Nano outils moléculaires biphotoniques pour le vivant

Jonathan Daniel

▶ **To cite this version:**

Jonathan Daniel. Nano outils moléculaires biphotoniques pour le vivant. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0158 . tel-01616005v2

HAL Id: tel-01616005
https://theses.hal.science/tel-01616005v2

Submitted on 23 Nov 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.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par Jonathan DANIEL

Nano outils moléculaires biphotoniques pour le vivant

Sous la direction de : Mireille BLANCHARD-DESCE

Soutenue le 12 octobre 2015

Membres du jury :

M. RODRIGUEZ, Vincent	Professeur des Universités, Univ. de Bordeaux	Examinateur
M. KLYMCHENKO, Andrey	Directeur de Recherche, Univ. de Strasbourg	Rapporteur
M. LEMERCIER, Gilles	Professeur des Universités, Univ. de Reims	Rapporteur
M. MONGIN, Olivier	Maître de Conférences, Univ. de Rennes 1	Examinateur
Mme BLANCHARD-DESCE, Mireille	Directeur de Recherche, Univ. de Bordeaux	Directrice de thèse
M. COGNET, Laurent	Directeur de Recherche, Univ. Bordeaux	Invité

Nano outils moléculaires biphotoniques pour le vivant

Depuis deux décennies, la modernisation des techniques d'imagerie de fluorescence a permis de comprendre et d'étudier de nombreux processus biologiques. Ce formidable essor a néanmoins été ralenti par les faibles performances des sondes fluorescentes disponibles pour ce type d'imagerie. Ce manque d'objets luminescents a motivé des recherches intenses dans le but d'optimiser les sondes moléculaires fluorescentes déjà existantes afin de leur permettre d'être plus fluorescentes, mais aussi plus stables. En parallèle à ces optimisations, l'avancée des nanotechnologies à permis de développer de nouveaux outils pour l'imagerie biologique. Du fait de leurs propriétés optiques, de leur excellente photostabilité, ainsi que la possibilité de fonctionnaliser leur surface, les nanoparticules semi-conductrices (QDs) ont connu un succès phénoménal dans les domaines de l'imagerie. Au fur et à mesure de leur utilisation, de nombreuses questions partiellement élucidées sur la toxicité des QDs ont émergé. Dans le but de proposer une alternative aux QDs, de nombreux groupes de recherche ont travaillé sur la préparation de nanoparticules (ONPs) à base de molécules organiques, ce qui a mis fin à l'hégémonie des QDs en imagerie biologique. Parmi ces ONPs, les nanoparticules fluorescentes à base de molécules organiques (FONs) se sont imposées comme des candidats sérieux pour sonder le vivant. Dans cette optique, nous développons de nouveaux chromophores qui, par un design moléculaire adapté, peuvent former des FONs avec des brillances à un et deux photons comparables à celle des QDs tout en étant biocompatibles.

Mots clés : Fluorescence, nanoparticules, imagerie, brillant, photostable, deux photons, fluorène, thiophène, tracking.

Biphotonics molecular-based nanotools for biology

Since decades, bioimaging technics increased a lot, thus leading to a better understanding of biological processes. However, the fluorescence imaging was limited due to the low photostability and brightness of available organic dyes. In order to improve the lack of photostability and brightness of the commercially available dyes, lots of effort was done by organic chemists. In the mean time with the incoming of nanotechnologies, new tools such as the semi-conductors QDs raised as promising luminescent probes for bioimaging. Due to their intrinsic properties, QDs are bright and photostable nano-objects, furthermore, the labeling of the surface of the QDs is of interest for targeting (such as the detection of cancer cells). Despite their popularity, with time, issues about the clearance and the toxicity of the QDs have been adressed and are still not fully solved. So the development of safer and biocompatible tools for bioimaging emerged as evidence for scientists. In that context, the use of nanoparticles made of organic materials gain in interest and particularly the fluorescent organic nanoparticles (FONs). We aimed to propose biocompatible and safer alternative to QDs, so we developed new nanotools, based on the self aggregation of propeller-shaped fluorophores as FONs. Because of the specific design of the chromophores, these FONs have large one and two-photon brightness combine with good photostability. These features made these FONs promising tools for either one-photon and two-photon fluorescence imaging in cells and *in vivo*.

Keywords : *Fluorescence, nanoparticles, imaging, brightness, photostable, two-photon, fluorene, thiophene, tracking.*

UMR 5255

[ISM, équipe Phoenics, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France]

Remerciements

Les résultats consignés dans ce manuscrit ont été obtenus durant mon doctorat dans le groupe Phoenics (Photonics and ohmics enabled by innovations in chemical synthesis) à l'ISM (institut des sciences moléculaire) sous la tutelle du Dr Mireille Blanchard-Desce.

Je remercie le Dr Mireille Blanchard-Desce de m'avoir accueilli au sein de son équipe dans le cadre de ma thèse, mais aussi de m'avoir accueilli pendant plusieurs années dans son équipe au travers de mes différents stages. Grâce à votre soutien, j'ai toujours pu travailler avec une certaine autonomie durant mes différents stages et mon doctorat. Grâce à cette « indépendance », j'ai pu tester certaines expériences en marge de mes sujets qui n'ont pas toujours été couronnées de succès, mais qui ont contribué à mon épanouissement scientifique. Vous m'avez aussi donné l'opportunité de travailler dans le laboratoire du Pr Cho à Séoul, ce qui a été une des expériences les plus enrichissantes de ma vie. Je vous remercie aussi de m'avoir permis d'effectuer mon doctorat dans des conditions matérielles exceptionnelles et sur un sujet porteur, très pluridisciplinaire et vraiment passionnant.

Je remercie les membres du jury, le Pr Lemercier, le Dr Klymchenko, le Dr Mongin, le Pr Rodriguez, le Dr Blanchard-Desce et le Dr Cognet, d'avoir accepté de juger mon travail et je remercie également la région aquitaine d'avoir financé ma thèse.

Ce doctorat est le fruit de nombreuses collaborations aussi bien locales qu'internationales, mais il est aussi le fruit de mes expériences passées au sein de l'équipe CPM. Je remercie donc chaleureusement le Dr Olivier Mongin qui m'a suivi et conseillé depuis presque mes débuts en tant que chimiste. Olivier, tu as toujours été là pour m'aider que ce soit en synthèse ou en photophysique et je t'en remercie. Travailler avec toi est synonyme de plaisir et j'espère pouvoir dans le futur continuer de collaborer avec toi. Je tiens aussi à te remercier d'avoir participé à certaines de nos frasques avec Aude, Nico et Aline et d'en avoir subi d'autres avec ta bonne humeur. Je remercie aussi le Dr Florence Mongin de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour mes débuts de thèse, et aussi pour son aide précieuse lors de nos séances de mots croisés.

Je remercie mes collaborateurs, le Pr Gianluca Farinola pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mes travaux de thèse, mais aussi son équipe avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler. Une mention spéciale pour Danilo et Maurizio qui sont des personnes exceptionnelles sur le plan scientifique et personnel.

Je remercie aussi le Dr Laurent Cognet, de m'avoir m'accueillir régulièrement dans son laboratoire (et qui continue) afin que je puisse ~~jouer~~ travailler avec mes nanoparticules pour les expériences de SPT. J'apprécie énormément travailler avec vous ainsi qu'avec Antoine (bien qu'il soit un peu fou-fou et difficile à suivre de temps en temps), Pierre ainsi que Matthieu. Je n'aurais jamais cru que la microscopie pouvait être aussi sympa, même si parfois les résultats sont assez frustrants.

Je remercie les Dr Laurent Groc et Erwan Bezard de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs dans le but de tester les NPs en biologie, ce fut court, mais instructif. J'en profite pour remercier Juan qui m'a instruit lors de nos séances d'imagerie cellulaire, mais aussi Benjamin qui a travaillé d'arrache-pied sur les NPs de PLGA et m'a fait découvrir les expériences *in vivo* sur les rats.

Je remercie le Pr Vincent Rodriguez de m'avoir accueilli dans son laboratoire dans le cadre de notre collaboration. Merci de m'avoir permis d'utiliser en solo ta précieuse manip, mais aussi de m'avoir formé dessus. Merci aussi pour nos échanges instructifs sur une branche de la spectroscopie que je ne connaissais absolument pas. Bien que votre laboratoire se situe au 4e étage, j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à venir travailler chez GSM et je pense qu'il en sera de même à l'avenir. Je remercie aussi Flavie pour sa bonne humeur et son aide précieuse lors de manips d'HRS et lors du traitement des données. Je remercie aussi Fred et Marc pour leur aide.

Je remercie le Dr Stéphane Arbault de m'avoir accueilli dans son laboratoire, j'ai ainsi pu découvrir une partie du monde des GUVs, ce qui a été très enrichissant. Merci aussi à Bertrand et Hannah pour leur aide.

Je remercie le Dr Neso Sojic de m'avoir accueilli dans son équipe et je remercie aussi Haidong.

Je remercie le Dr Ahmed Al-Kattan de m'avoir fait gagner un temps incroyable pour la détermination de la taille des NPs par TEM, je te remercie aussi pour ta bonne humeur.

Je remercie Noël de m'avoir bien aidé pour l'obtention de mes structures RX, bon courage !

Je remercie toute l'équipe du BIC pour leur bonne humeur ainsi que leur aide précieuse. C'est toujours un plaisir de venir faire des mesures de TEM et merci encore pour votre réactivité.

Je remercie le Dr Michel Vaultier pour ses conseils avisés en synthèse, ainsi que de sa bonne humeur, mais aussi de me faire participer à quelques-unes de vos manips farfelues.

Je remercie le Dr Émilie Genin pour sa bonne humeur, son aide au laboratoire, merci aussi pour ta compréhension lors de mes nombreux couacs (citons Arturus). Merci aussi à Guillaume Clermont pour son aide quotidienne au labo et sa bonne humeur.

Je remercie tous les étudiants et ex-étudiants du laboratoire (Maxime, Paolo, Cristiano, Eduardo, JB), pour leur bonne humeur quotidienne ainsi que pour nos discussions (pas toujours constructives), mais sympa. Pour Cristiano, je te mets une pile quand tu veux sur Hearthstone ☺ et pour mister Paolo ou mister « I have a question », j'adore nos discussions culinaires, même si elles ont tendance à tourner un peu trop souvent autour des pâtes.

Une mention spéciale au Pr Verlhac qui est un chimiste exceptionnel, la décence m'empêche de notifier par écrit nos sobriquets, néanmoins travailler avec toi est vraiment super, malgré tes années d'expérience, tu as su resté proche des étudiants et tes expériences farfelues (qui ont le mérite de marcher pour la plupart) nous surprendront toujours. Notre passion commune pour le dessinateur Vuillemin nous permet de bien rigoler chaque mois, d'ailleurs je pense que tout comme moi tu te souviendras longtemps des frasques de ce cher Bobby… et encore merci pour ton aide durant la rédaction de ce manuscrit.

Merci au Dr Séb d'avoir été une bonne victime pendant mes premières années de thèse. Merci aussi pour tes conseils, j'ai adoré travaillé à côté de toi, même si tu passes 90% de ton temps à râler après tout et n'importe quoi. Il est vrai que de temps en temps, les blagues potaches méritaient bien quelques remontrances (je suis sur que tout le monde se rappelle le coup des faux e-mails de Fabrice au sujet d'une utilisation non conventionnelle d'internet ☺). Bien que travailler avec toi soit top, je pense que toutes les personnes avec qui tu as travaillé vont s'accorder avec moi : tes goûts musicaux sont à c***r !!! La trompette c'est sympa, mais bosser une journée complète dans un labo avec ou de la trompette, ou bien la B.O. d'Amélie Poulain, il y a de quoi péter un câble ! Mais bon j'ai eu le temps de me venger ^^. Je te souhaite du fond du cœur la réussite tant méritée, mais qui tarde à se pointer. *Charentais vaincra !* (ça sonne toujours mieux que *Picard vaincra* ☺).

Merci au Dr Ludo pour son aide à « victimiser » ce cher Sébastien, ton coup de maître d'écrire sur la face interne des vitres de paillasse nous a permis de bien rigoler, tout comme le

"cadenassage" de tiroirs ou bien les photomontages ☺. Je me souviens aussi très bien des repas du midi toujours animés, soit par des commérages de bas niveau, soit par tes faiblesses en orthographes (par exemple le « votour ») ou bien en géographie avec ta tendance à qualifier de nord de la France toutes villes situées au nord de Nice. Je te remercie aussi pour tes conseils plutôt éclairés. Tout comme pour Sébastien je regrette ton départ, mais je suis content que l'on puisse garder le contact sur Diablo.

Je remercie Aude, Nico et Aline pour leur bonne humeur et pour le plaisir qu'ils m'ont apporté lorsque j'étais à Rennes. Dès que je repense à cette époque, je ne peux m'empêcher de sourire… Énoncer toutes nos frasques serait certainement plus long que ce manuscrit, cependant si je ne devais en retenir qu'une, je citerais nos parties d'éponges. Je remercie d'ailleurs Brahima d'avoir oublié par mégarde cette éponge en fer qui nous à procuré à tous les trois tant de plaisir…On retravaille ensemble quand vous le voulez !! Pour Nico, ta fougue ainsi que tes goûts (musicaux), ne m'a pas laissé intact, j'ai passé l'équivalent d'une année formidable en ta demi-compagnie. Pour ~~Aude~~ Éric, tu es un super chimiste ainsi qu'une super personne et tu sais à quel point j'ai adoré travaillé avec toi, bon courage pour la suite. Pour Aline, je sais que nos blagues potaches te manquent maintenant ☺ ; tu es toi aussi une super personne avec qui j'ai adoré interagir. Je vous embrasse tous les trois.

Je remercie la compagnie Huntsman de m'avoir fourni gracieusement les Jeffamines utilisées pour les expériences d'enrobages des FONs.

Je remercie le Pr Cho de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant mon stage de master. Bien qu'apriori ce remerciement pour paraître déplacer dans un mémoire de thèse sachant qu'il relate d'une période antérieure à la thèse, il n'en est rien. Grâce à vous, j'ai appris beaucoup, et j'ai d'ailleurs pu exercer ce que j'ai appris dans votre laboratoire durant ma thèse. J'ai adoré travaillé avec vous ainsi qu'avec Chang Su et Ji Hee, que je remercie du fond du cœur pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie tous mes amis ainsi que ma famille, et plus particulièrement mes parents qui m'ont fortement encouragé et soutenu dans ma poursuite d'études ainsi que lors de mon escapade asiatique. Finalement, vos sacrifices n'ont pas été vains ☺.

Je remercie ma femme pour sa patience ainsi que son aide au quotidien, j'ai conscience de ne pas être facile tous les jours, aussi je te remercie pour ta compréhension.

Merci aussi pour ton soutien. Enfin je remercie ma fille de m'apporter au quotidien mon lot de joie, bientôt 3 ans, que le temps passe vite…

À toi Myriam et à toi Sélène, ce manuscrit vous est dédié.

Enfin pour mes amis, je citerais :

« *Tempora mori, tempora mundis recorda* » Loth, Kaamelott, Livre III, 27 (1), 2006.

