surface. Nous avons montré que la composition de la matrice peut jouer un rôle important sur les caractéristiques spectroscopiques des nanoparticules obtenues, dans le cas de l'utilisation du fluorophore de référence, le CMONS et le premier fluorophore GE1 issu de l'ingénierie moléculaire réalisée à l'ENS-Lyon. La composition des sols ainsi que les paramètres physiques de synthèse influencent la nanocristallisation de ce fluorophore organique et jouent un rôle sur l'obtention de différents polymorphes du CMONS au sein des nanoparticules, présentant des propriétés spectroscopiques variable (longueur d'onde d'émission, signal SHG...). L'ingénierie de nouveaux fluorophores émettant dans le rouge – proche IR a été réalisée avec succès par Gwenaëlle Eucat (thèse en co-tutelle) et nous avons encapsulé ces nouveaux fluorophores dans les nanoparticules hybrides. L'encapsulation avec plusieurs fluorophores différents a pu être adaptée, montrant bien le caractère générique du processus de synthèse des nanoparticules.

Différentes stratégies de fonctionnalisation en milieu aqueux ont permis d'améliorer la circulation du traceur dans le flux sanguin du petit animal. Une meilleure compréhension de la stabilité colloïdale en milieu salin et à 37° C est essentielle pour la compréhension des phénomènes pouvant se produire *in vivo*. Nous avons montré que la post-fonctionnalisation des particules par greffage d'organosilanes possédant des sous-unités PEG ou par assemblage avec des polymères de chitosane améliore cette stabilité colloïdale. L'injection de ces nanoparticules fonctionnelles démontre l'influence de la chimie de surface sur les

propriétés de circulation de ces objets dans le flux sanguin du petit animal. Ainsi, la fonctionnalisation de surface par des sous-unités PEG longues (PEG2000-Si) permet une diminution des interactions non spécifiques sur les parois des vaisseaux sanguins. Cependant la durée de vie de circulation de ces objets dans le flux sanguin reste très courte (de l'ordre de une à trois minutes) et des problèmes spécifiques d'instabilités colloïdale dans un milieu complexe tel que le sang restent présents ; ceci en raison certainement de la faible efficacité et la non reproductibilité de la fonctionnalisation par greffage d'organosilanes en milieu aqueux.

Au vue de ces difficultés rencontrées lors de l'étape de post-fonctionnalisation des NPs en milieu aqueux, nous avons introduit des groupements fonctionnels de surface directement lors de la synthèse en modulant la composition chimique des précurseurs silicatés dans le sol de départ. Ainsi, l'obtention de nanoparticules présentant des groupements *clickables* au sein de la matrice silicatée ouvre la voie à une fonctionnalisation plus efficace en milieu aqueux permettant une amélioration des propriétés de stabilité colloïdale et de furtivité ainsi que la possibilité de développer des stratégies de ciblage de zones cancéreuses.

L'obtention de nanoparticules possédant un cœur organique émettant dans le rouge et le proche infra-rouge devrait permettre une profondeur d'imagerie plus importante en raison d'un meilleur rapport signal sur bruit.

L'enjeu principal pour l'utilisation de ces nanoparticules *in vivo* est maintenant l'optimisation de la fonctionnalisation. La nécessité de fonctionnaliser ces objets en phase aqueuse est une contrainte importante. Les voies de fonctionnalisation par co-condensation développées dans ce travail sont prometteuses. Ainsi, des nanoparticules fonctionnalisées par cette stratégie pourront être testées très rapidement. Le développement de la chimie *click* pour le greffage de sous unités PEG longues ou dendritiques sera développé à très court terme. La mesure du temps de vie de circulation par cette nouvelle approche sera effectuée afin de valider celle-ci. Pour ces NPs fonctionnalisées, il faudra procéder à des études complémentaires afin d'étudier le comportement des suspensions de nanoparticules en présence d'un milieu plus proche du sang (plasma sanguin avec ou sans protéines) afin de

mieux comprendre les interactions qui peuvent se produire avec les nombreux éléments contenus dans la circulation sanguine, notamment les protéines.

A terme, lorsque la furtivité *in vivo* des nanoparticules sera améliorée pour permettre une circulation assez longue (quelques heures) dans le système sanguin, le greffage à leur surface d'un agent de ciblage (par exemple la RGD) peut être envisagée afin de favoriser l'accumulation des NPs directement dans une tumeur.

Enfin, on peut imaginer d'autres applications, que l'imagerie de la micro-vascularisation, à ces nanoparticules hybrides cœur-coquille développées au laboratoire. Les interactions nombreuses entre les nanoparticules et les protéines peuvent par exemple permettre de développer un système de capture de protéines dans la circulation sanguine. La modularité importante de ce type de particules pourrait aussi permettre d'y encapsuler ou greffer d'autres particules ou molécules pour créer une plateforme combinée d'imagerie et de libération d'un traitement. Ainsi, les nanoparticules pourraient servir de base pour créer des agents théranostiques (Ahmed et al. 2012; J. Xie et al. 2010).

En résumé, ces travaux contribuent aux avancements pour le développement des nanoparticules fluorescentes pour l'imagerie médicale, mais montrent aussi que améliorations sont encore nécessaires pour rendre ces nanoparticules entièrement furtives, afin d'ouvrir des perspectives intéressantes pour l'imagerie *in vivo* qui un défi très relevé.

Bibliographie

- Ahmed N, Fessi H & Elaissari A (2012) Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discovery Today* **17**(17-18), 928–934.
- Andrieux K, Lesieur P, Lesieur S, Ollivon M & Gabrielle-Madelmont C (2002) Characterisation of FITC-dextranes used in vesicle permeability studies. *Analytical Chemistry* **74**, 5217–5226.
- Bae SW, Tan W & Hong J-I (2012) Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications. *Chemical Communications* **48**(17), 2270–2282.
- Bagwe RP, Hilliard LR & Tan W (2006) Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* **22**(9), 4357–4362.
- Balasubramanian H (2007) Two photon luminescence from quantum dots using broad and narrowband ultrafast laser pulses. *PhD of Texas A&M University*.
- Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP & Waggoner AS (2004) Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chemistry* **15**(1), 79–86.
- Bawendi MG, Steigerwald ML & Brus LE (1990) The quantum mechanics of larger semiconductor clusters (“Quantum Dots”). *Annual Review of Physical Chemistry* **41**(1), 477–496.
- Bergman L, Rosenholm J, Öst A-B, Duchanoy A, Kankaanpää P, Heino J & Lindén M (2008) On the complexity of electrostatic suspension stabilization of functionalized silica nanoparticles for biotargeting and imaging applications. *Journal of Nanomaterials* **2008**, 1–9.
- Bhattacharyya S, Wang H & Ducheyne P (2012) Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for the controlled release of macromolecules. *Acta Biomaterialia* **8**(9), 3429–3435.
- Binaghi M, Kamoun MM & Coscas G (1984) Apport de l’angiographie dans le diagnostic de périartérite noueuse. *Journal Français d’Ophtalmologie* **7**(1), 19–30.
- Boca SC, Potara M, Toderas F, Stephan O, Baldeck PL & Astilean S (2011) Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on chinese hamster ovary cells. *Materials Science and Engineering C* **31**(2), 184–189.
- Brasselet S, Le Floc’h V, Treussart F, Roch J-F, Zyss J, Botzung-Appert E & Ibanez A (2004) *In situ* diagnostics of the crystalline nature of single organic nanocrystals by nonlinear microscopy. *Physical Review Letters* **92**, 2074011-2074014.
- Burns A, Ow H & Wiesner U (2006) Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards “Lab on a Particle” architectures for nanobiotechnology. *Chemical Society Reviews* **35**(11), 1028–1042.

- Calvo P, Gouritin B, Angelo JD, Noel JP, Georjgin D, Fattal E, Andreux JP & Couvreur P (2001) Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharmaceutical Research* **18**(8), 1157–1166.
- Cho M, Cho W-S, Choi M, Kim S J, Han BS, Kim SH, Kim HO, Sheen YY & Jeong J (2009) The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters* **189**(3), 177–183.
- Danhier F, Feron O & Pr eat V (2010) To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* **148**(2), 135–146.
- Denk W, Strickler J & Webb W (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**(4951), 73–76.
- Derfus AM, Chan WCW & Bhatia SN (2004) Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* **4**, 11–18.
- Dreyer C, Raymond E & Faivre S (2009) Targeted therapies and their indications in solid neoplasias. *La Revue de M decine Interne* **30**(5), 416–424.
- El Malti W, Mongin O, Blanchard-Desce M, Raehm L & Durand J-O (2011) Functionalisation of mesoporous silica nanoparticles with 3-isocyanatopropyltrichlorosilane. *Comptes Rendus Chimie* **14**(12), 1055–1058.
- Eucat G (2014) Ingénierie moléculaire de nouveaux fluorophores et élaboration de traceurs c ur - coquille pour l'imagerie médicale. *Thèse de l'Université de Grenoble*.
- Ferrara N & Henzel W (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **161**(2), 851–858.
- Fery-Forgues S, Veessler S, Fellows WB, Tolbert LM & Solntsev KM (2013) Microcrystals with enhanced emission prepared from hydrophobic analogues of the green fluorescent protein chromophore via reprecipitation. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* **29**(47), 14718–14727.
- Ftouni H (2012) Ingénierie moléculaire de fluorophores absorbants biphotoniques pour des applications biologiques. *Thèse de l'Université de Strasbourg*.
- Gallagher D & Klein LC (1989) Silica membranes by sol-gel process. *Journal of Colloid and Interface Science* **109**, 40–45.
- Gary-Bobo M, Mir Y, Rouxel C, Brevet D, Basile I, Maynadier M, Vaillant O, Mongin O, Blanchard-Desce M, Mor re A, Garcia M, Durand J-O & Raehm L (2011) Mannose-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient two-photon photodynamic therapy of solid tumors. *Angewandte Chemie* **123**(48), 11627–11631.

- Gary-Bobo M, Mir Y, Rouxel C, Brevet D, Hocine O, Maynadier M, Gallud A, Da Silva A, Mongin O, Blanchard-Desce M, Richeter S, Loock B, Maillard P, Morère A, Garcia M, Raehm L & Durand J-O (2012) Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the *in vitro* treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **432**(1-2), 99–104.
- Göppert-Mayer M (1931) Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen Der Physik* **401**(3), 273–294.
- Gravier J, Navarro FP, Delmas T, Mittler F, Couffin A-C, Vinet F & Texier I (2011) Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for *in vivo* fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics* **16**(9), 96010–96013.
- Hayek A, Bolze F, Nicoud J-F, Baldeck PL & Mély Y (2006) Synthesis and characterization of water-soluble two-photon excited blue fluorescent chromophores for bioimaging. *Photochemical & Photobiological Sciences* **5**(1), 102–106.
- He Q, Zhang J, Shi J, Zhu Z, Zhang L, Bu W, Guo L & Chen Y (2010) The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses. *Biomaterials* **31**(6), 1085–1092.
- He Q, Zhang Z, Gao F, Li Y & Shi J (2011) *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation. *Small* **7**(2), 271–280.
- Ibanez A, Marcellin N, Djurado E & Philippot C (2009) Fluorescent nanocrystals encapsulated in an inorganic shell. *Patent*.
- Ibrahim IAM, Zikry AAF & Sharaf MA (2010) Preparation of spherical silica nanoparticles : Stober silica. *Journal of American Science* **6**(11), 985–989.
- Ip AH, Thon SM, Hoogland S, Voznyy O, Zhitomirsky D, Debnath R, Levina L, Rollny LR, Carey GH, Fischer A, Kemp KW, Kramer IJ, Ning Z, Labelle AJ, Chou KW, Amassian A, Sargent EH (2012) Hybrid passivated colloidal quantum dot solids. *Nature Nanotechnology* **7**(9), 577–582.
- Iyer AK, Khaled G, Fang J & Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* **11**(17-18), 812–818.
- Jiang S, Gnanasammandhan MK & Zhang Y (2010) Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles. *Journal of the Royal Society* **7**(42), 3–18.
- Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN & Gambhir SS (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* **6**(4), 715–728.
- Kaiser W & Garrett CGB (1961) Two-photon excitation in $\text{CaF}_2: \text{Eu}^{2+}$. *Physical Review Letters* **7**, 221–232.

- Kim S, Pudavar HE, Bonoiu A & Prasad PN (2007) Aggregation-enhanced fluorescence in organically modified silica nanoparticles: A novel approach toward high-signal-output nanoprobe for two-photon fluorescence bioimaging. *Advanced Materials* **19**(22), 3791–3795.
- Kim S, Ohulchanskyy TY, Baev A & Prasad PN (2009) Synthesis and nanoparticle encapsulation of 3,5-difuranylvinyboradiaza-s-indacenes for near-infrared fluorescence imaging. *Journal of Materials Chemistry* **19**(20), 3181–3188.
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Muñoz Javier A, Gaub HE, Stölzle S, Fertig N, Parak WJ (2005) Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters* **5**(2), 331–338.
- Kloepfer JA, Bradforth SE & Nadeau JL (2005) Photophysical properties of biologically compatible CdSe quantum dot structures. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**(20), 9996–10003.
- Knop K, Hoogenboom R, Fischer D & Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* **49**(36), 6288–6308.
- Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, Clark SW, Bruchez MP, Wise FW & Webb WW (2003) Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*. *Science* **300**(5624), 1434–1436.
- Lee KH, Rah SC & Kim S-G (2008) Formation of monodisperse silver nanoparticles in poly(vinylpyrrolidone) matrix using spray pyrolysis. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **45**(2), 187–193.
- Lee SY, Gradon L, Janeczko S, Iskandar F & Okuyama K (2010) Formation of highly ordered nanostructures by drying micrometer colloidal droplets. *ACS Nano* **4**(8), 4717–4724.
- Lian W, Litherland SA, Badrane H, Tan W, Wu D, Baker HV, Gulig PA, Lim DV, Jin S (2004) Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles. *Analytical Biochemistry* **334**(1), 135–144.
- Ligon L (1998) The mystery of angiography and the “Unawarded” Nobel prize: Egas Moniz and Hans Christian Jacobaeus. *Neurosurgery* **43**(3), 602–611.
- Lu J, Liong M, Zink JI & Tamanoi F (2007) Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small* **3**(8), 1341–1346.
- Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI & Tamanoi F (2010) Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small* **6**(16), 1794–1805.

- Lu J, Li Z, Zink JI & Tamanoi F (2012) *In vivo* tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* **8**(2), 212–220.
- Lu T, Lee H, Chen T, Herchak S, Kim J-H, Fraser SE, Flagan RC, Vahala K (2011) High sensitivity nanoparticle detection using optical microcavities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(15), 5976–5979.
- Lynch I & Dawson KA (2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**(1), 40–47.
- Massin J, Charaf-eddin A, Appaix F & Jacquemin D (2013) A water soluble probe with near infra-red two-photon absorption and polarity-induced fluorescence for cerebral vascular imaging. *Chemical Sciences* **4**, 2833–2843.
- Maurin M (2011) Nanoparticules fluorescentes à base de Pluronic : Application à l' imagerie intravitale de la vascularisation par microscopie à deux photons et au transport de molécules. *Thèse de l'Université de Grenoble*.
- Merian J (2012) Développement et caractérisation *in vivo* de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire. *Thèse de l'Université Paris Descartes*.
- Mérian J, Gravier J, Navarro F & Texier I (2012) Fluorescent nanoprobes dedicated to *in vivo* imaging: from preclinical validations to clinical translation. *Molecules* **17**(5), 5564–5591.
- Moniz E (1933) Cerebral angiography: its application in clinical practice and physiology. *The Lancet* **222**(5751), 1144–1147.
- Na HB & Hyeon T (2009) Nanostructured T1 MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry* **19**(35), 6267–6273.
- Natte K, Behnke T, Orts-Gil G, Würth C, Friedrich JF, Österle W & Resch-Genger U (2012) Synthesis and characterisation of highly fluorescent core-shell nanoparticles based on Alexa dyes. *Journal of Nanoparticle Research* **14**(2), 1–10.
- Nunes A, Al-Jamal KT & Kostarelos K (2012) Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system. *Journal of Controlled Release* **161**(2), 290–306.
- Oliver SN, Perry TT & Dunn PL (1990) Polymorphism and crystal-crystal transformations of the highly optically nonlinear organic compound alpha-[(4'-methoxyphenyl)methylene]-4-nitro-benzeneacetonitrile. *Applied Physics Letters* **56**, 307–309.
- Ow H, Larson DR, Srivastava M, Baird BA, Webb WW & Wiesner U (2005) Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Letters* **5**(1), 113–117.

- Park J-H, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN & Sailor MJ (2008) Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery. *Angewandte Chemie* **47**(38), 7284–7288.
- Penzkofer A & Lu Y (1986) Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration. *Chemical Physics* **103**(2-3), 399–405.
- Philippot C (2010) Elaboration et caractérisations de nanocristaux organiques fluorescents insérés en coquille sol-gel: vers le développement d'un nouveau type d'agent imageant. *Thèse de l'Université de Grenoble*.
- Philippot C, Dubois F, Bacía M, Djurado E & Ibanez A (2010) Fluorescent organic nanocrystal confined in sol-gel matrix for bio-imaging. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **57**(3), 253–257.
- Philippot C, Dubois F, Maurin M, Boury B, Prat A & Ibanez A (2012) New core-shell hybrid nanoparticles for biophotonics: fluorescent organic nanocrystals confined in organosilicate spheres. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 11370–11378.
- Philippot C, Zimmermann J, Dubois F, Bacía M, Boury B, Baldeck PL, Brasselet S & Ibanez A (2013). Polymorphism of CMONS nanocrystals grown in silicate particles through a spray-drying process. *Crystal Growth & Design* **13**(12), 5241–5248.
- Qhobosheane M, Santra S, Zhang P & Tan W (2001) Biochemically functionalized silica nanoparticles. *The Analyst* **126**, 1274–1278.
- Rauch EF & Véron M (2014) Automated crystal orientation and phase mapping in TEM. *Materials Characterization* **98**, 1–9.
- Reisch A, Didier P, Richert L, Oncul S, Arntz Y, Mély Y & Klymchenko AS (2014) Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles. *Nature Communications* **5**.
- Röntgen WC (1896) A new kind of rays. *Nature* **53**(274), 89–95.
- Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV & Sharpless KB (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I) - catalyzed regioselective "Ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **114**(14), 2708–2711.
- Rumberger JA (2002) Noninvasive coronary angiography using computed tomography: ready to kick it up another notch? *Circulation* **106**(16), 2036–2038.
- Santra S, Yang H, Dutta D, Stanley JT, Holloway PH, Tan W, Moudgil BM & Mericle RA (2004) TAT conjugated, FITC doped silica nanoparticles for bioimaging applications. *Chemical Communications* **24**, 2810–2811.

- Sanz N, Baldeck PL, Nicoud J-F, Le Fur Y & Ibanez A (2001) Polymorphism and luminescence properties of CMONS organic crystals: bulk crystals and nanocrystals confined in gell-glasses. *Solid State Sciences* **3**(8), 867–875.
- Sapsford KE, Pons T, Medintz IL & Mattoussi H (2006) Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors* **6**(8), 925–953.
- Sarkar B, Venugopal V, Tsianou M & Alexandridis P (2013) Adsorption of pluronic block copolymers on silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces A* **422**, 155–164.
- Seldinger SI (1953) Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography: a new technique. *Acta Radiologica [Old Series]* **39**(5), 368–376.
- Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S & Moudgil B (2006) Nanoparticles for bioimaging. *Advances in Colloid and Interface Science* **123-126**, 471–485.
- Sperling RA (2008) Surface modification and functionalization of colloidal nanoparticles. *PhD of Philipps-Universität Marburg*.
- Sperling RA & Parak WJ (2010) Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**(1915), 1333–1383.
- Stöber W (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range 1. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62–69.
- Tang H, Guo J, Sun Y, Chang B, Ren Q & Yang W (2011) Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **421**(2), 388–396.
- Thanh NTK & Green LAW (2010) Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* **5**(3), 213–230.
- Thibault F, Rixe O, Meric J-B, Renard-Penna R, Boostan H, Mozer P, Comperat E, Richard F, Bitker M-O (2008) Neoadjuvant therapy for renal cancer. *Progrès En Urologie : Journal de l'Association Française d'Urologie* **18**(4), 256–258.
- Tran HN, Lien Nghiem TH, Duong Vu TT, Pham MT, Nguyen TV, Tran TT, Chu VT, Tong KT, Tran TT, Xuan Le TT, Brochon J-C, Nguyen TQ, Hoang MN, Duong CN, Nguyen TT, Hong AT, Nguyen PH (2013) Dye-doped silica-based nanoparticles for bioapplications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **4**(4), 1–13.
- Tripp CP & Hair ML (1993) Measurement of polymer adsorption on colloidal silica by *in situ* transmission Fourier transform infrared spectroscopy. *Langmuir* **9**(12), 3523–3529.
- Van Vlerken LE, Vyas TK & Amiji MM (2007) Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research* **24**(8), 1405–1414.