Table des matières

INTRODUCTION **4**

1. L'IMAGERIE BIOLOGIQUE PAR FLUORESCENCE 5
   - *1.1 Imagerie par fluorescence induite à deux photons* *5*
   - *1.2 Imagerie par fluorescence à haute résolution : STED* *6*
   - *1.3 Développement d'outils performants pour l'imagerie de fluorescence* *7*
2. L'EFFET "NANO" 9
   - *2.1 Nanoparticules semi-conductrices* *9*
   - *2.2 Nanoparticules organiques luminescentes* *9*
3. LES NANOPARTICULES INORGANIQUES 10
   - *3.1 NPs semi-conductrices : QDs* *10*
   - *3.2 NPs semi-conductrices : or et argent* *11*
   - *3.3 NPs de silice* *12*
   - *3.4 NPs à base de terres rare : UCNPs* *13*
4. LES NANOPARTICULES ORGANIQUES 15
   - *4.1 NPs de carbone : fullerènes et nanotubes* *15*
   - *4.2 NPs de carbone : NDs* *17*
   - *4.3 NPs enrobées : polymères luminescents et dopés* *18*
   - *4.4 Dendrimères* *20*
   - *4.5 NPs à base de chromophores : FONs* *21*
5. PREPARATION DES FONS 22
6. STABILITE DES FONS 23
   - *6.1 Evolution de la stabilité des FONs* *23*
   - *6.2 Stratégies d'amélioration de la stabilité colloïdale des FONs* *24*
   - *6.3 Evolution de la stabilité chimique des FONs* *25*
7. LUMINESCENCE DES FONS 26

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **28**

CHAPITRE I – RAPPELS SUR LA FLUORESCENCE **42**

1. PRINCIPE DE FLUORESCENCE 42
   - *1.1 Définition de la fluorescence* *42*
   - *1.2 Absorption de la lumière : irradiation des chromophores* *42*
   - *1.3 Relation entre l'énergie et la longueur d'onde* *43*
   - *1.4 Emission de fluorescence* *44*
2. MESURE DE RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE ET NOTION DE TEMPS DE VIE 46
   - *2.1 Notion et mesure du rendement quantique de fluorescence Φ_F.* *46*

2.2 Notion de temps de vie de fluorescence ... *47*
3. INFLUENCE DES SOLVANTS SUR LES FLUOROPHORES : SOLVATOCHROMIE ... 48
3.1 Polarisabilité des solvants et interaction entre la molécule et le solvant ... *48*
3.2 Déplacement de Stokes et équation de Lippert-Mataga ... *49*
4. FLUORESCENCE INDUITE PAR L'ABSORPTION A DEUX PHOTONS ... 52
4.1 Principe de l'absorption à deux photons ... *52*
4.2 Mesure de l'absorption à deux photons ... *54*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 56

CHAPITRE II – PREPARATION DE FONS A BASE DE MOLECULES DIPOLAIRES ... 60

1. INTRODUCTION ... 60
2. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE D2 EN SOLUTION MOLECULAIRE ... 64
2.1 Solvatochromie ... *64*
2.2 Absorption à deux photons ... *66*
3. PROPRIETE DE L'ETAT SOLIDE ET CRISTALLIN DE **D2** ... 67
4. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES NANOPARTICULES **D2** DANS L'EAU ... 68
*4.1 Absorption et émission des FONs **D2*** ... *68*
*4.2 Absorption à deux photons des FONs **D2*** ... *70*
*4.3 Caractéristiques des FONs **D2*** ... *71*
*4.4 Modification de la taille des FONs **D2*** ... *72*
*4.5 Mesure de la stabilité colloïdale des FONs **D2*** ... *74*
5. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES FONS **D3** DANS L'EAU ... 75
*5.1 Absorption, émission et caractéristique des FONs **D3*** ... *75*
*5.2 Mesure de la stabilité des FONs **D3*** ... *77*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 78

CHAPITRE III – EXPLORER LA SURFACE DES NANOPARTICULES PAR DIFFUSION DE SECOND HARMONIQUE ... 84

1. INTRODUCTION ... 84
1.1 L'optique non-linéaire ... *84*
1.2 La mesure de l'hyperpolarisabilité β ... *86*
2. CALCUL DE L'HYPERPOLARISABILITE β ... 87
3. MESURE DE L'HYPERPOLARISABILITE β_{HRS} DES DIPOLES **D2** ET **D3** EN SOLUTION ... 91
4. MESURES DE L'HYPERPOLARISABILITE β_{HRS} DES FONS **D2** ET **D3** DANS L'EAU ... 93

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 99

CHAPITRE IV – PREPARATION DE FONS EMETTRICES PROCHE IR A BASE DE MOLECULES DIPOLAIRES ... 106

1. INTRODUCTION ... 106
1.1 Le décalage vers le rouge pour l'imagerie ... *106*

1.2 Le casse-tête des filtres en imagerie *108*
2. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE **D4** EN SOLUTION 111
3. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES NANOPARTICULES **D4** 114
*3.1 Absorption et émission des FONs **D4*** *114*
*3.2 Caractéristiques des FONs **D4*** *114*
*3.3 Mesures de la stabilité des FONs **D4*** *116*
4. UTILISATION DES FONS D4 EN IMAGERIE 119
4.1 Imagerie par suivi de particule unique *119*
4.2 Imagerie cellulaire *120*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 124

CHAPITRE V – SYNTHESE ET PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE NOUVEAUX CHROMOPHORES QUADRIPOLAIRES 128

1. INTRODUCTION 128
2. DESIGN MOLECULAIRE 131
3. SYNTHESE DES QUADRUPOLES A BASE D'ACCEPTEURS ALDEHYDES 135
3.1 Synthèse du cœur fluorène *135*
*3.2 Synthèse des composés **5** et **6*** *136*
*3.3 Synthèse des aldéhydes **7** et **8*** *137*
*3.4 Synthèse des aldéhydes **10** et **11*** *138*
4. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES QUADRUPOLES ALDEHYDES EN SOLUTION 139
*4.1 Solvatochromie des aldéhydes **7**, **8**, **10** et **11*** *139*
*4.2 Absorption à deux photons des aldéhydes **7**, **8**, **10** et **11*** *142*
5. SYNTHESE DES QUADRUPOLES A BASE D'ACCEPTEURS VINYLIQUES 144
*5.1 Synthèse des accepteurs vinyliques **12** et **13*** *145*
*5.2 Synthèse des accepteurs vinyliques **14** et **15*** *146*
6. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES QUADRUPOLES ACCEPTEURS VINYLIQUES EN SOLUTION 146
*6.1 Solvatochromie des accepteurs vinyliques **12-15*** *146*
*6.2 Absorption à deux photons des accepteurs vinyliques **12-15*** *148*
7. SYNTHESE DES QUADRUPOLES DONNEURS 150
*7.1 Synthèse du donneur **17*** *150*
*7.2 Synthèse des donneurs **19** et **20*** *151*
*7.3 Synthèse des donneurs **21** et **22*** *153*
7.4 Tentatives d'élongation du système π des quadrupôles donneurs *153*
8. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES QUADRUPOLES DONNEURS EN SOLUTION 154
*8.1 Solvatochromie des donneurs **17**, **19-22*** *154*
*8.2 Absorption à deux photons des donneurs **17**, **19-22*** *158*
9. ETUDE DE LA LUMINESCENCE DES QUADRUPOLES DANS L'ETAT SOLIDE 160
*9.1 Fluorescence dans le solide des pseudos quadrupôles **5**, **6**, **16** et **23*** *161*
9.2 Fluorescence dans le solide des quadrupôles accepteurs *162*

9.3 Fluorescence dans le solide des quadrupôles donneurs *165*
10. ETUDE DES INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES DES QUADRUPOLES DANS L'ETAT CRISTALLIN 167

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 173

CHAPITRE VI – PREPARATION DE NANOPARTICULES ORGANIQUES A BASE DE CHROMOPHORES QUADRIPOLAIRES 180

1. PREPARATION DES FONS 180
2. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES FONS A BASE DE QUADRUPOLES 181
2.1 Influence de la nature du système π sur les FONs 181
1. Ajout d'un phényl ou d'un thiophène 181
2. Ajout d'un vinyl 185
2.2 Influence de la nature des groupements donneurs ou accepteurs sur les FONs 186
2.3 Influence de l'encombrement du cœur sur les FONs 189
3. CARACTERISTIQUES DES FONS DANS L'EAU 191
3.1 Détermination de la taille des FONs 191
3.2 Absorption à deux photons des FONs 196
3.3 Stabilité colloïdale et chimique des FONs 198
4. APPLICATION DE LA THEORIE DE L'EXCITON MOLECULAIRE AUX FONS 201

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 207

CHAPITRE VII – MODIFIER LA SURFACE DES FONS EN VUE D'AMELIORER LEURS PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES 210

1. INTRODUCTION 210
2. PREPARATION DES FONS ENROBEES 212
3. IMPACT DE L'ENROBAGE SUR LES CARACTERISTIQUES DES FONS 215
3.1 Impact sur la fluorescence 215
3.2 Impact sur la taille des FONs 219
3.3 Impact sur les propriétés d'absorption à deux photons des FONs 222
3.4 Impact sur la stabilité des FONs 223
4. ETUDE PAR MICROSCOPIE DE SUIVI DE PARTICULE UNIQUE SUR LES FONS 14 EMBALLEES 226
5. INFLUENCE DU POLYMERE SUR LA PHOTOSTABILITE DES FONS EMBALLEES 228

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 231

CHAPITRE VIII – UTILISATION DES FONS EN IMAGERIE MULTI-COULEUR PAR SUIVI DE PARTICULE UNIQUE (SPT) 236

1. INTRODUCTION 236
2. CHOIX DES FONS POUR L'IMAGERIE MULTI-COULEUR 238
3. MONTAGE DE LA PLATEFORME D'IMAGERIE 239
4. MESURE DE LA PHOTOSTABILITE DES FONS 240
5. EXPERIENCE DE SPT DANS L'EAU 242

5.1 Validation du montage ... *242*
5.2 Imagerie multi-couleur ... *244*
6. IMAGERIE MULTI-COULEUR SIMULTANEE DES FONS EN MILIEU CELLULAIRE ... 245

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... **248**

CONCLUSION GENERALE ... **250**

ARTICLES SOUMIS ... **252**

ABREVIATIONS ... **254**

GRANDEURS ET UNITES PHOTOPHYSIQUES ... **256**

ANNEXE ... **258**

1. CHROMOPHORES DIPOLAIRES : ... 258
2. CHROMOPHORES QUADRIPOLAIRES : ... 258

PARTIE EXPERIMENTALE ... **264**

1. DETAILS EXPERIMENTAUX ... 264
1.1 Synthèse ... *264*
1.2 Caractérisation des chromophores ... *264*
1.3 Caractérisation des nanoparticules ... *265*
1.4 Photophysique ... *265*
2. SYNTHESE DES FLUOROPHORES QUADRIPOLAIRES ... 266
3. PREPARATION DES FONS ... 289
4. PROTOCOLE D'IMAGERIE DE MESURE DE LA PHOTOSTABILITE ET DU SUIVI DE PARTICULE UNIQUE ... 289
4.1 Dans l'eau ... *289*
4.2 En milieu cellulaire ... *290*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... **292**

Introduction

Introduction

Depuis la découverte de « l'effet nano » (apparition de nouvelles propriétés de la matière lorsqu'elle est assemblée à l'échelle nanométrique), le nombre d'articles afférents à la préparation et à l'utilisation de nano-objets pour l'imagerie biologique et médicale ne cessent d'augmenter (figure 1). D'ailleurs, en comparant les mots clefs « nano » et « molécule » dans la littérature spécialisée dans l'imagerie biologique et médicale, on remarque une dominance nette du concept « nano », laissant penser que le nano touche une communauté plus large.

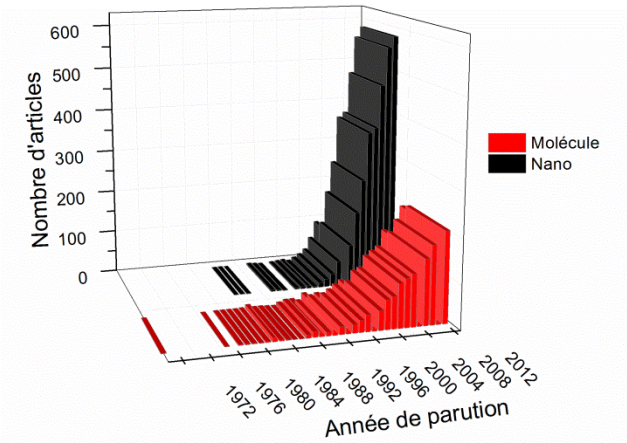


Figure 1. Occurrence des mots clefs « nano » et « molécule » dans la littérature en lien avec l'imagerie biologique et médicale depuis 1969 à 2012.

Cette augmentation du nombre de publications est le reflet d'une révolution dans les sciences du vivant. Celle-ci est en partie animée par l'évolution rapide des techniques de microscopie, permettant d'aller toujours plus loin dans les résolutions (spatiales et temporelles). En effet, depuis quelques années, la microscopie optique a atteint une telle performance qu'avec la microscopie à très haute résolution, des images d'objets submicrométriques, avec une résolution supérieure à ce que prévoit la théorie (~200 nm) ont pu être obtenues (figure 3).

L'importance de cette technologie a d'ailleurs été mise en avant par l'obtention du prix Nobel de chimie 2014 par E. Betzig, S.W. Hell et W. E. Moerner, pour leurs travaux sur la microscopie de fluorescence à très haute résolution aussi appelée nano-imagerie.

1. L’imagerie biologique par fluorescence

L’intérêt de la haute résolution dans l’étude des phénomènes biologiques vient du fait que s’il est possible de distinguer deux objets émissifs distants de quelques dizaines de nm, il devient alors possible d’obtenir des données précieuses quant à ces phénomènes. Atteindre une haute résolution permet en outre de distinguer clairement les différents acteurs lorsque plusieurs fluorophores sont utilisés simultanément dans une même expérience d’imagerie.

Pour sa qualité de contraste, l’imagerie de fluorescence demeure jusqu’à présent une technique de choix pour l’étude de processus biologiques par imagerie optique. L’utilisation de différentes longueurs d’onde d’excitation permet de réduire fortement le bruit de fond. Cette augmentation du rapport « signal sur bruit » permet un très fort contraste, et donc une meilleure qualité d’image.

1.1 Imagerie par fluorescence induite à deux photons

Cependant, l’inconvénient majeur de la microscopie de fluorescence vient du manque de sélectivité dans l’excitation. En effet, toutes les molécules excitables, se trouvant sur le trajet optiques, peuvent être potentiellement excitées, notamment certains chromophores endogènes (NADH, tyrosine, tryptophane, FAD…).[1] L’émission des chromophores endogènes ainsi que des fluorophores exogènes le long du trajet optique conduit à l’obtention d’images floues et complexes à étudier.

Pour pallier au manque de résolution spatiale en microscopie de fluorescence, Watt W. Webb publia une technique d’imagerie de fluorescence faisant appel à l’absorption biphotonique. Cette technique d’imagerie par excitation à deux photons[2-5] permet d’exciter sélectivement les chromophores au point focal du microscope éliminant ainsi le flou présent en imagerie de fluorescence classique.