- Vérant P, Serduc R, Van der Sanden B, Rémy C & Vial JC (2006). A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* **27**(5), 1072–1081.
- Vo-Dinh T (2003) *Biomedical photonics handbook* (CRC Press).
- Vrcelj RM, Shepherd EEA, Yoon C-S, Sherwood JN & Kennedy AR (2002) Preparation and structural evaluation of the conformational polymorphs of α -[(4-methoxyphenyl)methylene]-4-nitrobenzeneacetonitrile. *Crystal Growth & Design* **2**(6), 609–617.
- Wang L & Tan W (2006) Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation. *Nano Letters* **6**(1), 84–88.
- Xie J, Lee S & Chen X (2010) Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**(11), 1064–1079.
- Xie R, Chen K, Chen X & Peng X (2008) 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.
- Xue J, Wang C & Ma Z (2007) A facile method to prepare a series of SiO₂@Au core/shell structured nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* **105**(2-3), 419–425.
- Yan J, Smith JE, Wang K, He X, Wang L & Tan W (2007) Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nanotoday* **2**(3), 44–50.
- Yu MK (2012) Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics* **2**(1), 3–44.
- Zanette EM, Fieschi C, Bozzao L, Roberti C, Toni D, Argentino C & Lenzi GL (1989) Comparison of cerebral angiography and transcranial Doppler sonography in acute stroke. *Stroke* **20**(7), 899–903.
- Zimmer JP, Kim S-W, Ohnishi S, Tanaka E, Frangioni JV & Bawendi MG (2006) 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.

Pages internet et catalogues

Aldrich. (1999) Chitosan – A Technologically Important Biomaterial. *Catalogue*, 53201.

Biology E. (2014) How antibody works and inactivate antigens? *Page internet*:
<http://www.biologyexams4u.com/2012/11/antigen-antibodyinteraction.html>

Brown S & Talbot C (2006) Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. *Cours de l'Université de Bordeaux*.

Louvain Drug Research Institute (2013) Nanomedicines for targeted drug delivery. *Page internet* : <http://www.uclouvain.be/en-449741.html>

Sigma-Aldrich. Chitosan Medium molecular weight. *Page internet*:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=fr®ion=FR>

Zeiss. Detection Principles based on Gemini technology. *Catalogue*.

Annexes

Annexe A : Diffusion dynamique de la lumière

Pour déterminer la distribution de taille des nanoparticules cœur-coquille, nous avons utilisé un appareil utilisant la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) : un Zêtasizer Nano Zs de Malvern. Cette technique permet de mesurer la taille de petites particules suspendues dans un liquide, qui sont dans un état de mouvement brownien. Lorsqu'un laser traverse la solution colloïdale, les particules diffusent la lumière dans différentes directions. Le détecteur mesure l'intensité de la lumière diffusée (Figure I a). A partir de la fluctuation de l'intensité détectée, une fonction d'autocorrélation permet ensuite de calculer la taille des particules qui sont passées devant le faisceau. Les solutions à analyser sont introduites dans des cuves à 4 faces transparentes (Figure I b). Les mesures sur les nanoparticules organosilicatées ont été réalisées dans l'eau, à 25 ou 37 °C. Chaque série de mesures est répétée au moins deux fois, une série étant composée de 15 mesures de 10 secondes.

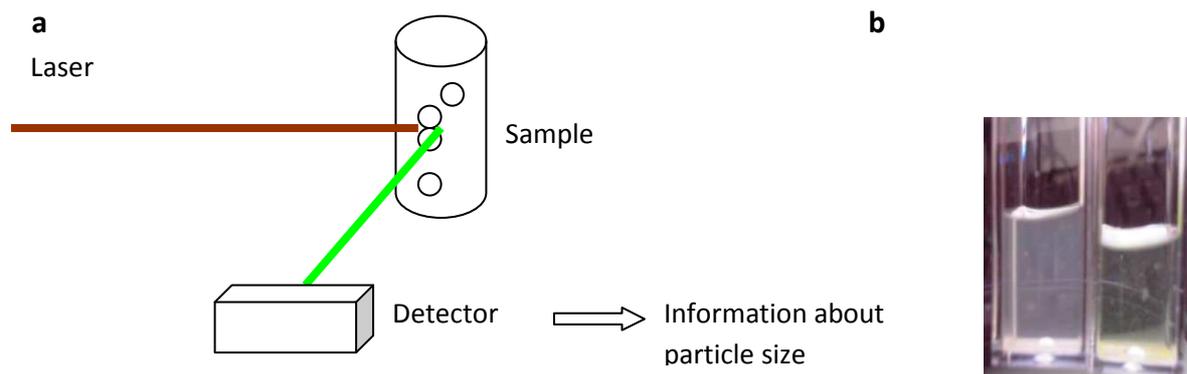


Figure I : Mesures en DLS. (a) Schéma de la technique de mesure par DLS. (b) Echantillons dans une cuve à quatre faces transparentes.

La polydispersité d'un échantillon, ainsi qu'une trop faible ou trop forte concentration d'une suspension, sont des facteurs pouvant limiter la détection et la résolution de la mesure.

Annexe B : Potentiel électrique de surface

Pour mesurer le potentiel ionique de surface, nous avons utilisé le même appareil que pour la DLS (Zétasizer Nano Zs de Malvern, Figure II a) qui mesure aussi, comme son nom l'indique, le potentiel zêta de particules.

Pour ces mesures, on introduit la suspension de particules dans une cuve spéciale à laquelle est appliqué un courant alternatif permettant d'observer le mouvement des ions (Figure II b). Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique existant au niveau de la surface des particules en suspension au sein d'un milieu liquide. Il permet de caractériser la charge électrique au voisinage de la surface de la particule en fonction de son environnement. En milieu liquide, les charges de surfaces sont essentiellement liées à la présence de groupements chimiques ioniques ou de tensioactifs ioniques adsorbés à la surface des particules. Les charges de surface affectent la distribution ionique au niveau de l'interface particule-liquide. Une augmentation de la concentration en contre-ions est observée et conduit à la formation d'une double couche électrique autour de chaque particule (couche de Stern). La valeur de 25 mV (positif ou négatif) peut être vue comme la valeur arbitraire qui sépare les surfaces peu chargées des surfaces hautement chargées. La signification du potentiel zêta est que sa valeur est liée à la stabilité de dispersions colloïdales. Il indique le degré de répulsion entre les particules adjacentes dans la dispersion. Pour de très petites molécules ou particules, un potentiel zêta élevé confère en général une bonne stabilité colloïdale. Si le potentiel est très faible, l'attraction entre les éléments devient plus importante que la répulsion ce qui pousse les particules à s'agglomérer.

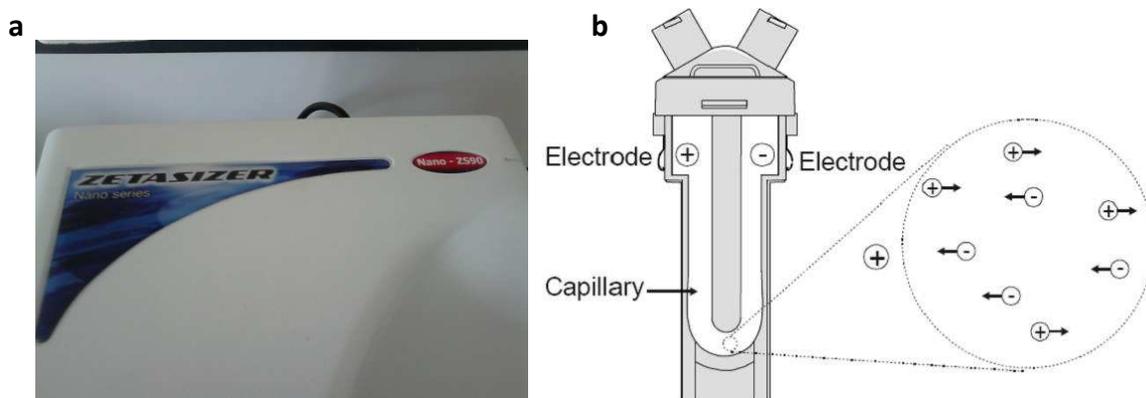


Figure II : Outils pour la mesure du potentiel zêta. (a) Image de l'appareil utilisé. (b) Schéma d'une cuve de mesure.

Annexe C : Microscope électronique à balayage

Afin de visualiser les NPs obtenues et préciser leur forme et leur distribution de taille, elles sont caractérisées au microscope électronique à balayage à effet de champ de haute résolution (1 nm). Il s'agit d'un équipement Carl Zeiss Ultra SEM (Zeiss, n.d.) qui possède un canon à effet de champ (Figure III).

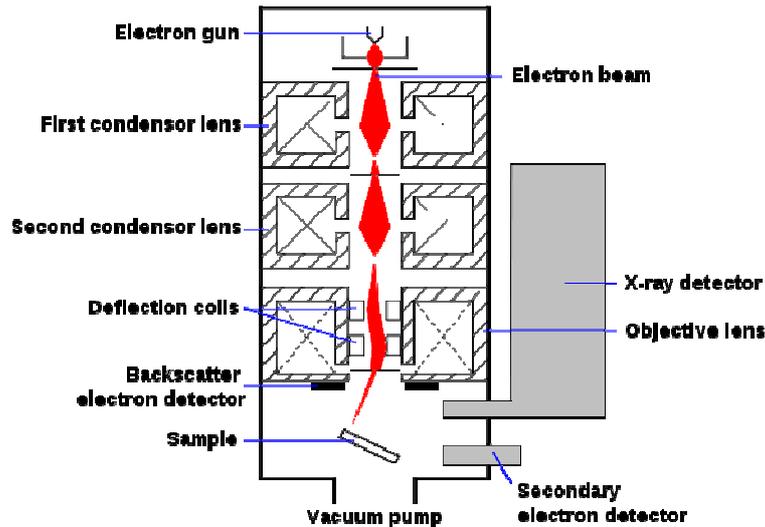


Figure III : Schéma du microscope électronique à balayage.

Le faisceau d'électrons est produit par un canon à électrons. Ce faisceau, dont la gamme d'énergie est généralement comprise entre 5 et 40 kV, est ensuite condensé par des lentilles magnétiques. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre le faisceau à un balayage du même type que celui de la télévision. Les lentilles magnétiques et les bobines de balayage forment un ensemble appelé "colonne électrique". Un MEB est également composé d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans deux voire trois directions et de plusieurs détecteurs (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger,...) permettant d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. L'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide. Selon le matériel utilisé, la nature des détecteurs employés peut varier et certains peuvent apporter des informations sur la nature chimique des éléments lourds présents dans l'échantillon.