L’intérêt majeur de cette technique par rapport à la microscopie classique réside dans l’utilisation potentielle de grandes longueurs d’onde atténuant ainsi l’interaction entre la source lumineuse et la matière observée (c.-à-d. diminution des phénomènes de diffusion et d’absorption). Cette technique d’imagerie, largement répandue, couplée à des fluorophores spécifiques a permis d’accéder à des données et des détails jusque là invisibles en microscopie classique.[6, 7]

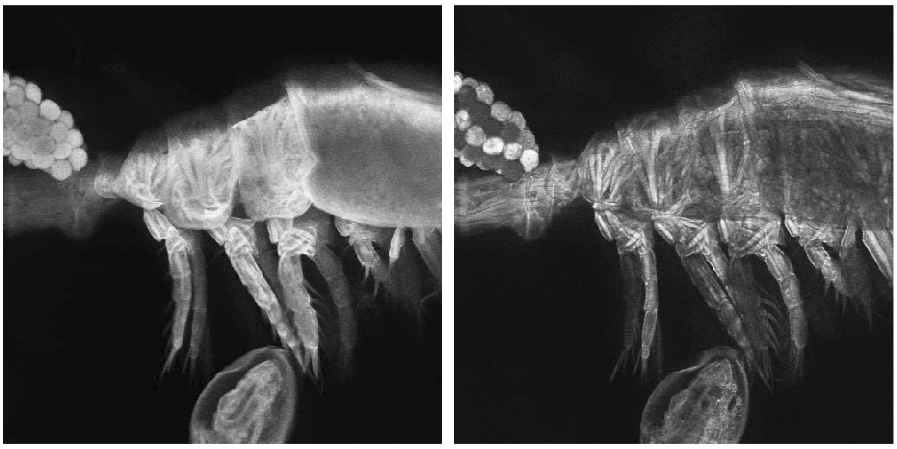


Figure 2. Observation de l'autofluorescence de daphnie (puce d'eau) par microscopie confocale (gauche) et microscopie biphotonique (droite).[8]

1.2 Imagerie par fluorescence à haute résolution : STED

Quelques années après la publication de W. W. Webb,[3] Stefan W. Hell et Jan Wichmann publièrent un article concernant une nouvelle technique d'imagerie par fluorescence[9] permettant d'atteindre une résolution de 35 nm. La technique utilisée se nomme Déplétion de l'Emission Stimulée (STED) et permet par l'utilisation d'un second laser STED de saturer les fluorophores autour du point focal. Cette saturation permet d'éteindre les fluorophores périphériques et par traitement de l'image, d'outrepasser la limite de diffraction imposée aux systèmes optiques et d'obtenir ainsi une résolution de l'ordre de la dizaine de nm.

Bien que l'imagerie par STED permette d'atteindre une haute résolution, l'utilisation de longueurs d'ondes excitatrices dans le visible ne permet pas d'imager efficacement les échantillons en profondeurs dans des milieux fortement diffusants.[10] Les longueurs d'onde comprises entre 400-600 nm sont fortement diffusées dans les tissus, ce qui défocalise le laser tout en induisant une perte massive de puissance du faisceau.

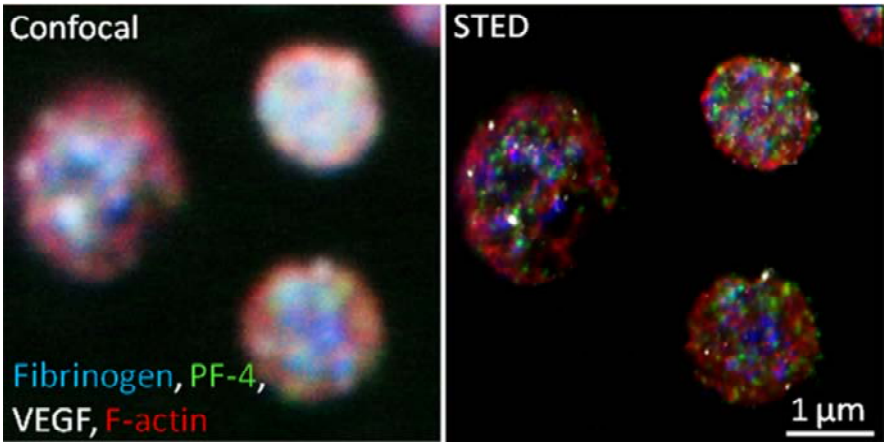


Figure 3. Différence de résolution entre une image obtenue par imagerie confocale (gauche) et par imagerie STED (droite) sur l'organisation de protéines à la surface de fibrinogène et d'actine.[11]

Pour les longueurs d'onde supérieures à 1 200 nm, l'inconvénient majeur vient de l'absorption de l'eau. L'utilisation de laser excitant dans cette fenêtre biologique 600-1200 nm est donc essentielle pour sonder profondément les tissus biologiques. Malheureusement, le positionnement et la largeur de cette fenêtre biologique nécessitent l'utilisation de fluorophores absorbeurs rouges et émetteur proche IR complexes à synthétiser et bien souvent peu brillants et stables.[12]

Une technique d'excitation particulière permet d'améliorer la compatibilité entre le chromophore et la fenêtre biologique. Cette technique est l'excitation multiphotonique, qui permet d'exciter des fluorophores absorbants dans le visible avec une longueur d'onde se situant dans le rouge/proche infrarouge.[3]

Dans le but d'optimiser sa technique d'imagerie, S. W. Hell publia en 2009 un article dans lequel il mélange les technologies de STED et d'absorption biphotonique. Ce mariage, entre deux outils puissants, lui a permis d'observer des cellules en très haute résolution jusqu'à une profondeur de 0.8 µm.[13]

1.3 Développement d'outils performants pour l'imagerie de fluorescence

Il existe bien d'autre technique de microscopie de fluorescence à haute résolution (STORM,[14] PALM,[15] etc..) ; cependant, toutes ces techniques ont en commun la nécessité d'utiliser des fluorophores stables et brillants en milieu biologique. La notion de brillance ($\varepsilon\Phi$) permet de mettre en relation la capacité d'absorption (ε exprimé en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) d'un fluorophore et sa capacité d'émission (Φ), deux paramètres essentiels en imagerie.

De nombreux efforts ont été faits durant les dernières décennies dans le but d'obtenir des molécules brillantes et compatibles avec la fenêtre biologique. Malgré ces efforts, la majorité des fluorophores commerciaux actuels présentent une photostabilité modérée ainsi que des déplacements de Stokes faibles.[16-18] L'inconvénient pour une molécule à posséder un déplacement de Stokes petit provient de la forte proximité (spectralement parlant) entre les bandes d'absorptions et d'émissions, pouvant conduire à une pollution de l'excitation lors de la collecte de l'émission. De plus, la photostabilité est un paramètre important pour une sonde fluorescente destinée à être employée dans les milieux cellulaires/biologiques.

La photo-instabilité vient du fait que le milieu cellulaire est un environnement très hostile, combinant des variations importantes de pH selon les organelles,[19] la présence d'espèces pouvant être complexées (ions métalliques) ou bien la présence d'oxydants forts, tels que les ROS (Reactive Oxygen Species)[20-22] ou RNS (Reactive Nitrogen Species).[23, 24] De telles conditions peuvent, lorsque le chromophore n'est pas protégé, favoriser son oxydation lorsqu'il se trouve à l'état excité, ce qui modifie profondément ses propriétés photophysique, et peut provoquer alors une extinction partielle, voire totale, de sa luminescence.[25, 26]

Dans certains cas, de telles modifications du fluorophore dans le milieu biologique sont utilisées pour détecter et mesurer la présence de certains ions voire de quantifier le pH cellulaire ou tissulaire.[27-30] Cependant, ces sondes peuvent être dégradées avant leur arrivée sur le site d'action ou bien lors de leur irradiation par des processus de photo-oxydation. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils présentant d'excellentes stabilités chimiques et photochimiques, en vue d'améliorer la qualité et la précision des clichés, nécessaires à une meilleure compréhension des phénomènes observés.

Plusieurs stratégies ont été mises au point afin d'obtenir des composés luminescents stables en milieu biologique. Une grande majorité de ces stratégies implique l'utilisation d'objets de taille nanométrique, appelés nanoparticules (NPs).[31-44]

D'après l'IUPAC, une nanoparticule est « une particule microscopique dont la taille est mesurée en nanomètres. Le terme nanoparticule est généralement utilisé pour caractériser des particules dont la taille aérodynamique est inférieure à 100 nm ».[45]

Le confinement des atomes ou molécules à l'échelle nanométrique permet de donner des propriétés très intéressantes aux nanoparticules (effet « nano ») majoritairement dominées par l'apparition de nouvelles propriétés optiques.[46-50]

2. L'effet "nano"

2.1 Nanoparticules semi-conductrices

Les nanoparticules de type semi-conducteur (quantum dots, or, argent, silicium…), sont caractérisées par l'apparition d'une bande de résonnance plasmon. Cette résonnance plasmon résulte de l'interaction entre le rayonnement électromagnétique de la lumière et la nanoparticule. Cette interaction est caractérisée par une oscillation des électrons libres des atomes constituant la nanoparticule, entrés en résonnance avec le champ électromagnétique, provoquant l'apparition d'une bande appelée plasmon.[51-54] Cette bande plasmon se manifeste souvent dans le visible (λ = 400-750 nm) et est fortement dépendante du type de métal utilisé dans la nanoparticule,[53] de sa taille[52, 54] et de sa forme.[53] Lorsqu'une nanoparticule de type semi-conductrice est excitée *via* sa bande plasmon, l'émission de luminescence a lieu par effet de recombinaison paire/trou.[55]

2.2 Nanoparticules organiques luminescentes

Les nanoparticules à base de composés organiques sont aussi affectées par l'effet de confinement. Dans certains cas, l'agrégation sous forme de NPs modifie profondément les caractéristiques photophysiques des chromophores. Certains chromophores non luminescents en solution développent une forte luminescence lorsqu'ils sont agrégés sous forme de NPs.[50] Des déplacements des bandes d'absorptions et d'émissions sont aussi observés pour des chromophores lors du confinement.[37, 56, 57] Contrairement aux nanoparticules semi-conductrices, l'effet « nano » des nanoparticules organiques luminescentes est surtout dû aux interactions intermoléculaires au sein des NPs.

Un nombre conséquent d'objets nanométriques dédié à des applications biomédicales ainsi qu'à l'imagerie biologique est décrit dans la littérature. Par souci de clarté, seules les principales sources de NPs les plus abouties sont brièvement décrites dans ce manuscrit : les semi-conducteurs métalliques (QDs, or, argent), les NPs de terre rare, les NPs de silice, les

NPs issues du carbone (diamant, fullerène, nanotube), les NPs de polymères, les dendrimères et les FONs (Fluorescent Organic Nanoparticles).

3. Les nanoparticules inorganiques

3.1 NPs semi-conductrices : QDs

Les quantums dots (QDs) sont des nanoparticules à base de métaux lourds (généralement le cadmium, le sélénium ou le plomb) préparées par synthèse chimique. Des précurseurs métalliques (c.-à-d. CdO et TOP-Se pour certains QDs de type CdSe) sont chauffés à très haute température (>150 °C) jusqu'à ce que la taille souhaitée des QDs soit atteinte.[58] Puisque la taille de ces NPs augmente avec le temps de réaction, et puisque les propriétés photophysiques des QDs varient avec la taille, un simple suivi par absorption UV-visible permet de contrôler efficacement la taille des nanoparticules. Afin d'assurer une bonne stabilité colloïdale aux QDs, ceux-ci sont enrobés de surfactants dont la composition varie selon les applications (PEG, phospholipides, dérivés thiolés).[41]

Pour les QDs, le contrôle de la taille est un paramètre crucial, puisque du fait du confinement quantique, les propriétés d'absorption et d'émission des QDs dépendent de leur taille.[47, 59, 60] Ainsi, seuls les QDs de grandes tailles (diamètre > 6 nm pour le cœur seul) peuvent émettre dans le rouge et le proche IR (illustration 1).

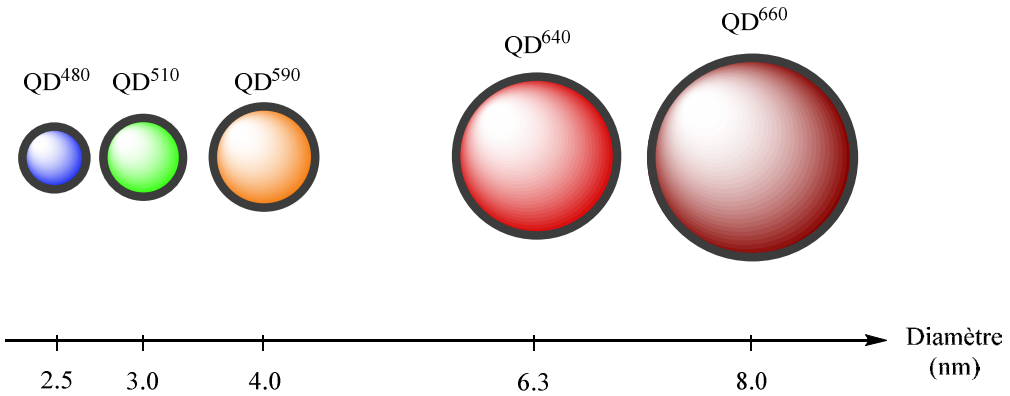


Illustration 1. Correspondance entre la couleur de fluorescence et la taille de quantum dots CdSe/ZnS.[61]

La synthèse des QDs est largement décrite dans la littérature, avec des productions de QDs monodisperses à l'échelle de la centaine de grammes[62] pour un coût relativement modeste.

Ces avantages ont permis aux QDs d'être intensivement utilisés dans de très nombreux domaines et plus particulièrement en imagerie biologique.[31, 63, 64] Cette utilisation massive des QDs en bioimagerie provient de leur excellente photostabilité ainsi que de leurs brillances longtemps inégalées ($\varepsilon\Phi$ ~1 10^6 $L.mol^{-1}.\ cm^{-1}$).[65]

Néanmoins, la présence de métaux lourds toxiques (Cd, Pb, Se, Te, As) pose de réelles questions quant à l'innocuité de ces systèmes en vue d'applications médicales.[66, 67]

Bien que de nombreux efforts aient été fournis afin de protéger le milieu extérieur du cœur toxique des QDs, de récentes études ont montré que les surfactants utilisés pour stabiliser les QDs présenteraient une cytotoxicité relativement élevée.[68-70] De fait, l'utilisation de tels systèmes dans des applications médicales ne peut être envisagée à long terme, en partie dû à la possible bioaccumulation[71] pouvant entraîner une toxicité à long terme.[72]

L'impact environnemental de ces QDs vis-à-vis de la pollution aquatique est également pointé du doigt,[73] puisque de par leur composition, ces nanoparticules sont non biodégradables. Enfin, l'impact de la pollution liée à leur élimination/recyclage n'est toujours pas déterminé.

3.2 NPs d'or et d'argent

Afin d'éviter l'utilisation de métaux lourds toxiques, de nombreux groupes se sont penchés sur la préparation de NPs métalliques à base de métaux nobles, tels que l'or ou bien l'argent. Ces NPs sont bien souvent synthétisées par voie chimique *via* la réduction de sels métalliques correspondants, permettant ainsi d'obtenir des NPs de tailles variant de quelques nm à quelques dizaines de nm.[74-76] En marge de la synthèse de NPs d'or par voie chimique, plusieurs travaux rapportent la biosynthèse de NPs d'or et d'argent à partir de plantes.[77-80] L'affinité de l'or pour les thiols permet de greffer facilement des fonctions de reconnaissance nécessaires afin d'augmenter l'affinité entre la NPs et son site d'action.

Il est intéressant de noter que l'argent sous forme de NPs, conserve ses propriétés antimicrobiennes,[76, 81] malgré le confinement quantique. Cette caractéristique des NPs d'argent en font des NPs très prometteuses en tant qu'agent antimicrobien luminescent.

Les NPs d'or et d'argent possèdent toutes les deux des bandes plasmons, leurs permettant d'absorber et d'émettre dans le visible avec une dépendance des propriétés optiques vis-à-vis de leur taille et morphologie (figure 5).

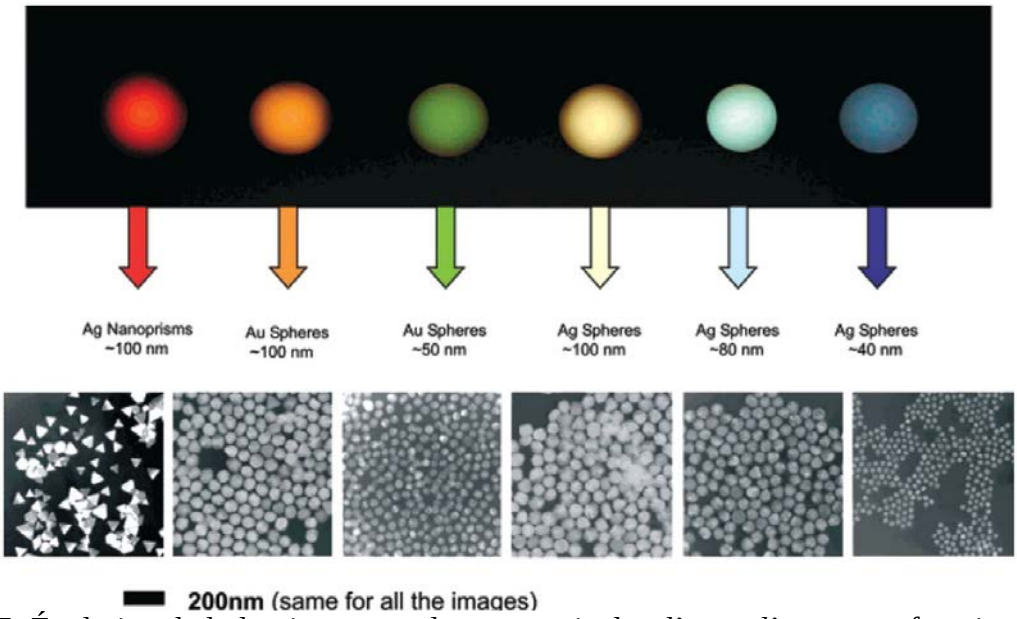


Figure 5. Évolution de la luminescence de nanoparticules d'or et d'argent en fonction de leur taille et morphologie.[82]

Du fait de leur composition, ces nanoparticules ne sont pas solubles dans l'eau, il est donc nécessaire de les enrober à la surface à l'aide d'agents solubilisant (chaînes PEG, amine, acide carboxylique) afin d'assurer leur bonne dispersion dans l'eau. L'inconvénient de cette approche est double : l'introduction de groupements hydrosolubilisants augmente significativement le diamètre des NPs (d'un facteur deux à trois) et ajoute une toxicité plus ou moins importante,[66] rendant la nanoparticule potentiellement toxique.

Il est important de noter que les NPs d'argent sont connus pour induire la formation de ROS[69] induisant des phénomènes de stress oxydatif et perturber le fonctionnement cellulaire. De même, des travaux ont montré que les NPs d'or de très faible taille (< 2 nm) provoquent la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, alors que les NPs de faibles tailles (15 nm) sont bien moins toxiques.[69, 83]

3.3 NPs de silice

Les nanoparticules de silice (figure 6) se divisent en deux catégories : les NPs de silice amorphe (SiO_2-NPs) et les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNPs) et sont obtenues

par des procédés de type sol-gel à partir de l'orthosilicate de tétraéthyle (procédé Stöber).[84] La préparation de ces NPs est très simple et permet un excellent contrôle de la taille des NPs avec des tailles variant de la dizaine à la centaine de nm selon les conditions opératoires.[85, 86] Toutefois, ces NPs ne sont pas fluorescentes à l'état natif et nécessitent l'emploi d'un fluorophore greffé à la surface[87, 88] ou l'intérieur, voir présent de façon non covalente à l'intérieur de la nanoparticule.[89-93]

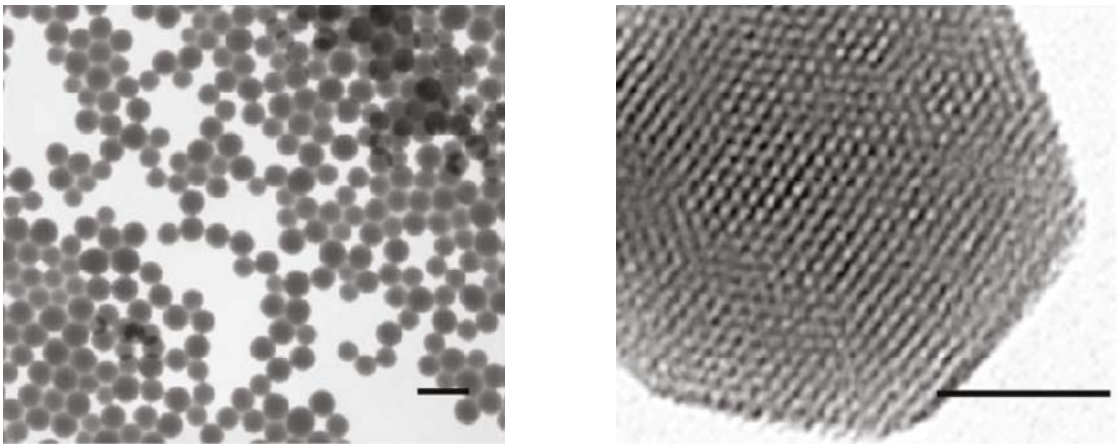


Figure 6. Images TEM de NPs de silice amorphe (gauche) et mésoporeuse (droite). Echelle à gauche : 200 nm ; Echelle à droite : 50 nm.[94]

Bien que non luminescentes nativement, ces NPs sont très étudiés puisqu'elles sont des plateformes idéales pour la fonctionnalisation de surface. Cette fonctionnalisation peut se faire *via* des dérivés silylés et permet de doter la NPs de fonction de reconnaissance pour la détection de cellules cancéreuses.[95, 96]

Des études montrent que les nanoparticules de silice amorphe ont une activité biologique non négligeable [97-100] pouvant limiter à terme leur utilisation en imagerie au profit des MSNPs.

La biocompatibilité des NPs de silice mésoporeuse est communément admise[101, 102] pour être élevée. Cette différence de biocompatibilité semble être due à plusieurs facteurs incluant taille, la porosité et la surface des NPs de silice amorphe ou poreuse.[94, 103] Néanmoins l'absence de standard dans les mesures de toxicité et d'activité biologique des NPs (tailles de NPs, type de surface) ne permet pas de déterminer des tendances fiables quant à la différence de toxicité entre les NPs de silice.

3.4 NPs à base de terres rares : UCNPs

Les NPs à base de terres rares (Y, Yb, Er, La, Gd) constituent un type particulier de NPs inorganiques émissives. De nombreuses voies de synthèse permettent d'obtenir ces NPS (méthode hydrothermale,[104] co-précipitation,[104] sol-gel,[104] etc..), donnant ainsi accès à des objets de tailles et de formes différentes.

Ces NPs à base de terres rares sont souvent appelées Up-Conversion Nanoparticles (UCNPs) en raison de leur comportement singulier. Ces NPs sont connus pour avoir un comportement anti-Stokes, c'est-à-dire que l'excitation du matériau se fait à une longueur d'onde plus grande que l'émission de celui-ci. Contrairement aux NPs semi-conductrices, la luminescence des UCNPs est due à la luminescence des terres rares.

Cette luminescence est obtenue par des transferts d'énergies entre différents atomes de terres rares (figure 7) induits par l'absorption de deux photons. Il est important de souligner que cette excitation est différente de l'absorption à deux photons classique, puisque l'excitation des UCNPs passe par des états électroniques réels dont le temps de vie dépend de l'atome de terres rares donneur, appelée absorption dans l'état excité (ESA).

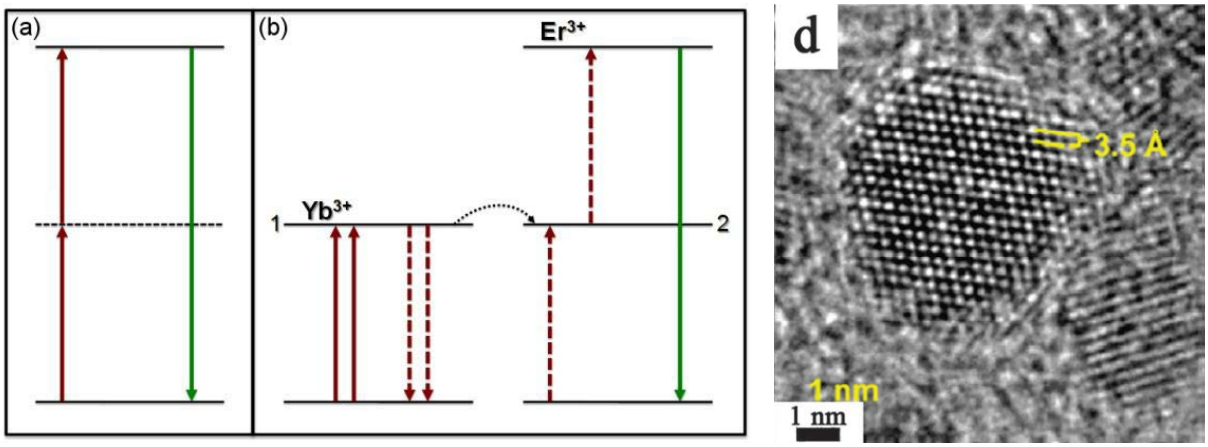


Figure 7. Processus d'émission de fluorescence (flèches vertes) par excitation à deux photons (flèches rouges pleines) classique (a) et par transfert d'énergie (flèches en pointillés) dans des UCNPs $NaYF_4$:Er, Yb (b) (gauche).[105] Image TEM de UCNPs $NaYF_4$:Er, Yb[106] (droite).

Ces UCNPs cumulent de nombreux avantages tels qu'une faible toxicité,[63] une bonne photo-stabilité,[107] une émission "fine" et l'excitation par des longueurs d'onde de basse énergie (rouge, proche infrarouge)[63] permettant une irradiation de ces NPs dans la fenêtre biologique.

Néanmoins les UCNPs comme les autres NPs inorganiques nécessitent l'utilisation d'agents de surface pour augmenter leur stabilité colloïdale. L'utilisation de ces agents d'enrobage permet aussi d'augmenter la faible luminescence de ces NPs ($\Phi_f < 0.01$), en limitant les interactions entre la nanoparticule et le solvant.[63, 104] Ces nanoparticules inorganiques sont prometteuses,[108] mais pour pouvoir pleinement tirer parti de leur potentiel pour l'imagerie biologique, de nombreux efforts doivent être fournis pour augmenter leur luminescence.

4. Les nanoparticules organiques

4.1 NPs de carbone : fullerènes et nanotubes

Les NPs à base de carbone « pur », sont composées de plusieurs types : le diamant, le fullerène et les nanotubes.

Les fullerènes de type « ball » sont des nanoparticules sphériques composées d'un nombre défini d'atomes de carbone, le plus connu et utilisé est le C_{60} (composé de 60 atomes de carbones, figure 8). Ces objets nanométriques sont obtenus dans les poussières issues de la combustion d'hydrocarbures.[109] Bien que luminescentes, ces NPs de carbone sont peu utilisés en bioimagerie.

Ceci est certainement motivé par la faible pénétration cellulaire des fullerènes, associée avec une forte toxicité. Cette toxicité provient majoritairement de la fixation de ces NPs sur les membranes plasmiques et de leur accumulation dans de nombreux compartiments cellulaires (lysosomes, noyau, cytoplasme, etc.…).[66] L'affinité spécifique de ces NPs pour le matériel biologique ainsi que la faible pénétration cellulaire limite fortement leur application en biologie.

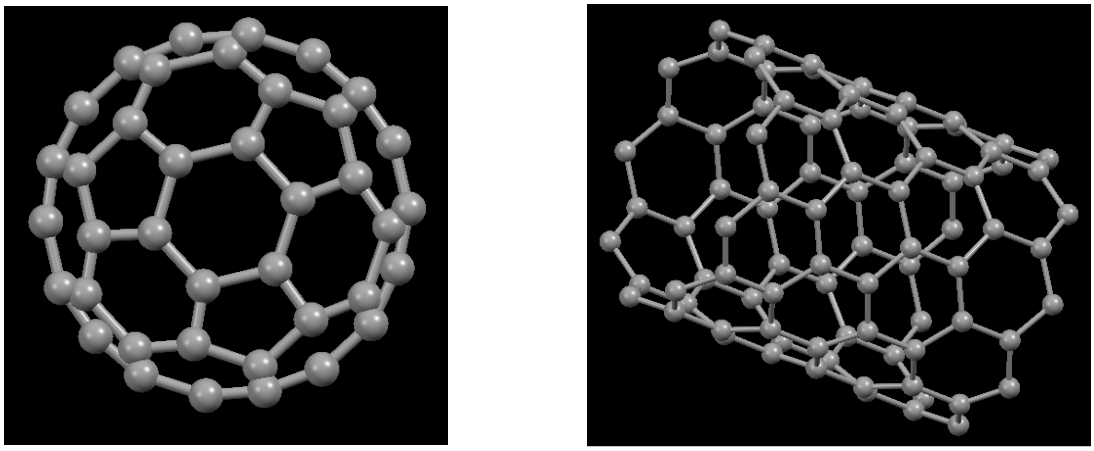


Figure 8. Structure du fullerène C_{60} (gauche) et d'un nanotube de carbone (droite).

Les nanotubes (NTs) de carbones sont des nanoparticules appartenant à la famille des fullerènes, et sont les NPs de carbone les plus étudiées en imagerie. Ces nanoparticules tubulaires sont préparées par déposition de vapeurs chimiques, par ablation laser ou bien par décharge d'arc électrique.[110, 111] Les NTs peuvent avoir une seule paroi (on parle alors de Single-Walled NTs) ou bien plusieurs parois (Multi-Walled NTs). Les SWNTs sont plus difficiles à produire et purifier que les MWNTs.

Cependant, la meilleure flexibilité des SWNTs ainsi que leur plus faible bioaccumulation rendent ces NTs plus attractifs pour l'imagerie du vivant.[110] La longueur de ces NPs varie de quelques centaines de nm jusqu'au micromètre, et leur section possède un diamètre de l'ordre de la dizaine de nanomètres (justifiant ainsi l'appellation NPs).

L'absence de solubilité des NTs de carbone nécessite la présence de groupements hydrosolubilisants à la surface de ces objets *via* des interactions non covalentes ou bien par greffage.[112] L'oxydation suivie ou non d'amidation permet de modifier la surface des NTs et ainsi, selon la nature de la surface, l'enrobage peut se faire par interactions électrostatiques avec des polymères de type PEG-amine, phospholipides,[43] ou chitosan.[113] L'enrobage qu'il soit covalent ou non joue un double rôle : en plus d'augmenter la solubilité dans l'eau, ce greffage permet de diminuer l'agrégation des NTs, préservant ainsi leur fluorescence.

Malheureusement, les NTs sont très peu luminescents et selon le diamètre du nanotube, la fluorescence des SWNTs décline fortement lorsque le pH diminue en dessous du pH physiologique.[114] Néanmoins, ces NPs émettent dans une large gamme spectrale couvrant le rouge et le proche IR ce qui est très intéressant pour l'imagerie et permet de

compenser leur faible luminescence (via l'augmentation du contraste signal/bruit dans la fenêtre biologique).

Un second avantage est leur forme tubulaire qui en fait d'excellents candidats pour la distribution de substances actives.[115, 116] L'utilisation des NTs en tant que nanocargo, associé à leur luminescence et à la possibilité de greffer des motifs de reconnaissance à leur surface (c.-à-d. l'acide folique)[113] font de ces objets des outils prometteurs pour des applications théranostiques.