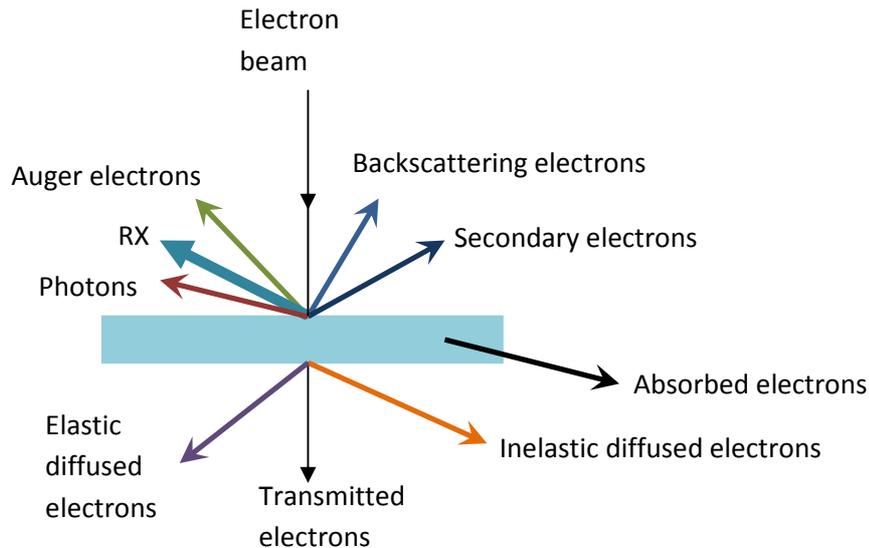


Figure IV: Différents rayonnements pouvant être détectés dans un microscope électronique à balayage.

Le microscope électronique à balayage (MEB) est une technique très utilisée pour l'observation d'échantillons de poudres. Elle permet de visualiser la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau d'électrons de haute énergie. En effet, la technique consiste en des interactions entre le faisceau d'électrons et les atomes sur ou proche de la surface de l'échantillon. Ces interactions génèrent des électrons secondaires de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur dédié qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact, qui détermine le rendement en électrons secondaires, et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant l'échantillon avec le faisceau, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Dans le cas d'un matériau poly-cristallin tel qu'une poudre, ce type de microscope permet d'observer la morphologie et la taille des cristallites qui la composent.

Avant la caractérisation, l'échantillon est préparé. Dans notre étude, les NPs ont été déposées (sous forme de poudre ou d'une goutte de suspension aqueuse) sur des lames de silice dopée pour favoriser l'évacuation de charges négatives. Pour réduire les éventuels problèmes d'accumulation de charges à la surface des NPs et leur dégradation durant les observations, nous avons travaillé avec une tension peu élevée de 3 kV, avec une distance de travail d'environ 3 mm.

Annexe D : Microscope électronique de diffraction

Pour caractériser le cœur cristallin des NPs contenant du CMONS et spécifier les différents polymorphes, un microscope électronique à transmission (MET) a été utilisé en mode diffraction avec un microscope Philips CM300 opérant à 150 kV sous vide (<30 bar). Après avoir déposé l'échantillon sur une grille de cuivre, inséré cette grille sur le porte-échantillon qui est introduit dans le microscope, il faut attendre que le vide soit assez stable pour réaliser les mesures. En raison de la sensibilité des nanocristaux organiques au faisceau d'électrons, les observations en MET ont été réalisées avec un porte-échantillon refroidi à l'azote à -173 °C. De même, un piège métallique est refroidi afin de conduire le froid vers l'intérieur du microscope et piéger les particules pour faire un meilleur vide autour de l'échantillon. Lorsque des points de diffraction apparaissent sur la camera, les clichés ont été enregistrés avec un temps d'exposition court de 0,25 s pour éviter l'amorphisation des nanocristaux.

A partir des clichés de diffraction obtenus, on peut alors mesurer les distances interréticulaires d_{HKL} . Chaque point est obtenu par diffraction du rayon incident à travers l'échantillon (Figure V a). On mesure la distance entre deux points de diffraction symétriques puis on retranspose ces résultats dans l'espace réel. Lorsque le nombre de plans (Figure VI b) est certain, on peut choisir ces points le plus éloigné possible.

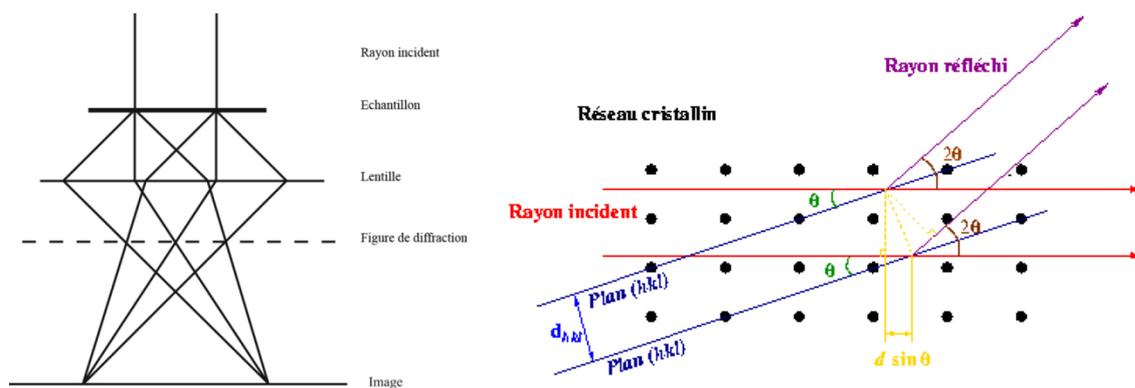


Figure V : Obtention de l'image de diffraction. (a) Schéma du montage. (b) Type de réseau obtenu.

Annexe E : Mesures de porosimétrie

L'étude de la porosité de surface des nanoparticules a été réalisée avec la méthode Brunauer – Emmett – Teller (BET). Il s'agit d'une manière de représenter l'adsorption dans les pores d'un matériau.

Pour ces caractérisations, 400 mg de poudre de NPs sont introduits dans un tube de BET (Figure VII a). Ce tube pesé auparavant sans la poudre, est alors pesé avec les NPs avant et après dégazage. Après avoir bien bouché le tube, on le met à dégazer à 120 °C pendant au moins 6 h jusqu'à obtention d'un vide complet. Ensuite, on refroidit la poudre de NPs à 77 K pour la mesure. La surface spécifique de la poudre est estimée après dégazage, par adsorption d'une monocouche de gaz, par liaison de Van Der Waals, autour de chaque particule et dans chaque pore ouvert de l'échantillon. Les résultats obtenus sont exploités selon l'équation établie par Brunauer, Emmet et Teller (méthode BET).

La théorie BET a comme point de départ la théorie de Langmuir qu'elle applique alors aux différentes couches en tenant compte des hypothèses précédentes. On obtient alors la relation suivante, en sommant la quantité de molécules d'azote adsorbées sur chaque couche i et en supposant que $\sum i$ est très grand :

$$\frac{N}{N_m} = \frac{W}{W_m} = \frac{C \left(\frac{P}{P_0} \right)}{1 - \left(\frac{P}{P_0} \right) + C \left(\frac{P}{P_0} \right)}$$

$$C = \frac{A_1 \nu_i}{A_i \nu_1} e^{(E_i - E_L)/RT}$$

$N(W)$: nombre de moles adsorbées (masse) par unité de masse d'échantillon

$N_m (W_m)$: nombre de moles (masse) dans une monocouche par unité de masse d'échantillon

P_0 : pression de saturation

A_1 : coefficient de condensation, soit la probabilité d'adsorption de la molécule à la collision.

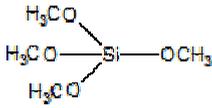
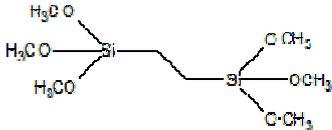
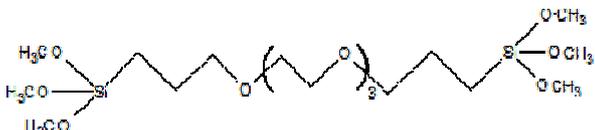
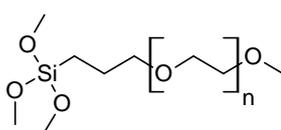
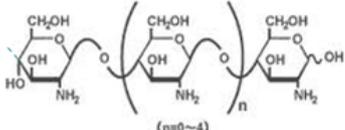
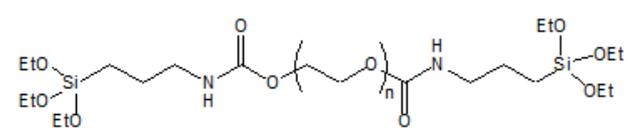
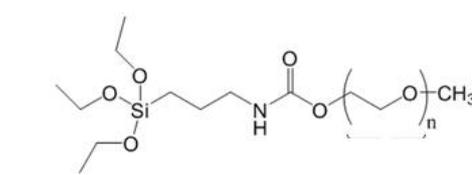
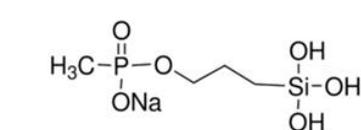
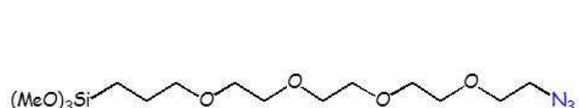
ν_1 : fréquence de vibration perpendiculairement à la surface de la molécule adsorbée.

E_1 : énergie d'adsorption de la première couche ou énergie d'activation de la désorption.

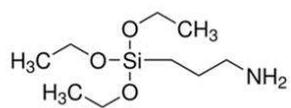
E_L : l'énergie de liquéfaction de l'adsorbat à sa température de liquéfaction, pour toutes les autres couches.

Annexe F: Les précurseurs

Cette annexe présente un récapitulatif sur les précurseurs (Tableau I), un exemple de calcul pour la préparation des sols, ainsi qu'un tableau résumant les volumes utilisés (Tableau II).

Nom utilisé	Molécule
TMOS	
TMSE	
C ₃ O ₄	
PEG-Si Pour post-fonctionnalisation	
Chitosane	 (Sigma-Aldrich, n.d.)
PEG-Si ₂	
PEG-Si Pour co-condensation	
THPMP	
C ₃ O ₃ N ₃	

APTES



Az-PTES

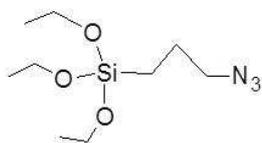


Tableau I : Récapitulatif des molécules utilisées au cours de cette thèse.

Exemple de calcul pour une solution

Pour la matrice $a \times TMOS + b \times X + c \times Y$, on relève le nombre d'atome Si et de terminaisons OR dans chaque molécule. Le taux d'hydrolyse h , le taux de solvant s sont fixés, ainsi que V_X

	n_{TMOS}	n_X	n_Y
Si	d	e	f
OR	g	h	i

$$n_X = \frac{b}{b} \times n_X \quad ; \quad n_{TMOS} = \frac{a}{b} \times n_X \quad ; \quad n_Y = \frac{c}{b} \times n_X$$

$$n_{Si} = d \times n_{TMOS} + e \times n_X + f \times n_Y = \left(\frac{ad}{b} + \frac{be}{b} + \frac{cf}{b} \right) \times n_X$$

$$n_{OR} = g \times n_{TMOS} + h \times n_X + i \times n_Y = \left(\frac{ag}{b} + \frac{bh}{b} + \frac{ci}{b} \right) \times n_X$$

V_X fixé

$$V_{TMOS} = \frac{a}{b} \times \frac{V_X \times \rho_X}{M_X} \times \frac{M_{TMOS}}{\rho_{TMOS}} \quad ; \quad V_Y = \frac{c}{b} \times \frac{V_X \times \rho_X}{M_X} \times \frac{M_Y}{\rho_Y} \quad ; \quad V_{THF} = s \times n_{Si} \times \frac{M_{THF}}{\rho_{THF}}$$

$$V_{HCl} = h \times n_{OR} \times M_{HCl} / \rho_{HCl}$$

$$V_{HCl} = h \times n_{OR} \times \frac{M_{HCl}}{\rho_{HCl}} \quad m_{fluo} = d \times n_{Si} \times M_{fluo}$$

$$V_{TOTAL} = V_X + V_{TMOS} + V_Y + V_{THF} + V_{HCl} \quad \rightarrow V_{TOTAL} \text{ à ramener à 60 mL}$$

$$\text{Pourcentage massique pour le fluorophore : } \%m = \frac{m_{fluo}}{m_{Si}}$$

Tableau des solutions avec volumes en ml

nom	TMOS	TMSE	C ₃ O ₄	THF	HCl (1 M)	PEG400-Si ₂	PEG550-Si	THPMP	AzPTES
1TMOS	0.215	/	/	59.68	0.105				
2TMOS-1TMSE (s = 500)	0.107	0.093	/	59.71	0.092				
2TMOS-1TMSE (s = 750)									
8TMOS-1C ₃ O ₄ (s = 500)	0.172	/	0.065	59.66	0.100				
8TMOS-1C ₃ O ₄ (s = 750)									
8TMOS-0.95C ₃ O ₄ - 0.05PEG400-Si ₂	0.121		0.047	59.76	0.067	0.005			
8TMOS-0.9/C ₃ O ₄ - 0.03PEG550-Si	0.177		0.071	59.65	0.100		0.004		
8TMOS-0.82C ₃ O ₄ - 0.18THPMP	0.140		0.048	59.74	0.066			0.004	
8TMOS-0.82C ₃ O ₄ -0.18AzPTES	0.140		0.047	59.74	0.066				0.005

Tableau II : Volumes de précurseurs pour la préparation des sols.

Annexe G : Diffraction par rayons X

Cette annexe présente la diffraction par rayons X, les appareils utilisés, et les diffractogrammes simulés des différents polymorphes du CMONS.

1) Un peu de théorie

La diffractométrie de rayons X (DRX) est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction n'ayant lieu que sur la matière cristalline, on parle aussi de radiocristallographie. Pour les matériaux non-cristallins, on parle de diffusion. Cette méthode utilise un faisceau de rayons X qui rencontre le cristal provoquant la dispersion du faisceau lumineux dans des directions spécifiques. La Figure VI montre schématiquement le fonctionnement de cette analyse.

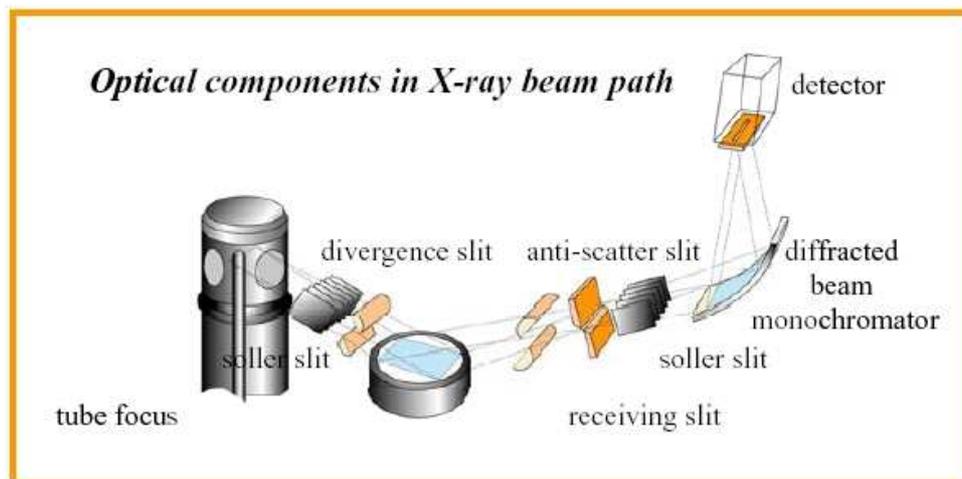


Figure VI : Schéma de montage de l'analyse d'un échantillon par diffraction.

Les données collectées forment le diagramme de diffraction ou diffractogramme. Chaque pic correspond à un plan hkl spécifique du réseau, ce qui nous donne, grâce à la position des pics en 2θ , les paramètres de maille a, b, c et le réseau de Bravais.

2) Les appareils utilisés

Dans le cas général, l'appareil possède un goniomètre "à deux cercles", c'est-à-dire ne permettant de faire varier que deux angles : l'angle d'incidence du rayonnement sur l'échantillon γ , et l'angle de déviation 2θ . Ceci peut être réalisé par deux montages, dits " θ -

2θ " (thêta-deux thêta) et " θ - θ " (thêta-thêta). Dans les deux cas, le détecteur est mobile, c'est sa position qui détermine la déviation 2θ . Pour le montage θ - 2θ que nous avons utilisé, la source de rayonnement est fixe, le porte-échantillon est motorisé ; le tube étant la partie la plus lourde, ce montage est le plus simple d'un point de vue mécanique. Son nom vient du fait que l'angle que parcourt le porte-échantillon par rapport à la déviation 0 vaut $\frac{1}{2} \cdot 2\theta = \theta$, tandis que le détecteur parcourt un angle 2θ .

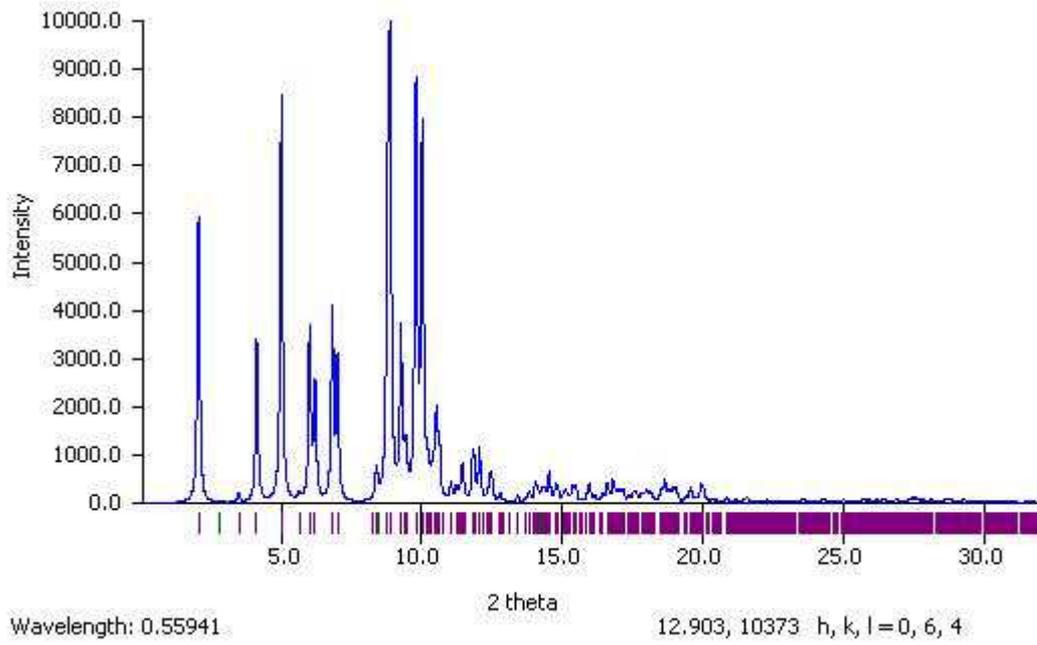
Dans un deuxième temps, nous avons travaillé avec des capillaires contenant les NPs. Pour ces mesures, nous avons utilisé un diffractomètre 4-cercles Bruker (Nonius) qui est en général utilisé pour l'étude de monocristaux. Cependant, il permet aussi l'étude des textures de matériaux polycristallins en mode par réflexion et par transmission. Il est constitué d'un goniomètre kappa, d'une source classique de rayons X (anode à l'argent) et d'un détecteur CCD bidimensionnel. Le faisceau a une section de l'ordre du mm^2 . Le cristal ou le capillaire se trouve au centre optique de trois axes de rotation, ϕ , ω et κ . Grâce à la combinaison des rotations autour de ces axes, il est possible de donner n'importe quelle orientation à l'échantillon.



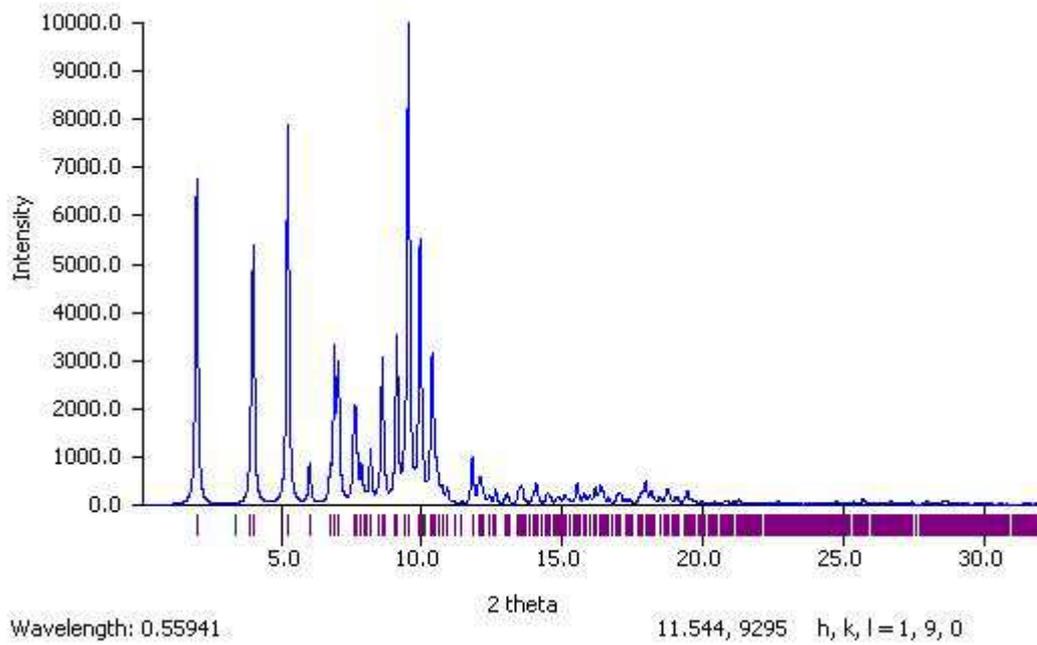
Figure VIII : Images du diffractomètre.