Outre la toxicité apportée par les agents hydrosolubilisants, certains articles alertent sur la possible toxicité des NTs[66] principalement par leur bioaccumulation suivie de leur agrégation[117] ou bien par la présence de résidus de métaux issus de leur synthèse.[118] Il est important de souligner qu'un des facteurs de toxicité probable des NTs est dû à leur morphologie. En effet, la forme en aiguille de ces nano-objets, combinée à leur grande envergure pourrait entraîner des dommages aux cellules ainsi qu'aux tissus.[43, 117]

4.2 NPs de carbone : NDs

Les nanodiamants (NDs) sont probablement les NPs issues du carbone les plus prometteuses ; comme les fullerènes, les NDs sont composés presque essentiellement de carbone. Ces NPs sont obtenues selon divers procédés, tels que, le chauffage à très haute pression ou bien par explosion de TNT (trinitrotoluène) en absence d'oxygène dans une bombe. Le procédé permettant de produire des NDs par explosion de TNT est appelé détonation ;[119] il permet d'obtenir facilement et à moindre coût des NPs de petites tailles variant de quelques nm à la dizaine de nm. Le contrôle de la taille de ces NPs se fait majoritairement par le contrôle de la vitesse de refroidissement précédent l'explosion.

Ces nanoparticules de carbone sont naturellement fluorescentes, cependant cette luminescence est dépendante de la qualité du cristal ; la présence de défauts cristallins permet à ces NPs d'émettre dans la gamme du visible ainsi que dans le proche IR.[119]

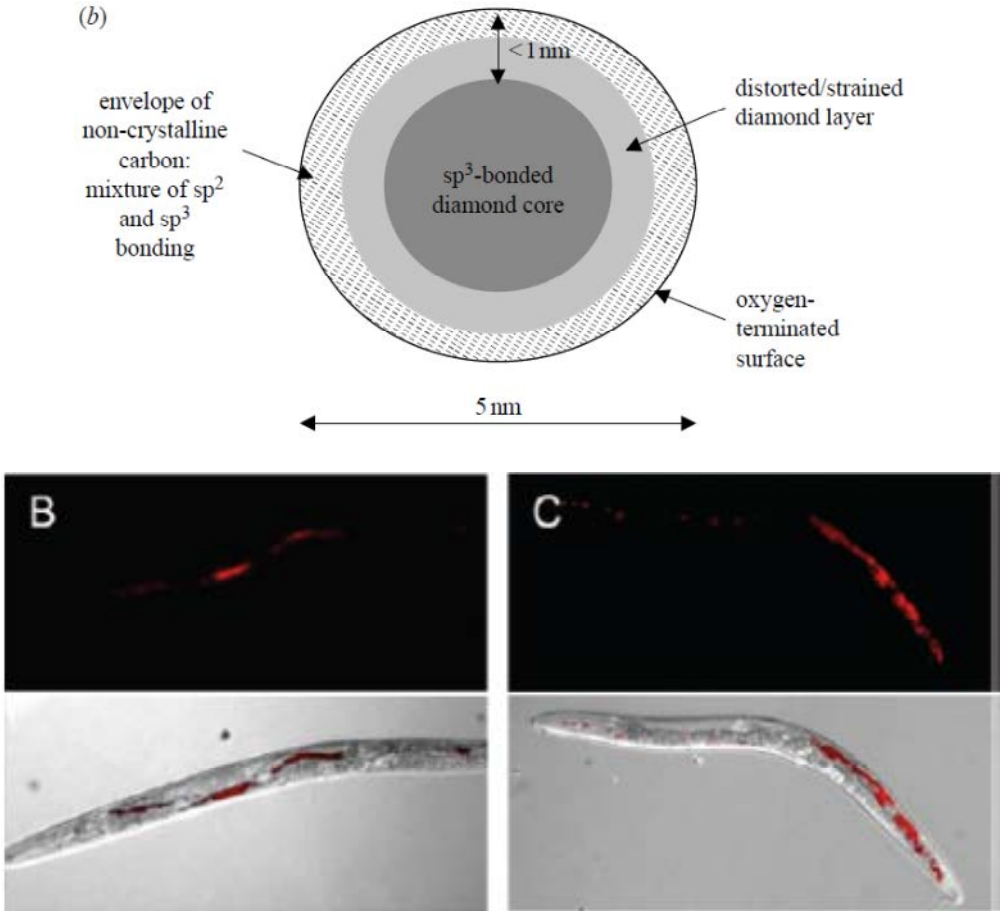


Figure 9. Proposition de la composition d'un NDs obtenu par détonation (haut)[119] et observation par fluorescence de NDs ingérés par des vers *C. elegans* (bas).[120]

Des tests in vivo ont montré que la présence de NDs chez le vers n'affectait pas le fonctionnement biologique de celui-ci (figure 9) et n'impactait ni sa reproduction ni ses descendants.[120] À l'inverse, des travaux sur la souris ont montré une intoxication à court terme (48h) pour de faibles doses (4 mg/ kg), cependant les auteurs insistent sur le fait que les NDs ont une bonne biocompatibilité avec de nombreux types de cellules.[121]

Malgré les incertitudes concernant leur possible toxicité, la brillance, l'excellente photostabilité, l'émission dans le rouge/proche IR ainsi que la possibilité de fonctionnaliser la surface sont des atouts essentiels faisant de ces NPs des outils prometteurs pour l'imagerie biologique.

4.3 NPs enrobées : polymères luminescents et dopés

Dans la course pour la préparation de nano-objets brillants pour l'imagerie, les polymères ont pris une place de choix. Deux types de stratégies sont employés pour produire

des polymères luminescents : polymériser des chromophores ou emballer de polymère biocompatible un polymère.

La préparation de polymères fluorescents par polymérisation de monomères fluorescents ou profluorescents (phénomène AIE) est un sujet de recherche très populaire. L'engouement pour ces NPs provient de l'infinité de combinaisons de polymères possibles. Contrairement aux NPs semi-conductrices ou aux NPs de carbones, les NPs de polymère ne sont pas limitées par leur composition puisque les possibilités de synthèse des molécules sont quasi infinies.

Puisque les NPs de polymères sont préparées par précipitations du polymère dans l'eau (voire section FONs) le phénomène d'agrégation issu de cette précipitation contraint le polymère à se « contracter ». Ce confinement important fige les sous-unités chromophoriques au sein du polymère. Cette paralysie des chromophores ainsi que l'absence de solvant à proximité du cœur du polymère contribue à augmenter la luminescence de ces NPs.[122] Les motifs récurrents sont les polyfluorènes,[34, 123-125] les polythiophènes,[34, 126-128] ainsi que des dérivés fortement conjugués.[34, 125, 127, 129-131]

Les NPs de polymères dopés sont fortement utilisées puisqu'elles permettent à partir d'un chromophore commercial, de préparer rapidement des nanoparticules fluorescentes en encapsulant ce chromophore dans une matrice polymérique par voie covalente,[132, 133] ou non covalente.[33, 134, 135] Cette encapsulation permet d'augmenter la fluorescence en diminuant les interactions entre le fluorophore et le solvant. Les matrices d'encapsulation dépendent de la fonction attribuée à la nanoparticule.

Dans le but de conférer une bonne stabilité colloïdale en plus d'une bonne biocompatibilité, les matrices habituellement utilisées sont des dérivés polylactiques (PLA et PLGA)[136-139] ou bien des PEG. Dans le but de conférer une fonction de ciblage à la nanoparticule, des phospholipides contenant des motifs de reconnaissances peuvent être utilisés comme l'acide folique.[33, 134]

Contrairement aux NPs de polymères luminescents, les NPs de polymères dopés utilisent majoritairement des polymères biocompatibles et biodégradables (c.-à-d. PLGA) comme agent d'enrobage. Cette approche diminue l'impact de ces NPs sur le vivant et sur l'environnement (dans la mesure où le produit de dégradation n'est pas toxique).

La brillance, la biocompatibilité ainsi que la possibilité d'adjoindre des fonctions de ciblages des NPs de polymères luminescents et dopés expliquent l'intérêt croissant de la biologie pour cette technologie.

4.4 Dendrimères

L'approche dendrimérique est très similaire à celle utilisée pour la préparation des NPs de polymères dopés, à savoir la protection d'une ou plusieurs entités émissives à l'intérieur d'une coque plus ou moins rigide. Ces molécules nanométriques sont composées de trois sous-unités : le cœur, les branches et la section périphérique.

Pour des applications de bioimagerie, l'encapsulation a pour but de protéger les sous-unités chromophoriques de l'interaction avec le milieu biologique. Pour cela, les chromophores (branches) sont liés de façon covalente à une plateforme commune (le cœur), puis des oligomères hydrosolubilisants sont ajoutés de façon covalente à l'extrémité des branches, formant ainsi une macromolécule de taille nanométrique.

L'intérêt majeur des dendrimères vient de leur formidable souplesse structurale. Il est par exemple possible de n'intégrer qu'un seul chromophore[44, 140] ou bien 96 chromophores,[141] d'intégrer des fluorophores absorbants à deux photons[44, 141, 142] ainsi que leur donner la capacité de cibler certains sites biologiques.[143] De plus, contrairement aux NPs de semi-conducteurs inorganiques, les dendrimères n'ont pas de dépendance de l'émission en fonction de leur taille.

Ainsi par la synthèse organique, des dendrimères de tailles différentes peuvent être obtenues tout en gardant la même fluorescence. À l'inverse, des dendrimères de tailles similaires avec des émissions différentes peuvent être obtenus (figure 10).

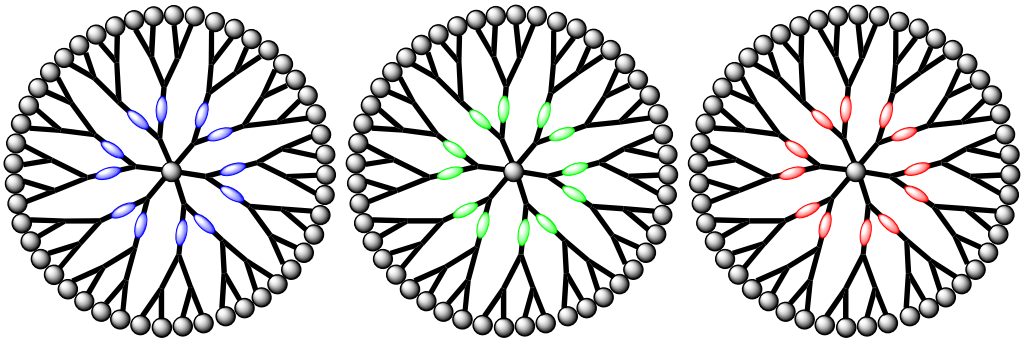


Figure 10. Représentation de dendrimères de tailles comparables avec différentes émissions de fluorescence (de gauche à droite : émetteur bleu, vert et rouge).

Des dendrimères de type PAMA (poly(amidoamine)) sont aussi employés comme nanocargo en vue d'applications thérapeutiques.[144]

La biocompatibilité,[145] les brillances exceptionnelles pouvant rivaliser avec les QDs,[141] ainsi que la possibilité de moduler leurs propriétés physiques et optiques font de ces nano-objets des outils hautement performants et prometteurs pour l'imagerie biologique.[44]

4.5 NPs à base de chromophores : FONs

Bien que très performants, les dendrimères sont des entités issues de la synthèse organique requérant un savoir-faire ainsi qu'un contrôle absolu de la structure chimique et faisant de ces objets des outils à haute valeur ajoutée.

Une alternative plus simple, rapide et originale est la préparation de nanoparticules organiques fluorescentes (FONs).[146] Alors que les dendrimères utilisent des liaisons covalentes pour structurer la plateforme, les FONs forment un ensemble de molécules fluorescentes confinées de façon non covalente. Ces nanoparticules sont généralement préparées par la méthode dite de reprécipitation,[147] qui consiste à faire précipiter un chromophore sous forme de nanoagrégats, en mélangeant une solution organique de celui-ci avec de l'eau.

De même que pour les NPs à base de polymères et les dendrimères, les propriétés des FONs sont modulables à l'infini. Il est par exemple possible de les doter d'aptitudes à la détection d'ions[148] ou de bien de cellules spécifiques.[149] Cependant du fait du confinement à l'intérieur des FONs, un phénomène d'extinction de la fluorescence peut apparaître. Ce phénomène appelé Aggregation-Caused Quenching (ACQ)[150, 151] provient de la présence d'interactions intermoléculaires fortes au sein des FONs, conduisant à une baisse de la

fluorescence par transfert d'énergie. Afin d'assurer l'obtention de nanoparticules fluorescentes, le contrôle des interactions moléculaires est nécessaire pour diminuer les effets de l'ACQ et passe donc par un design moléculaire adapté.[50, 146, 152, 153]

La possibilité d'intégrer des molécules ayant des propriétés d'optique non linéaire[154, 155] fait de ces NPs des outils innovants et originaux pour les différentes techniques d'imagerie biologique et médicale existantes.

5. Préparation des FONs

À la fin des années 1990, le groupe du Pr Nakanishi proposa l'utilisation d'une méthode appelée reprécipitation dans le but d'obtenir des nanocristaux de molécules π conjugués.[156] Cette méthode a rapidement trouvé écho parmi les chimistes souhaitant préparer des objets nanométriques à partir de molécules fragiles. En effet, l'obtention de NPs à partir de composés organiques ne peut se faire dans les mêmes conditions que la préparation de NPs inorganique (c.-à-d. voie hydrothermale) puisque la fragilité de ces molécules ne leur permet pas de conserver leur intégrité dans des conditions aussi dures.

Pour ces raisons, une technique de préparation des NPs à température ambiante et à pression atmosphérique est nécessaire, faisant de la méthode de reprécipitation un standard pour la préparation de FONs.

Cette technique nécessite l'emploi d'un solvant et d'un non-solvant. Du fait de son insolubilité dans l'eau, le chromophore ne précipite que lorsqu'il se retrouve dans la phase contenant le non-solvant.[146] Afin d'assurer une dispersion efficace et rapide du chromophore dans le non-solvant, le (bon) solvant utilisé est miscible à l'eau et l'addition se fait sous agitation (figure 11). Lors de la diffusion de la molécule dans le non-solvant, celle-ci va rapidement atteindre sa concentration de nucléation initiant ainsi la nucléation et la formation de nanoagrégats.[133]

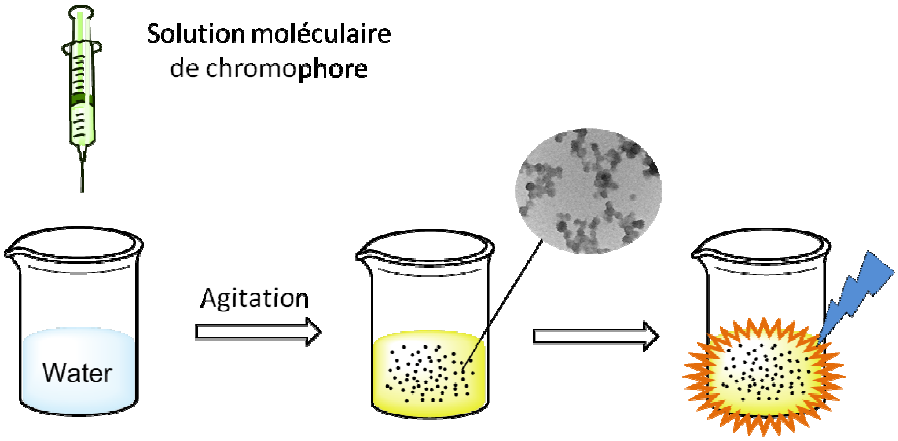


Figure 11. Représentation de la formation de nanoparticules par reprécipitation.