3) Spectres des trois polymorphes du CMONS

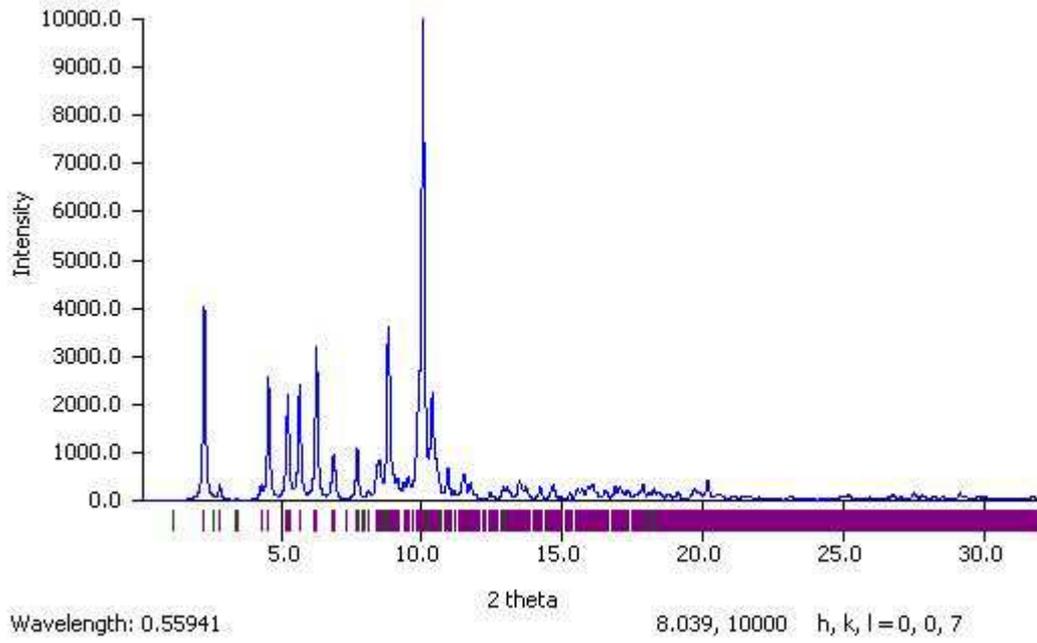
Ag cmns transformed



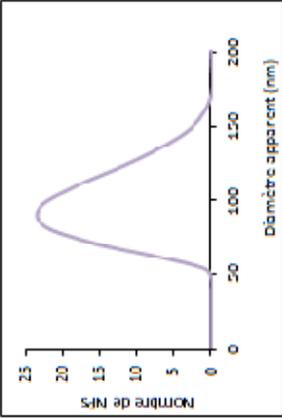
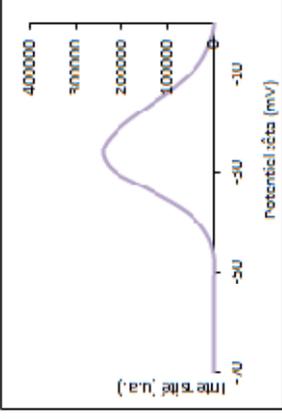
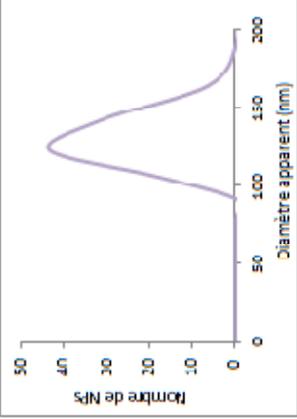
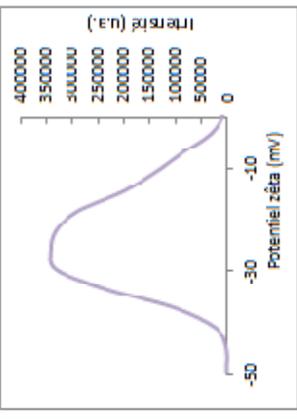
Ag cmns orange

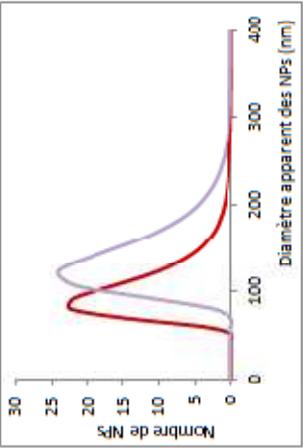
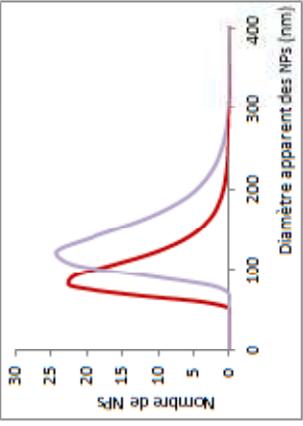
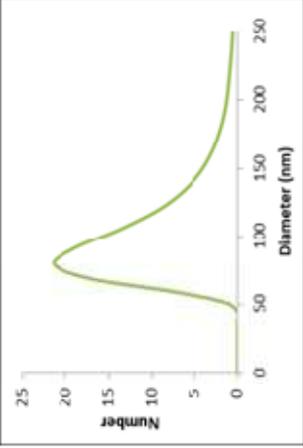
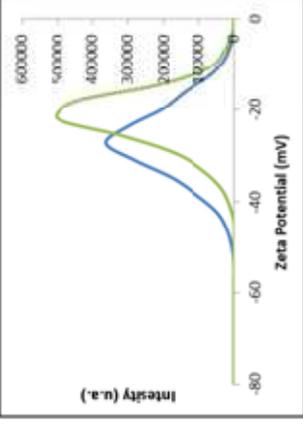


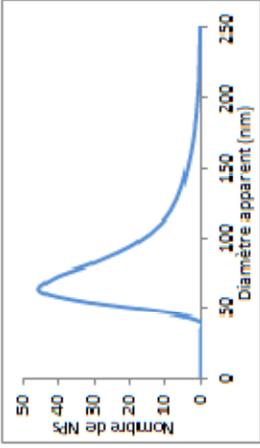
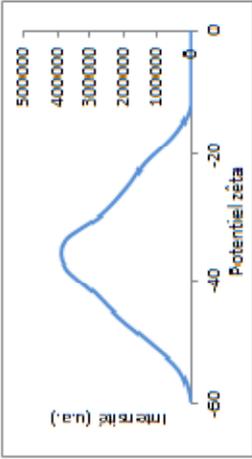
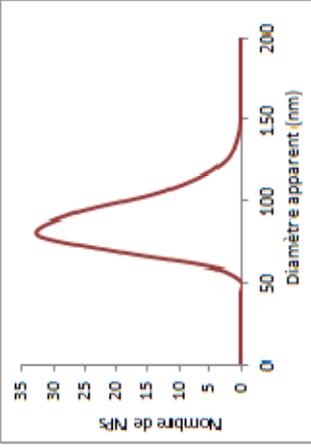
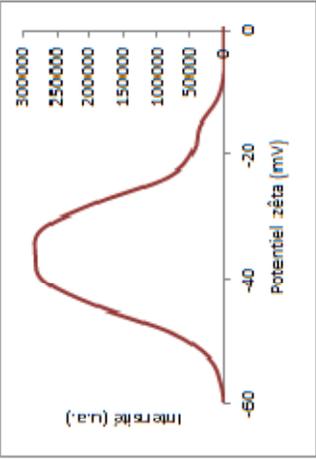
Ag Cmons yellow



Annexe H : Composition des lots de nanoparticules injectés

N° lot	Matrice	Fluorophore	Fonctionnalisation	Diamètre apparent DLS	Potential zéta	Densité optique
1	BTMOS- 1CsO4 s = 500	CMONS d = 0.088	PEG400 S $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$	50 nm 	28 mV 	0,8
2	BTMOS- 1CsO4 s = 500	CMONS d = 0.088	PEG2000-Si $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$	120 nm 	-25 mV 	0,8

N° lot	Matrice	Fluorophore	Fonctionnalisation	Diamètre apparent DLS	Potentiel zêta	Densité optique
3	8TMOS- 1C ₃ O ₄ s = 500	CMONS d = 0.088	Chitosane 0,3 g.L ⁻¹	120 nm 	+10 mV 	0,8
4	2TMOS- 1TMSE s = 500	CMONS d = 0.086	PEG2000-Si 1.34 * 10 ⁻⁶	80 nm 	-20 mV 	2,25

N° lot	Matrice	Fluorophore	Fonctionnalisation	Diamètre apparent DLS	Potentiel zêta	Densité optique
5	2TMOS- 1TMSE s = 500	CMONS d = 0.086	aucune	80 nm 	-30 mV 	0,84
6	8TMOS- 1C ₃ O ₄ s = 500	CMONS d = 0.088	aucune	80 nm 	-38 mV 	0,56

Annexe I : Microscope confocal à deux photons ZEISS LSM7 MP

Le LSM 7 MP (Laser Scanning Microscope) est un système conçu spécialement pour la microscopie multiphoton. Un laser femtoseconde pulsé est focalisé dans le cerveau de la souris par un objectif à un grandissement de 20. Le contact entre les tissus et l'objectif est réalisé avec un gel physiologique. La fluorescence étant générée uniquement au point focal du laser, toute la fluorescence apparaissant dans les tissus est collectée par l'objectif et dirigée vers les photomultiplicateurs, avec une sélection spatiale de la fluorescence par un diaphragme. Le mouvement du rayon excitateur dans le plan x-y est réalisé par une rotation de miroirs galvanométriques et permet d'obtenir une image de 512 par 512 pixels en une seconde. La translation motorisée de l'objectif permet une variation de la profondeur d'observation et l'acquisition de piles d'images séparées d'un pas ajustable (plusieurs dixièmes de micromètres). La puissance incidente de l'excitation peut être modulée manuellement pendant l'acquisition.