Dans le cas des FONs, le solvant le plus utilisé est le THF,[133, 152, 157] puisqu'il assure un bon compromis entre une toxicité relativement basse pour un solvant organique, un point d'ébullition suffisamment bas pour permettre son élimination dans la solution de FONs et un pouvoir de solvatation important. Pour une perspective d'utilisation des FONs en milieu biologique, le non-solvant peut être l'eau, ou bien une solution tampon compatible avec le milieu biologique (c.-à-d. PBS).[158]

6. Stabilité des FONs

6.1 Évolution de la stabilité des FONs

Contrairement aux NPs de polymères, le chromophore n'est pas protégé par un enrobage, mais il s'organise de lui-même afin de minimiser ses interactions avec l'eau. Ce confinement métastable est en partie assuré par l'hydrophobicité des molécules. Cette hydrophobicité est très importante puisqu'elle assure une partie de la stabilité de la nanoparticule, mais permet aussi l'insolubilité de la molécule dans l'eau (puisque dans ce cas de figure, l'on obtiendrait une solution moléculaire de chromophore).

Du fait de leur taille et de leur comportement dans la phase liquide, les FONs dans l'eau forment une suspension colloïdale de type Sol (phase solide dispersée dans une phase continue liquide) dont la stabilité dépend de la nature de la nanoparticule. Les FONs (tout comme les NPs de type polymères) évoluent de la même façon que les suspensions colloïdales classiques : dans la durée, elles peuvent se rassembler en amas de plusieurs dizaines à centaines d'individus tout en restant en suspension (la floculation). Les NPs dans

cet amas peuvent « fusionner » entre elles, c'est ce qu'on appelle la maturation d'Ostwald (figure 12).[159, 160]

Ce processus est souvent accéléré lorsqu'il y a une polydispersité importante de tailles de NPs ou bien une présence importante de solvant organique[161, 162] et tend à amener la solution colloïdale vers un système mono disperse de grande taille. Suite à cette maturation, les NPs voient leur volume et leur masse augmenter entraînant mécaniquement leur sédimentation. Cette sédimentation distingue l'évolution des NPs vis-à-vis des émulsions où la coalescence des particules entraîne une séparation de phase (figure 12).

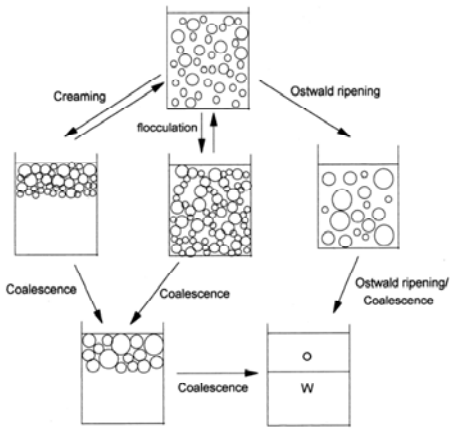


Figure 12. Processus de déstabilisation d'une émulsion.[160]

6.2 Stratégies d'amélioration de la stabilité colloïdale des FONs

Bien entendu tous ces processus d'évolution de la stabilité des NPs sont dépendants de la surface de la nanoparticule ainsi que du milieu. Des variations de pH importantes, une augmentation de la salinité de la solution ainsi que des variations de température affectent la stabilité colloïdale des NPs. C'est pourquoi les divers processus de déstabilisation de la phase sol peuvent intervenir à des échelles de temps différents, pouvant aller de la seconde à l'année.

Le ralentissement de ces processus peut être obtenu en diminuant les interactions entre les NPs, en utilisant par exemple des surfactants comme les polyvinyles (PVA, PVP).[133, 163] L'ajout de surfactant approprié, permet d'enrober les NPs de surfactant qui joue alors le rôle d'une coque stabilisante. Une fois la concentration micellaire critique du surfactant atteint, la présence de surfactant autour de la nanoparticule diminue fortement les interactions entre les nanoparticules, ce qui permet de mieux stabiliser les NPs et de ralentir la maturation. Cependant, les surfactants de par leurs propriétés intrinsèques peuvent endommager les

membranes cellulaires, ce qui n'est pas désirable lorsque l'on souhaite utiliser ces NPs en milieu biologique. Pour cette raison, l'utilisation de surfactant n'est pas une approche biocompatible convenable.

Une alternative à l'utilisation d'agent de surface est de travailler sur le potentiel Zêta (ζ). Pour simplifier, ce potentiel peut être assimilé à une charge de surface des NPs, et de ce fait, trois états sont possibles : un potentiel négatif, positif ou nul. Lorsqu'une particule possède un potentiel Zêta positif ou négatif, les répulsions coulombiennes dues à la présence de cette charge repoussent les NPs les unes des autres, diminuant ainsi les phénomènes d'agrégations et de maturations. L'exploitation d'un contrôle de la stabilité colloïdale des NPs en jouant sur le potentiel ζ est ambitieuse, mais permet une approche plus biocompatible que l'emploi de surfactants.[164]

6.3 Évolution de la stabilité chimique des FONs

Bien que le potentiel Zêta donne une bonne indication quant à la stabilité colloïdale des NPs, il ne donne aucune indication sur la stabilité chimique de celles-ci. Contrairement aux NPs inorganiques, les FONs sont constituées de molécules organiques photo-excitables les rendant potentiellement sensibles à divers processus chimiques (hydrolyse, oxydation, réduction, etc..).

L'un des avantages à travailler avec des NPs à base de colorants organiques est que leurs propriétés d'absorption et d'émission sont majoritairement régies par leur structure moléculaire. Puisque la dégradation du chromophore impacte fortement ses propriétés photophysiques, un suivi de la « santé » dans l'état fondamental et l'état excité des FONs peut être établi par des mesures d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence.

Il est à noter qu'une baisse de la stabilité colloïdale des FONs peut être observée par absorption UV-visible *via* l'apparition d'un signal de fond plus ou moins important dû à l'interaction entre la lumière et la taille de la nanoparticule. Ce phénomène est appelé diffusion de Mie pour des particules dont la taille est similaire à la longueur d'onde d'irradiation et diffusion Rayleigh pour des particules beaucoup plus petites. Ainsi plus les particules grossissent plus le signal de fond est élevé dans les faibles longueurs d'onde.

7. Luminescence des FONs

Le principal intérêt de l'utilisation des FONs en imagerie provient de leur capacité à émettre de la fluorescence, cette luminescence est assurée par la présence de nombreux chromophores dans la nanoparticule. Cependant, le confinement d'un grand nombre de chromophores dans un petit volume n'entraîne pas une augmentation systématique, de l'intensité de fluorescence proportionnellement au nombre de chromophores.

La proximité des molécules à l'intérieur de la nanoparticule induit généralement une baisse de la fluorescence (ACQ). Alors que la majorité des stratégies pour la préparation des nanoparticules organiques luminescentes (ONPs) vise à diminuer les interactions intermoléculaires (pour préserver la fluorescence).[152] Un type de nanoparticules utilise ces interactions, pour permettre à des molécules non fluorescentes (ou faiblement fluorescentes) de devenir fluorescentes. Cette stratégie exploite le phénomène dit d'émission induite par agrégation ou AIE (Agregation Induced Emission).[50, 163, 165-168]

Les molécules utilisées pour préparer ces NPs AIE sont constituées de groupements chimiques (c.-à-d. amine) pouvant tourner librement dans l'état excité. Lorsque la molécule est en solution et dans l'état excité, le groupement tourne entraînant l'apparition d'un nouveau terme dans la constante de désexcitation non radiative (k_{nr}). Cette rotation dans l'état excité a pour effet de diminuer le rendement quantique de luminescence du chromophore. Dans certains cas, les valeurs de k_{nr} sont tellement supérieures à la valeur de k_r que le chromophore n'est plus émissif en solution. À l'inverse, du fait de confinement dans les nanoparticules les groupements chimiques de ces molécules ne peuvent plus tourner dans l'état excité, diminuant ainsi la valeur du terme k_{nr} par rapport à celui de la molécule en solution, ce qui permet une augmentation significative de la fluorescence (figure 13).

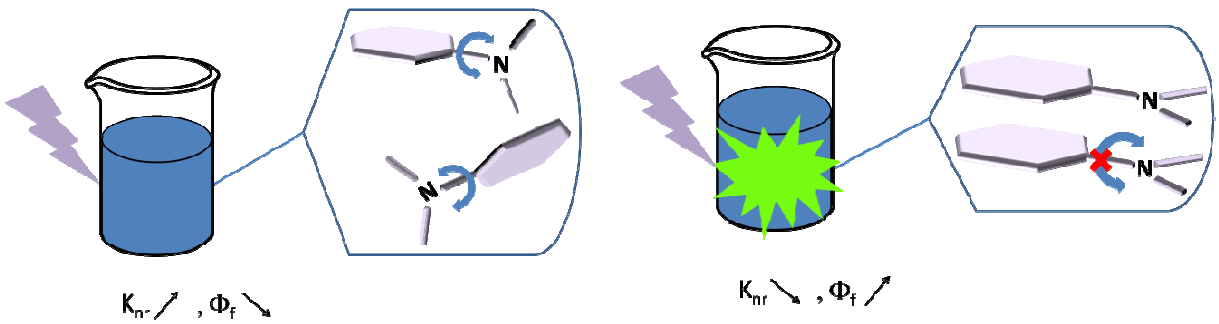


Figure 13. Représentation des interactions intermoléculaires d'une molécule générant de l'AIE en solution diluée (gauche) et à l'état de nanoagrégats (droite).

Actuellement du fait de sa simplicité de mise en œuvre, cette voie de préparation de FONs est la plus décrite dans la littérature. Il est intéressant de noter que beaucoup de NPs de type AIE préparées par la méthode de reprécipitation, utilisent un pourcentage de solvant organique de l'ordre de 10% dans l'eau. Cette forte concentration en solvant organique est certainement due à la mauvaise solubilité de ces chromophores issue d'un système π très étendu.[169] Le défaut d'une telle concentration en solvant organique, lors d'une utilisation en milieu biologique, est la toxicité intrinsèque du solvant qui à haute dose peut endommager les cellules présentes dans la zone où les NPs ont été déposées. De plus la présence de solvant organique dans la solution de nanoparticule est une cause de perte de la stabilité colloïdale des NPs, donc cette forte concentration peut affecter l'évolution des FONs.

Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que l'utilisation de chromophores dipolaires (n'exploitant pas l'AIE) permet d'obtenir des nanoparticules luminescentes excitables à un et deux photons.[152] Ces FONs primitives ont permis de démontrer la faisabilité de l'utilisation de chromophores multipolaires pour la préparation de nanoparticules luminescentes.

S'appuyant sur ces bases, ce manuscrit décrit la synthèse de nouveaux fluorophores spécifiquement conçus pour le confinement à l'état de nanoagrégats, ainsi que la préparation et l'étude des FONs issues de ces chromophores.

Afin de mieux comprendre les paramètres régissant le comportement des FONs, des molécules dipolaires parentes des travaux précédents sont étudiées en solution et sous forme de nanoparticules.

Enfin une application concrète de l'intérêt de ces objets innovants que sont les FONs pour l'imagerie est présentée en fin de manuscrit.

Références bibliographiques

[1] McPhie, P., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. Joseph R. Lakowicz. *Anal. Biochem.* **2000,** *287*, 353-354.

[2] Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W., Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003,** *21*, 1369-1377.

[3] Xu, C.; Zipfel, W.; Shear, J. B.; Williams, R. M.; Webb, W. W., Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996,** *93*, 10763-10768.

[4] Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Christie, R.; Nikitin, A. Y.; Hyman, B. T.; Webb, W. W., Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003,** *100*, 7075-7080.

[5] Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W., Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science* **2003,** *300*, 1434-1436.

[6] Gaus, K.; Gratton, E.; Kable, E. P. W.; Jones, A. S.; Gelissen, I.; Kritharides, L.; Jessup, W., Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003,** *100*, 15554-15559.

[7] Kim, H. M.; Jeong, B. H.; Hyon, J.-Y.; An, M. J.; Seo, M. S.; Hong, J. H.; Lee, K. J.; Kim, C. H.; Joo, T.; Hong, S.-C.; Cho, B. R., Two-Photon Fluorescent Turn-On Probe for Lipid Rafts in Live Cell and Tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **2008,** *130*, 4246-4247.

[8] Gothenburg, U. o. http://cf.gu.se/english/Centre_for_Cellular_Imaging/equipment/microscopes.

[9] Hell, S. W.; Wichmann, J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **1994,** *19*, 780-782.

[10] Steven, L. J., Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology* **2013,** *58*, R37.

[11] Rönnlund, D.; Xu, L.; Perols, A.; Gad, A. K. B.; Eriksson Karlström, A.; Auer, G.; Widengren, J., Multicolor Fluorescence Nanoscopy by Photobleaching: Concept, Verification, and Its Application To Resolve Selective Storage of Proteins in Platelets. *ACS Nano* **2014,** *8*, 4358-4365.

[12] Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T., Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Meth* **2008,** *5*, 763-775.

[13] Moneron, G.; Hell, S. W., Two-photon excitation STED microscopy. *Optics Express* **2009,** *17*, 14567-14573.

[14] Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X., Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Meth* **2006,** *3*, 793-796.

[15] Sengupta, P.; van Engelenburg, S. B.; Lippincott-Schwartz, J., Superresolution Imaging of Biological Systems Using Photoactivated Localization Microscopy. *Chemical Reviews* **2014,** *114*, 3189-3202.

[16] Escobedo, J. O.; Rusin, O.; Lim, S.; Strongin, R. M., NIR dyes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010,** *14*, 64-70.

[17] *The Molecular Probes Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11th ed.; Life Technologies Corporation2010; p pp 1060.

[18] Fluorescent Labels and Dyes. ATTO-TEC, Ed. ATTO-TEC2009.

[19] Weisz, O. A., Organelle Acidification and Disease. *Traffic* **2003,** *4*, 57-64.

[20] Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **2012,** *24*, 981-990.

[21] D'Autreaux, B.; Toledano, M. B., ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007,** *8*, 813-824.

[22] Dixon, S. J.; Stockwell, B. R., The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* **2014,** *10*, 9-17.

[23] Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O., Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2012,** *1822*, 1363-1373.

[24] del Río, L. A., ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany* **2015,** *66*, 2827-2837.

[25] Hoebe, R. A.; Van Oven, C. H.; Gadella, T. W. J.; Dhonukshe, P. B.; Van Noorden, C. J. F.; Manders, E. M. M., Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nat Biotech* **2007,** *25*, 249-253.

[26] Jacobson, K.; Elson, E.; Koppel, D.; Webb, W., Fluorescence photobleaching in cell biology. *Nature* **1982,** *295*, 283-284.

[27] Kim, H. M.; Cho, B. R., Two-Photon Probes for Intracellular Free Metal Ions, Acidic Vesicles, And Lipid Rafts in Live Tissues. *Acc. Chem. Res.* **2009,** *42*, 863-872.

[28] Park, H. J.; Lim, C. S.; Kim, E. S.; Han, J. H.; Lee, T. H.; Chun, H. J.; Cho, B. R., Measurement of pH Values in Human Tissues by Two-Photon Microscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012,** *51*, 2673-2676, S2673/1-S2673/13.

[29] Kim, H. M.; Cho, B. R., Small-Molecule Two-Photon Probes for Bioimaging Applications. *Chemical Reviews* **2015,** *115*, 5014-5055.

[30] Charier, S.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Alcor, D.; Allemand, J.-F.; Meglio, A.; Jullien, L., An Efficient Fluorescent Probe for Ratiometric pH Measurements in Aqueous Solutions. *Angewandte Chemie International Edition* **2004,** *43*, 4785-4788.

[31] Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B., Nanoparticles for bioimaging. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006,** *123-126*, 471-485.

[32] Sapsford, K. E.; Pons, T.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H., Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. *Sensors* **2006,** *6*, 925-953.

[33] Li, K.; Jiang, Y.; Ding, D.; Zhang, X.; Liu, Y.; Hua, J.; Feng, S.-S.; Liu, B., Folic acid-functionalized two-photon absorbing nanoparticles for targeted MCF-7 cancer cell imaging. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011,** *47*, 7323-7325.

[34] Li, K.; Liu, B., Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2014,** *43*, 6570-6597.

[35] Burns, A.; Ow, H.; Wiesner, U., Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2006,** *35*, 1028-1042.

[36] Tang, F.; Wang, C.; Wang, J.; Wang, X.; Li, L., Fluorescent Organic Nanoparticles with Enhanced Fluorescence by Self-Aggregation and their Application to Cellular Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014,** *6*, 18337-18343.

[37] Xu, Z.; Liao, Q.; Wu, Y.; Ren, W.; Li, W.; Liu, L.; Wang, S.; Gu, Z.; Zhang, H.; Fu, H., Water-miscible organic J-aggregate nanoparticles as efficient two-photon fluorescent nano-probes for bio-imaging. *J. Mater. Chem.* **2012,** *22*, 17737-17743.

[38] Hatai, J.; Pal, S.; Bandyopadhyay, S., Fluorescent detection of silver ions in water with organic nano-aggregates. *RSC Adv.* **2012,** *2*, 10941-10947.

[39] Nicolas, J.; Brambilla, D.; Carion, O.; Pons, T.; Maksimovic, I.; Larquet, E.; Le Droumaguet, B.; Andrieux, K.; Dubertret, B.; Couvreur, P., Quantum dot-loaded PEGylated poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for in vitro and in vivo imaging. *Soft Matter* **2011,** *7*, 6187-6193.

[40] Nayak, S.; Lyon, L. A., Soft nanotechnology with soft nanoparticles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005,** *44*, 7686-7708.

[41] Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2005,** *307*, 538-544.

[42] Bonacina, L., Nonlinear Nanomedecine: Harmonic Nanoparticles toward Targeted Diagnosis and Therapy. *Mol. Pharmaceutics* **2013,** *10*, 783-792.

[43] Baker, M., Nanotechnology imaging probes: smaller and more stable. *Nat. Methods* **2010,** *7*, 957-962.

[44] Krishna, T. R.; Parent, M.; Werts, M. H. V.; Moreaux, L.; Gmouh, S.; Charpak, S.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., Water-soluble dendrimeric two-photon tracers for in vivo imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006,** *45*, 4645-4648.

[45] Duffus, J. H.; Nordberg, M.; Templeton, D. M., Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition. (IUPAC recommendations 2007). *Pure Appl. Chem.* **2007,** *79*, 1153-1344.

[46] Regulacio, M. D.; Han, M.-Y., Composition-Tunable Alloyed Semiconductor Nanocrystals. *Accounts of Chemical Research* **2010,** *43*, 621-630.

[47] Ray, P. C., Size and shape dependent second order nonlinear optical properties of nanomaterials and their application in biological and chemical sensing. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2010,** *110*, 5332-5365.

[48] Alivisatos, A. P., Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science (Washington, D. C.)* **1996,** *271*, 933-7.

[49] Baugh, J.; Kleinhammes, A.; Han, D.; Wang, Q.; Wu, Y., Confinement Effect on Dipole-Dipole Interactions in Nanofluids. *Science* **2001,** *294*, 1505-1507.

[50] Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z., Aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* **2011,** *40*, 5361-5388.

[51] Moores, A.; Goettmann, F., The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New J. Chem.* **2006,** *30*, 1121-1132.

[52] Scholl, J. A.; Koh, A. L.; Dionne, J. A., Quantum plasmon resonances of individual metallic nanoparticles. *Nature* **2012,** *483*, 421-427.

[53] Kochuveedu, S. T.; Jang, Y. H.; Kim, D. H., A study on the mechanism for the interaction of light with noble metal-metal oxide semiconductor nanostructures for various photophysical applications. *Chemical Society Reviews* **2013,** *42*, 8467-8493.

[54] Jain, P. K.; El-Sayed, M. A., Plasmonic coupling in noble metal nanostructures. *Chemical Physics Letters* **2010,** *487*, 153-164.

[55] Landes, C.; Burda, C.; Braun, M.; El-Sayed, M. A., Photoluminescence of CdSe Nanoparticles in the Presence of a Hole Acceptor: n-Butylamine. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001,** *105*, 2981-2986.

[56] Kasai, H.; Kamatani, H.; Yoshikawa, Y.; Okada, S.; Oikawa, H.; Watanabe, A.; Itoh, O.; Nakanishi, H., Crystal size dependence of emission from perylene microcrystals. *Chem. Lett.* **1997**, 1181-1182.

[57] Spano, F. C., The Spectral Signatures of Frenkel Polarons in H- and J-Aggregates. *Acc. Chem. Res.* **2010,** *43*, 429-439.

[58] Mussa, F. S.; Valizadeh, A., Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET Nanobiotechnol* **2014,** *8*, 59-76.

[59] Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K. F.; Bawendi, M. G., (CdSe)ZnS Core−Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997,** *101*, 9463-9475.

[60] Pu, S.-C.; Yang, M.-J.; Hsu, C.-C.; Lai, C.-W.; Hsieh, C.-C.; Lin, S. H.; Cheng, Y.-M.; Chou, P.-T., The empirical correlation between size and two-photon absorption cross section of CdSe and CdTe quantum dots. *Small* **2006,** *2*, 1308-1313.

[61] Demchenko, A. P., *Introduction to Fluorescence Sensing*. Springer Netherlands2009; p 165.

[62] Kim, J. I.; Lee, J. K., Sub-kilogram-Scale One-Pot Synthesis of Highly Luminescent and Monodisperse Core/Shell Quantum Dots by the Successive Injection of Precursors. *Advanced Functional Materials* **2006,** *16*, 2077-2082.

[63] Wolfbeis, O. S., An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015,** *44*, 4743-4768.

[64] Zrazhevskiy, P.; Sena, M.; Gao, X., Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chemical Society Reviews* **2010,** *39*, 4326-4354.

[65] Wiederschain, G. Y., *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. MAIK Nauka/Interperiodica2011; Vol. 76, p 1276.

[66] Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R., Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **2008,** *4*, 26-49.

[67] Tsoi, K. M.; Dai, Q.; Alman, B. A.; Chan, W. C. W., Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. *Accounts of Chemical Research* **2013,** *46*, 662-671.

[68] Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Javier, A. M.; Gaub, H. E.; Stoelzle, S.; Fertig, N.; Parak, W. J., Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles. *Nano Lett.* **2005,** *5*, 331-338.

[69] Soenen, S. J.; Parak, W. J.; Rejman, J.; Manshian, B., (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chemical Reviews* **2015,** *115*, 2109-2135.

[70] Nagy, A.; Steinbruck, A.; Gao, J.; Doggett, N.; Hollingsworth, J. A.; Iyer, R., Comprehensive Analysis of the Effects of CdSe Quantum Dot Size, Surface Charge, and Functionalization on Primary Human Lung Cells. *ACS Nano* **2012,** *6*, 4748-4762.

[71] Fischer, H. C.; Liu, L.; Pang, K. S.; Chan, W. C. W., Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots: In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Advanced Functional Materials* **2006,** *16*, 1299-1305.

[72] Galeone, A.; Vecchio, G.; Malvindi, M. A.; Brunetti, V.; Cingolani, R.; Pompa, P. P., In vivo assessment of CdSe-ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale* **2012,** *4*, 6401-6407.

[73] Zhang, W.; Miao, Y.; Lin, K.; Chen, L.; Dong, Q.; Huang, C., Toxic effects of copper ion in zebrafish in the joint presence of CdTe QDs. *Environmental Pollution* **2013,** *176*, 158-164.

[74] Sakai, T.; Alexandridis, P., Single-Step Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Pluronic Block Copolymer Solutions at Ambient Temperature. *Langmuir* **2004,** *20*, 8426-8430.

[75] Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Advanced Materials* **2001,** *13*, 1389-1393.

[76] Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009,** *145*, 83-96.

[77] Ahmad, A.; Senapati, S.; Khan, M. I.; Kumar, R.; Ramani, R.; Srinivas, V.; Sastry, M., Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, Rhodococcus species. *Nanotechnology* **2003,** *14*, 824-828.

[78] Song, J.; Kim, B., Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng* **2009,** *32*, 79-84.

[79] Song, J. Y.; Jang, H.-K.; Kim, B. S., Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kobus and Diopyros kaki leaf extracts. *Process Biochemistry* **2009,** *44*, 1133-1138.

[80] Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; Parishcha, R.; Ajaykumar, P. V.; Alam, M.; Kumar, R.; Sastry, M., Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters* **2001,** *1*, 515-519.

[81] Sondi, I.; Salopek-Sondi, B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004,** *275*, 177-182.

[82] *Controlling the Quantum World: The Science of Atoms, Molecules, and Photons*. The National Academies Press: Washington, DC, 2007; p 244.

[83] Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W., Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007,** *3*, 1941-1949.

[84] Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968,** *26*, 62-69.

[85] Green, D. L.; Lin, J. S.; Lam, Y.-F.; Hu, M. Z. C.; Schaefer, D. W.; Harris, M. T., Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003,** *266*, 346-358.

[86] Rahman, I. A.; Padavettan, V., Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *Journal of Nanomaterials* **2012,** *2012*, 15.

[87] Mader, H.; Li, X.; Saleh, S.; Link, M.; Kele, P.; Wolfbeis, O. S., Fluorescent Silica Nanoparticles. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008,** *1130*, 218-223.

[88] Zong, C.; Ai, K.; Zhang, G.; Li, H.; Lu, L., Dual-Emission Fluorescent Silica Nanoparticle-Based Probe for Ultrasensitive Detection of Cu2+. *Analytical Chemistry* **2011,** *83*, 3126-3132.

[89] Auger, A.; Samuel, J.; Poncelet, O.; Raccurt, O., A comparative study of non-covalent encapsulation methods for organic dyes into silica nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2011,** *6*, 328, 12 pp.

[90] Burns, A. A.; Vider, J.; Ow, H.; Herz, E.; Penate-Medina, O.; Baumgart, M.; Larson, S. M.; Wiesner, U.; Bradbury, M., Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine. *Nano Letters* **2009,** *9*, 442-448.

[91] Ow, H.; Larson, D. R.; Srivastava, M.; Baird, B. A.; Webb, W. W.; Wiesner, U., Bright and Stable Core−Shell Fluorescent Silica Nanoparticles. *Nano Letters* **2005,** *5*, 113-117.

[92] Sokolov, I.; Naik, S., Novel fluorescent silica nanoparticles: towards ultra-bright silica nanoparticles. *Small* **2008,** *4*, 934-939.

[93] Lebret, V.; Raehm, L.; Durand, J.-O.; Smaihi, M.; Gerardin, C.; Nerambourg, N.; Werts, M. H. V.; Blanchard-Desce, M., Synthesis and Characterization of Fluorescently Doped Mesoporous Nanoparticles for Two-Photon Excitation. *Chem. Mater.* **2008,** *20*, 2174-2183.

[94] Yu, T.; Malugin, A.; Ghandehari, H., Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. *ACS Nano* **2011,** *5*, 5717-5728.

[95] Vaillant, O.; Cheikh, K. E.; Warther, D.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Bouffard, E.; Salgues, F.; Jeanjean, A.; Puche, P.; Mazerolles, C.; Maillard, P.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Raehm, L.; Rébillard, X.; Durand, J.-O.; Gary-Bobo, M.; Morère, A.; Garcia, M., Mannose-6-Phosphate Receptor: A Target for Theranostics of Prostate Cancer. *Angewandte Chemie International Edition* **2015,** *54*, 5952-5956.

[96] Korzeniowska, B.; Nooney, R.; Wencel, D.; McDonagh, C., Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing. *Nanotechnology* **2013,** *24*, 442002.

[97] Docter, D.; Bantz, C.; Westmeier, D.; Galla, H. J.; Wang, Q.; Kirkpatrick, J. C.; Nielsen, P.; Maskos, M.; Stauber, R. H., The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2014,** *5*, 1380-1392.

[98] Gonzalez, L.; De Santis Puzzonia, M.; Ricci, R.; Aureli, F.; Guarguaglini, G.; Cubadda, F.; Leyns, L.; Cundari, E.; Kirsch-Volders, M., Amorphous silica nanoparticles alter microtubule dynamics and cell migration. *Nanotoxicology* **2015,** *9*, 729-736.

[99] Park, H. J.; Sohn, J.-H.; Kim, Y.-J.; Park, Y. H.; Han, H.; Park, K. H.; Lee, K.; Choi, H.; Um, K.; Choi, I.-H.; Park, J.-W.; Lee, J.-H., Acute exposure to silica nanoparticles aggravate airway inflammation: different effects according to surface characteristics. *Exp Mol Med* **2015,** *47*, e173.

[100] Correia Carreira, S.; Walker, L.; Paul, K.; Saunders, M., The toxicity, transport and uptake of nanoparticles in the in vitro BeWo b30 placental cell barrier model used within NanoTEST. *Nanotoxicology* **2015,** *9*, 66-78.

[101] Huang, X.; Li, L.; Liu, T.; Hao, N.; Liu, H.; Chen, D.; Tang, F., The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility in Vivo. *ACS Nano* **2011,** *5*, 5390-5399.

[102] Fadeel, B.; Garcia-Bennett, A. E., Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010,** *62*, 362-374.

[103] Lin, Y.-S.; Haynes, C. L., Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2010,** *132*, 4834-4842.

[104] Chang, H.; Xie, J.; Zhao, B.; Liu, B.; Xu, S.; Ren, N.; Xie, X.; Huang, L.; Huang, W., Rare earth ion-doped upconversion nanocrystals: synthesis and surface modification. *Nanomaterials* **2015,** *5*, 1-25, 25 pp.

[105] Maestro, L. M.; Rodriguez, E. M.; Vetrone, F.; Naccache, R.; Ramirez, H. L.; Jaque, D.; Capobianco, J. A.; Solé, J. G., Nanoparticles for highly efficient multiphoton fluorescence bioimaging. *Optics Express* **2010,** *18*, 23544-23553.

[106] Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D., Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure. *Chemical Society Reviews* **2015,** *44*, 1346-1378.

[107] Park, Y. I.; Kim, J. H.; Lee, K. T.; Jeon, K.-S.; Na, H. B.; Yu, J. H.; Kim, H. M.; Lee, N.; Choi, S. H.; Baik, S.-I.; Kim, H.; Park, S. P.; Park, B.-J.; Kim, Y. W.; Lee, S. H.; Yoon, S.-Y.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Suh, Y. D.; Hyeon, T., Nonblinking and Nonbleaching Upconverting Nanoparticles as an Optical Imaging Nanoprobe and T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Advanced Materials* **2009,** *21*, 4467-4471.

[108] Xu, C. T.; Zhan, Q.; Liu, H.; Somesfalean, G.; Qian, J.; He, S.; Andersson-Engels, S., Upconverting nanoparticles for pre-clinical diffuse optical imaging, microscopy and sensing: Current trends and future challenges. *Laser Photonics Rev.* **2013,** *7*, 663-697.