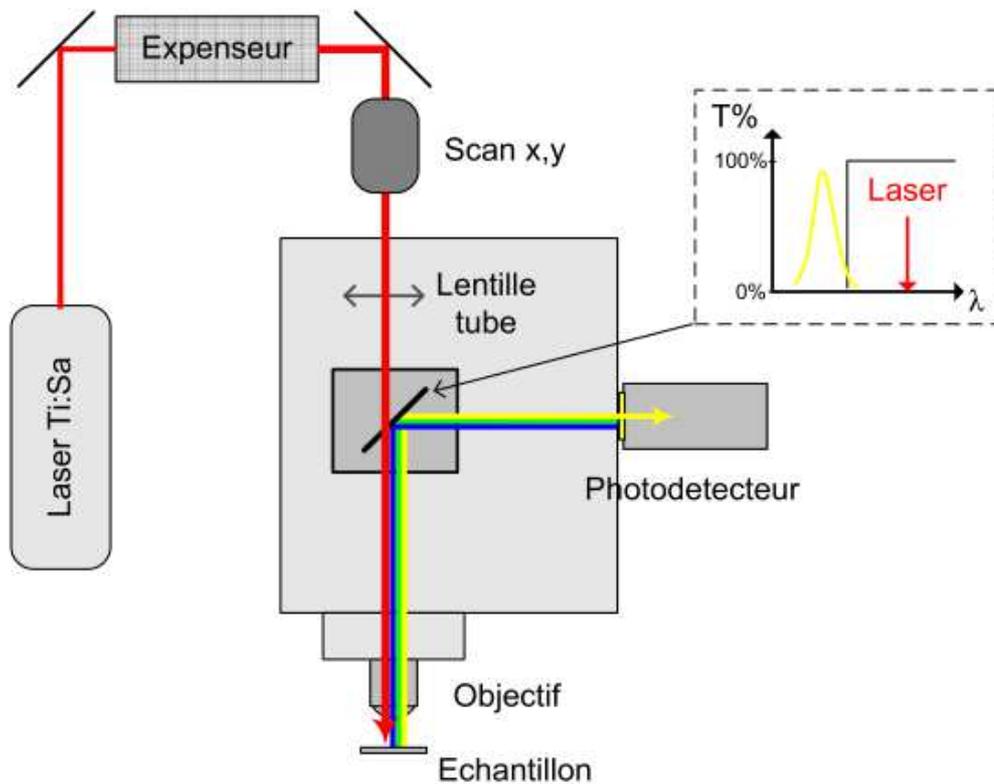
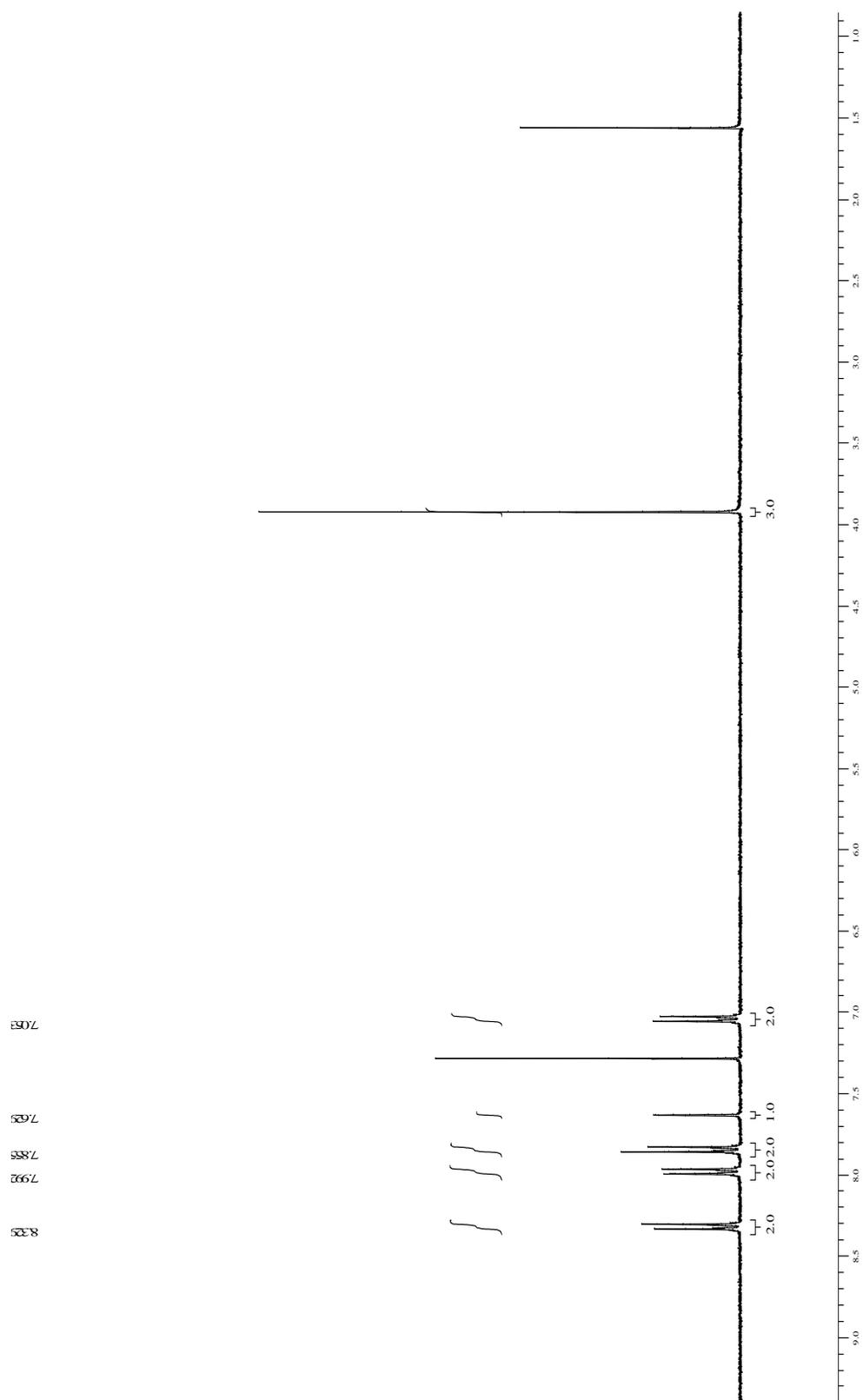


Figure IX : Schéma d'un microscope confocal.

Annexe J : Spectre RMN du CMONS



^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) : δ 3,92 ppm (s, 3H, O- CH_3) ; 7,05 ppm (d, 2H, Ar) ; 7,63 ppm (s, 1H, R- $\text{CH}=\text{CR}_2$) ; 7,85 ppm (d, 2H, Ar) ; 7,90 ppm (d, 2H, Ar) ; 8,3 ppm (d, 2H, Ar)

Annexe K : Spectromètres

Les spectres d'absorption ont été mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax-4 de Horiba Jobin Yvon (Figure XIII). Ce spectromètre compact offre une bonne sensibilité pour des études de fluorescence et présente un excellent ratio signal sur bruit.

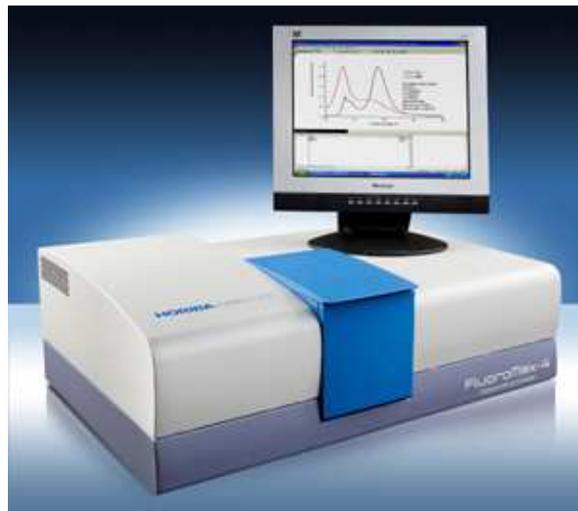


Figure XIII : Synthèse de Filtration.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC, un spectrofluorimètre pour cuves. Cet appareil présente une bonne sensibilité sur différents types d'échantillons : suspension, poudre,... Avec une vitesse de balayage jusqu'à 7000nm/minute, il peut réaliser des spectres d'excitation, d'émission, synchrones et 3D avec des fonctionnalités de calcul automatique et de dépouillement (selon options).



Figure XIV : Synthèse de Filtration.

Annexe L : Evolution du réacteur

Les propriétés de fluorescence de certains fluorophores pouvant être altérées par des impuretés de l'air, nous avons prévu de faire évoluer le réacteur pour un fonctionnement uniquement sous azote.

Jusqu'à présent, le gaz vecteur qui porte les gouttelettes de sol dans le four pour le séchage des NPs est constitué d'air comprimé. Une circulation d'azote a donc été prévue en entrée du four.

D'autre part, nous avons prévu un système pour chasser l'air présent dans le mélange de départ, en faisant entrer de l'azote dans la solution grâce à un verre fritté. Dans cet objectif, nous avons modifié le bouchon qui ferme le flacon contenant la solution de départ. Pour l'instant, ce bouchon comporte trois entrées. La première est liée à une tige permettant d'aspirer le liquide, la deuxième à un tuyau pour permettre au surplus de solution de retourner vers le flacon, et enfin une sortie d'air pour le placement d'une sous-pape de sécurité pour l'évacuation de la pression dans le flacon. Dans le nouveau bouchon qui a été fabriqué, nous avons donc ajouté une quatrième entrée pour faire passer le verre fritté. Ainsi, pendant une heure et demi avant le début de la synthèse, on peut introduire de l'azote afin de chasser l'air présent auparavant dans la solution.

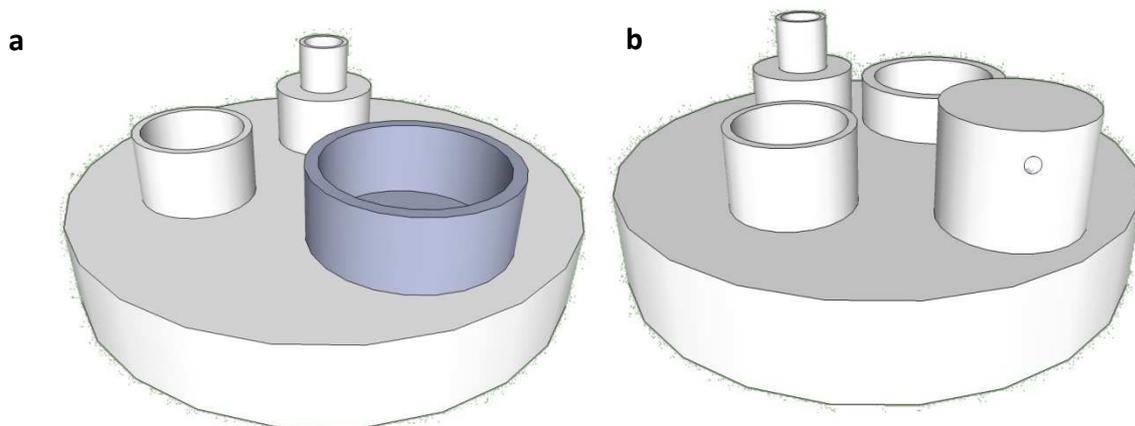


Figure XV : Bouchon réacteur avec ses trois entrées et sorties. (a) Schéma du bouchon actuel avec trois entrées et (b) schéma du bouchon développé avec quatre entrées.

Annexe M : Calcul du nombre de particules

Calcul du nombre de particule en fonction de DOMatrice : 8 TMOS : 1 C₃O₄

Maille : 4 molécules/maille

Forme cristalline : forme II : monoclinique

Paramètres : a = 4,6002 Å ; b = 31,947 Å ; c = 9,511 Å, β = 91,5°

Volume de maille : a*b*c*sinβ

$$V = 1397 \text{ Å}^3$$

Volume d'un nano-cristal de CMONS sphérique de 60 nm de diamètre : $V = 4/3\pi R^3 = 4/3\pi (300)^3 = 1,13 \cdot 10^8 \text{ Å}^3$

→ Nombre de mailles dans un cristal = $1,13 \cdot 10^8 \text{ Å}^3 / 1397 \text{ Å}^3 = 8,1 \cdot 10^4$ maille/particule

Nb de CMONS par particule = $8,1 \cdot 10^4 \cdot 4 = 3,2 \cdot 10^5$ molécule CMONS/ particule

Soit une DO = 0,6

$$\varepsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

→ $C_{\text{cmons}} = 0,6/18000 = 3,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$

→ Dans 1 mL = $3,33 \cdot 10^{-8} \text{ mol/mL}$

→ $2 \cdot 10^{16}$ molécules/mL

$$\text{Nombre de particule/mL} = 2 \cdot 10^{16} / 3,2 \cdot 10^5 = 6,25 \cdot 10^{10} \text{ particule/mL}$$

Comparaison avec le dextran commercial

Dextran 70000 – fluorophore 2/1000 mol fluorophore/mol dextran (aldrich)

Concentration : 5 mg/mL

→ $\text{Conc} = 0,005/70000 = 7,14 \cdot 10^{-8} \text{ mol/mL} \rightarrow 4,3 \cdot 10^{16} \text{ polymere/mL}$ (facteur : 688000)

Concentration en fluorophore : $2/1000 = 1,428 \cdot 10^{-10} \text{ mol/mL}$

→ $8,6 \cdot 10^{13} \text{ molécule/mL}$

$$\text{Facteur} : 8,6 \cdot 10^{13} / 6,25 \cdot 10^{10} = 1375$$

Annexe N : Calcul du rendement : exemple pour S_{TMSE} Calcul masse départ

- Généralités

$$M_{SiO_2} = 60\text{g/mol}$$

$$1 \text{ mole TMOS} = 1 \text{ mole MTMOS} = 1 \text{ mole silice}$$

$$1 \text{ mole TMSE} = 1 \text{ mole } C_3O_4 = 2 \text{ moles silice}$$

$$m_{SiO_2} = m_i$$

- matrice blanche TMOS

$$n_{SiO_2} = n_{TMOS} = V_{TMOS} * \rho_{TMOS}/M_{TMOS} = 0,00146\text{mol}$$

$$m_{SiO_2} = 60 * n_{SiO_2} = 87,46\text{mg}$$

- matrice blanche TMOS/MTMOS

$$n_{SiO_2} = n_{TMOS} + n_{MTMOS} = V_{TMOS} * \rho_{TMOS}/M_{TMOS} + V_{MTMOS} * \rho_{MTMOS}/M_{MTMOS} = 0,0029\text{mol}$$

$$m_{SiO_2} = 60 * n_{SiO_2} = 174,07\text{mg}$$

- matrice blanche TMOS/BTP

$$n_{SiO_2} = n_{TMOS} + 2 * n_{BTP} = V_{TMOS} * \rho_{TMOS}/M_{TMOS} + 2 * V_{BTP} * \rho_{BTP}/M_{BTP} = 0,001457\text{mol}$$

$$m_{SiO_2} = 60 * n_{SiO_2} = 87,41\text{mg}$$

- matrice blanche TMOS/TMSE

$$n_{SiO_2} = n_{TMOS} + 2 * n_{TMSE} = V_{TMOS} * \rho_{TMOS}/M_{TMOS} + 2 * V_{TMSE} * \rho_{TMSE}/M_{TMSE} = 0,001455\text{mol}$$

$$m_{SiO_2} = 60 * n_{SiO_2} = 87,32\text{mg}$$

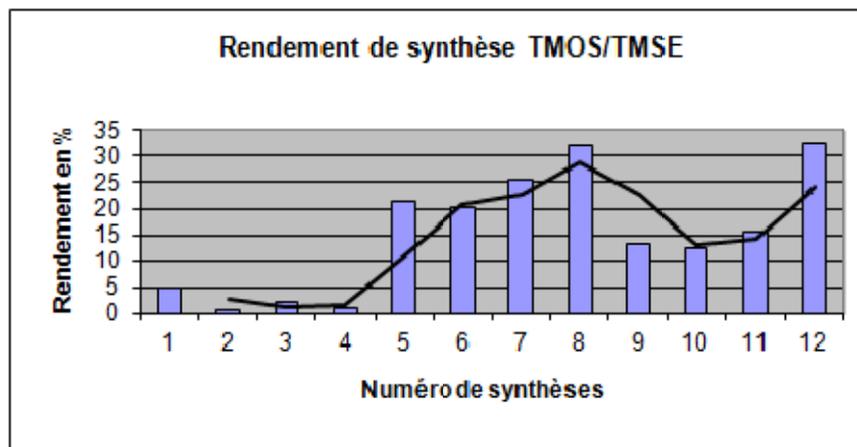
Calcul m_{SiO_2} final

$$\text{Dans } x * 60 \text{ mL: } m_x \rightarrow m_f = m_x/x$$

Rendement

$$R = 100 * m_f/m_i$$

matrice	2TMOS/1TMSE	
MSiO2	60	
MTMOS	152,22	
MTMSE	270,1	
V(TMSE) en cm3	0,093	
V(TMOS) en cm3	0,107	
rho(TMSE) en g/cm3	1,06	
rho(TMOS) en g/cm3	1,032	
m(TMSE) en g	0,09858	V*rho
m(TMOS) en g	0,110424	
m(TMSE) en mg	98,58	
m(TMOS) en mg	110,424	
m départ	87,3225359	m*Msi/MTMOS
m récolté	22,1357143	
rendement en %	25,3493718	



	3	2	1	1	5	4,5	4,66666667	8	1,5	av CMONS	av CMONS	av CMONS
pois flaon en mg	15,1305	15,143	15,144	15,146	15,1468	15,24	15,3197	15,423	15,648	44,817	45,68	44,7578
V en mL	180	120	60	60	300	270	280	480	90	120	220	360
mtot en g	15,143	15,144	15,146	15,1468	15,24	15,3197	15,423	15,648	15,6655	44,839	45,73	44,929
mNps en g	0,0125	0,001	0,002	0,0008	0,0932	0,0797	0,1033	0,225	0,0175	0,022	0,05	0,1712
m pour 60mL	0,00416667	0,0005	0,002	0,0008	0,01864	0,01771111	0,02213571	0,028125	0,01166667	0,011	0,01363636	0,02853333
m pour 60mL en mg	4,16666667	0,5	2	0,8	18,64	17,71111111	22,1357143	28,125	11,66666667	11	13,6363636	28,5333333
rendement	4,7715823	0,57258988	2,2903595	0,9161438	21,3461506	20,2824058	25,3493718	32,2081805	13,3604304	12,5868873	15,5931711	32,5974028
msynthétisé en mg	12,5	1	2	0,8	93,2	79,7	103,3	225	17,5	22	50	171,2
masse totale	12,5	13,5	15,5	16,3	109,5	189,2	292,5	517,5	535			

Nanocristaux organiques enrobés d'une coquille silicatée pour la réalisation de traceurs fortement fluorescents pour l'imagerie médicale

Résumé

Durant ce travail, la synthèse de nanoparticules hybrides composées d'un cœur organique cristallin fluorescent enrobé d'une coquille silicatée a été optimisée dans l'optique du développement d'un nouveau type de traceurs très brillants pour l'imagerie médicale (microscopie de fluorescence excitée à deux photons). La préparation des nanoparticules a pu être adaptée à différents types de fluorophores organiques. La composition de la coquille organosilicatée peut elle aussi être modulée afin de modifier les propriétés de dispersion en solution aqueuse, la charge de surface des particules ou les fonctions chimiques de surface. Le cœur organique de ces particules se dissolvant dans les solvants organiques, différentes stratégies de fonctionnalisation en milieu aqueux ont été réalisées afin d'augmenter la furtivité de ces objets *in vivo*. Ces différentes méthodes ont permis de faire circuler les nanoparticules dans le flux sanguins de souris. La durée de vie de circulation de ces particules restant cependant courte, de nouvelles stratégies de fonctionnalisation (chimie *click*) devraient permettre à l'avenir d'allonger ce temps de circulation.

Mots-clés : Nanocristaux organiques, sol-gel, nanoparticules hybrides, fluorescence, traceur, fonctionnalisation

Fluorescent organic nanocrystals embedded in organosilicate shells: towards very bright tracers for medical imaging

Abstract

This work has allowed the synthesis of hybrid nanoparticles composed by organic crystal cores embedded in organosilicate shells for the development of *in vivo* imaging applications (two-photon fluorescence microscopy). The synthesis of these nanoparticles has been adapted with different types of organic dyes. The composition of the silicate shell can also be modulated in order to modify the properties of dispersion in aqueous solution, the surface charge of particles or chemical functions present at the surface. Due to the dissolution of organic cores in organic solvents, different strategies of functionalization were developed in aqueous media to enhance the furtivity of these nanoparticles *in vivo*. These methods have led to the circulation of the nanoparticles into the bloodstream of mice. However, the circulation lifetime of these nanoparticles is short. New strategies of functionalization (*click* chemistry) should help in the future to extend this circulation time for the possible development of these new fluorescent tracers.

Key words : Organic nanocrystals, sol-gel, hybrid nanoparticles, fluorescence, tracer, functionalization