[109] Howard, J. B.; McKinnon, J. T.; Makarovsky, Y.; Lafleur, A. L.; Johnson, M. E., Fullerenes C60 and C70 in flames. *Nature* **1991,** *352*, 139-141.

[110] Patel, A.; Prajapati, P.; Chaudhari, K.; Boghra, R.; Jadhav, A., Carbon nanotubes production, characterisation and its applications. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2011,** *9*, 74-80.

[111] Alai, M. H.; Poptani, S. P.; Patil, G. V., Carbon nanotubes: an approach to novel drug delivery system. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012,** *3*, 329-339.

[112] Lin, Y.; Taylor, S.; Li, H.; Fernando, K. A. S.; Qu, L.; Wang, W.; Gu, L.; Zhou, B.; Sun, Y.-P., Advances toward bioapplications of carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry* **2004,** *14*, 527-541.

[113] Tan, J. M.; Arulselvan, P.; Fakurazi, S.; Ithnin, H.; Hussein, M. Z., A Review on Characterizations and Biocompatibility of Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Delivery Design. *Journal of Nanomaterials* **2014,** *2014*, 20.

[114] Weisman, R. B.; Bachilo, S. M.; Tsyboulski, D., Fluorescence spectroscopy of single-walled carbon nanotubes in aqueous suspension. *Appl Phys A* **2004,** *78*, 1111-1116.

[115] Kam, N. W. S.; Dai, H., Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127*, 6021-6026.

[116] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005,** *9*, 674-679.

[117] Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Laird Forrest, M.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M., Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **2012,** *41*, 2323-2343.

[118] Smart, S. K.; Cassady, A. I.; Lu, G. Q.; Martin, D. J., The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* **2006,** *44*, 1034-1047.

[119] Holt, K. B., *Diamond at the nanoscale: applications of diamond nanoparticles from cellular biomarkers to quantum computing*. 2007; Vol. 365, p 2845-2861.

[120] Mohan, N.; Chen, C.-S.; Hsieh, H.-H.; Wu, Y.-C.; Chang, H.-C., In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in Caenorhabditis elegans. *Nano Letters* **2010,** *10*, 3692-3699.

[121] Zhang, X.; Yin, J.; Kang, C.; Li, J.; Zhu, Y.; Li, W.; Huang, Q.; Zhu, Z., Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation. *Toxicology Letters* **2010,** *198*, 237-243.

[122] Pu, K.; Shuhendler, A. J.; Rao, J., Semiconducting Polymer Nanoprobe for In Vivo Imaging of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Angewandte Chemie International Edition* **2013,** *52*, 10325-10329.

[123] Fischer, I.; Kaeser, A.; Peters-Gumbs, M. A. M.; Schenning, A. P. H. J., Fluorescent π-Conjugated Polymer Dots versus Self-Assembled Small-Molecule Nanoparticles: What's the Difference? *Chemistry – A European Journal* **2013,** *19*, 10928-10934.

[124] Feng, G.; Li, K.; Liu, J.; Ding, D.; Liu, B., Bright Single-Chain Conjugated Polymer Dots Embedded Nanoparticles for Long-Term Cell Tracing and Imaging. *Small* **2014,** *10*, 1212-1219.

[125] Kaeser, A.; Schenning, A. P. H. J., Fluorescent nanoparticles based on self-assembled pi-conjugated systems. *Adv Mater* **2010,** *22*, 2985-97.

[126] Lee, S. J.; Lee, J. M.; Cho, H.-Z.; Koh, W. G.; Cheong, I. W.; Kim, J. H., Poly(thiophene) nanoparticles prepared by Fe3+-catalyzed oxidative polymerization: size-dependent effect on photoluminescence property. *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2010,** *43*, 2484-2489.

[127] Gierschner, J.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D., Absorption, fluorescence and light scattering of oligothiophene and oligophenylenevinylene nanoaggregates. *Synthetic Metals* **1997,** *84*, 529-530.

[128] Lee, S. M.; Lee, S. J.; Kim, J. H.; Cheong, I. W., Synthesis of polystyrene/polythiophene core/shell nanoparticles by dual initiation. *Polymer* **2011,** *52*, 4227-4234.

[129] Oelkrug, D.; Tompert, A.; Gierschner, J.; Egelhaaf, H.-J.; Hanack, M.; Hohloch, M.; Steinhuber, E., Tuning of Fluorescence in Films and Nanoparticles of Oligophenylenevinylenes. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998,** *102*, 1902-1907.

[130] Maggini, L.; Bonifazi, D., Hierarchised luminescent organic architectures: design, synthesis, self-assembly, self-organisation and functions. *Chem. Soc. Rev.* **2012,** *41*, 211-241.

[131] Liu, J.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z., Aggregation-induced Emission of Silole Molecules and Polymers: Fundamental and Applications. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2009,** *19*, 249-285.

[132] Uthirakumar, P.; Hong, C.-H.; Suh, E.-K.; Lee, Y.-S., Preparation and photophysical properties of organic fluorescent polymers and their nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006,** *102*, 5344-5350.

[133] Horn, D.; Rieger, J., Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. *Angewandte Chemie International Edition* **2001,** *40*, 4330-4361.

[134] Hayama, A.; Yamamoto, T.; Yokoyama, M.; Kawano, K.; Hattori, Y.; Maitani, Y., Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008,** *8*, 3085-3090.

[135] Xu, P.; Gullotti, E.; Tong, L.; Highley, C. B.; Errabelli, D. R.; Hasan, T.; Cheng, J.-X.; Kohane, D. S.; Yeo, Y., Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles, Revisited. *Mol. Pharmaceutics* **2009,** *6*, 190-201.

[136] Panyam, J.; Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003,** *55*, 329-347.

[137] Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J. M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V., PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* **2012,** *161*, 505-522.

[138] Trofymchuk, K.; Reisch, A.; Shulov, I.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale* **2014,** *6*, 12934-12942.

[139] Reisch, A.; Runser, A.; Arntz, Y.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles. *ACS Nano* **2015,** *9*, 5104-5116.

[140] Liu, K.; Xu, Z.; Yin, M., Perylenediimide-cored dendrimers and their bioimaging and gene delivery applications. *Progress in Polymer Science* **2015,** *46*, 25-54.

[141] Mongin, O.; Krishna, T. R.; Werts, M. H. V.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., A modular approach to two-photon absorbing organic nanodots: brilliant dendrimers as an alternative to semiconductor quantum dots? *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2006**, 915-917.

[142] Jeong, H. C.; Piao, M. J.; Lee, S. H.; Jeong, M.-Y.; Kang, K. M.; Park, G.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Octupolar dendrimers with large first hyperpolarizability. *Adv. Funct. Mater.* **2004,** *14*, 64-70.

[143] Quintana, A.; Raczka, E.; Piehler, L.; Lee, I.; Myc, A.; Majoros, I.; Patri, A.; Thomas, T.; Mulé, J.; Baker, J., Jr., Design and Function of a Dendrimer-Based Therapeutic Nanodevice Targeted to Tumor Cells Through the Folate Receptor. *Pharm Res* **2002,** *19*, 1310-1316.

[144] Morgan, M. T.; Nakanishi, Y.; Kroll, D. J.; Griset, A. P.; Carnahan, M. A.; Wathier, M.; Oberlies, N. H.; Manikumar, G.; Wani, M. C.; Grinstaff, M. W., Dendrimer-Encapsulated Camptothecins: Increased Solubility, Cellular Uptake, and Cellular Retention Affords Enhanced Anticancer Activity In vitro. *Cancer Research* **2006,** *66*, 11913-11921.

[145] Restani, R. B.; Morgado, P. I.; Ribeiro, M. P.; Correia, I. J.; Aguiar-Ricardo, A.; Bonifácio, V. D. B., Biocompatible Polyurea Dendrimers with pH-Dependent Fluorescence. *Angewandte Chemie International Edition* **2012,** *51*, 5162-5165.

[146] Fery-Forgues, S., Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications. *Nanoscale* **2013,** *5*, 8428-8442.

[147] Masuhara, H.; Nakanishi, H.; Sasaki, K., *Single Organic Nanoparticles*. Springer-Verlag2003; p pp 402.

[148] Han, C.; Huang, T.; Liu, Q.; Xu, H.; Zhuang, Y.; Li, J.; Hu, J.; Wang, A.; Xu, K., Design and synthesis of a highly sensitive "Turn-On" fluorescent organic nanoprobe for iron(III) detection and imaging. *J. Mater. Chem. C* **2014,** *2*, 9077-9082.

[149] Li, K.; Yamamoto, M.; Chan, S. J.; Chiam, M. Y.; Qin, W.; Wong, P. T. H.; Yim, E. K. F.; Tang, B. Z.; Liu, B., Organic nanoparticles with aggregation-induced emission for tracking bone marrow stromal cells in the rat ischemic stroke model. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2014**, Ahead of Print.

[150] Ding, D.; Li, K.; Liu, B.; Tang, B. Z., Bioprobes Based on AIE Fluorogens. *Acc. Chem. Res.* **2013,** *46*, 2441-2453.

[151] Li, Y.; Zhou, H.; Chen, J.; Anjum Shahzad, S.; Yu, C., Controlled self-assembly of small molecule probes and the related applications in bioanalysis. *Biosensors and Bioelectronics*.

[152] Parthasarathy, V.; Fery-Forgues, S.; Campioli, E.; Recher, G.; Terenziani, F.; Blanchard-Desce, M., Dipolar versus Octupolar Triphenylamine-Based Fluorescent Organic Nanoparticles as Brilliant One- and Two-Photon Emitters for (Bio)imaging. *Small* **2011,** *7*, 3219-3229.

[153] Li, Y.; Wu, Y.; Chang, J.; Chen, M.; Liu, R.; Li, F., A bioprobe based on aggregation induced emission (AIE) for cell membrane tracking. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2013,** *49*, 11335-11337.

[154] He, T.; Lim, Z. B.; Ma, L.; Li, H.; Rajwar, D.; Ying, Y.; Di, Z.; Grimsdale, A. C.; Sun, H., Large two-photon absorption of terpyridine-based quadrupolar derivatives: towards their applications in optical limiting and biological imaging. *Chem Asian J* **2013,** *8*, 564-71.

[155] Xu, Z.; Liao, Q.; Shi, X.; Li, H.; Zhang, H.; Fu, H., Full-color tunable organic nanoparticles with FRET-assisted enhanced two-photon excited fluorescence for bio-imaging. *J. Mater. Chem. B* **2013,** *1*, 6035-6041.

[156] Masuhara, H.; Nakanishi, H.; Sasaki, K.; Editors, *Single Organic Nanoparticles*. Springer-Verlag2003; p 402 pp.

[157] Li, K.; Qin, W.; Ding, D.; Tomczak, N.; Geng, J.; Liu, R.; Liu, J.; Zhang, X.; Liu, H.; Liu, B.; Tang, B. Z., Photostable fluorescent organic dots with aggregation-induced emission (AIE dots) for noninvasive long-term cell tracing. *Sci. Rep.* **2013,** *3*, 1150, 10 pp.

[158] Fischer, I.; Petkau-Milroy, K.; Dorland, Y. L.; Schenning, A. P. H. J.; Brunsveld, L., Self-Assembled Fluorescent Organic Nanoparticles for Live-Cell Imaging. *Chem. - Eur. J.* **2013,** *19*, 16646-16650.

[159] Kabalnov, A. S.; Shchukin, E. D., Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science* **1992,** *38*, 69-97.

[160] Taylor, P., Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998,** *75*, 107-163.

[161] Liu, Y.; Kathan, K.; Saad, W.; Prud'homme, R. K., Ostwald Ripening of β-Carotene Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2007,** *98*, 036102/1-036102/4.

[162] Kumar, V.; Prud'homme, R. K., Nanoparticle stability: Processing pathways for solvent removal. *Chemical Engineering Science* **2009,** *64*, 1358-1361.

[163] Yao, H.; Ashiba, K., Highly fluorescent organic nanoparticles of thiacyanine dye: a synergetic effect of intermolecular H-aggregation and restricted intramolecular rotation. *RSC Adv.* **2011,** *1*, 834-838.

[164] Doane, T. L.; Chuang, C.-H.; Hill, R. J.; Burda, C., Nanoparticle ζ-Potentials. *Acc. Chem. Res.* **2012,** *45*, 317-326.

[165] Patra, A.; Chandaluri, C. G.; Radhakrishnan, T. P., Optical materials based on molecular nanoparticles. *Nanoscale* **2012,** *4*, 343-359.

[166] Sun, Y.-Y.; Liao, J.-H.; Fang, J.-M.; Chou, P.-T.; Shen, C.-H.; Hsu, C.-W.; Chen, L.-C., Fluorescent organic nanoparticles of benzofuran-naphthyridine linked molecules: formation and fluorescence enhancement in aqueous media. *Org Lett* **2006,** *8*, 3713-6.

[167] Patra, A.; Anthony, S. P.; Radhakrishnan, T. P., Tris(4-cyanophenyl)amine: simple synthesis via self-assembly; strong fluorescence in solution, nano/microcrystals, and solid. *Adv. Funct. Mater.* **2007,** *17*, 2077-2084.

[168] Zhao, Q.; Li, K.; Chen, S.; Qin, A.; Ding, D.; Zhang, S.; Liu, Y.; Liu, B.; Sun, J. Z.; Tang, B. Z., Aggregation-induced red-NIR emission organic nanoparticles as effective and photostable fluorescent probes for bioimaging. *J. Mater. Chem.* **2012,** *22*, 15128-15135.

[169] Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z., Aggregation-induced emission: phenomenon, mechanism and applications. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 4332-4353.

Chapitre I – Rappels sur la fluorescence

Chapitre I – Rappels sur la fluorescence

Ce manuscrit traite presque exclusivement de molécules ayant la capacité à émettre de la fluorescence. Dans un souci de clarté et de compréhension du manuscrit, des rappels sur les processus simples liés à la fluorescence en général sont introduits dans ce chapitre.[1]

1. Principe de fluorescence

Avant de parler de fluorescence, il est important de comprendre ce qu'est la fluorescence, et quels sont les paramètres qui influent sur les processus liés à la fluorescence.

1.1 Définition de la fluorescence

Selon l'IUPAC, la fluorescence est définie comme étant l'un des modes de luminescence apparaissant immédiatement après l'irradiation d'une substance par une radiation électromagnétique. Lors du processus d'émission de luminescence, l'origine du photon n'est pas la même selon le type de luminescence. Ainsi, si les photons sont émis depuis un état singulet (Sn), on parle de fluorescence, s'ils sont émis depuis un état triplet (Tn), on parle de phosphorescence.

1.2 Absorption de la lumière : irradiation des chromophores

Lorsqu'une molécule est irradiée, si la longueur d'onde de l'irradiation est compatible énergétiquement avec une des transitions électroniques de la molécule, alors le rayonnement est absorbé plus ou moins efficacement par la molécule (figure1). Au niveau de la molécule, cette absorption se caractérise par la promotion d'un électron d'une orbitale moléculaire occupée vers une orbitale de plus haute énergie vacante.

La capacité d'une molécule à absorber une longueur d'onde est représentée par son coefficient d'extinction molaire noté ε qui s'exprime en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$. Cette valeur de ε est fortement dépendante du type de transition électronique mise en jeu ainsi que du type de solvant dans lequel se trouve la molécule. Par exemple, des transitions électroniques de type n-π* sont, pour des raisons de recouvrement entre les orbitales moléculaires, moins probables que des transitions de type π-π*. Cette différence de probabilité de transitions électronique

aboutit à des valeurs de coefficients d'extinction molaire (ε) très différente, avec typiquement des coefficients de l'ordre de 10^1-10^2 L.mol^{-1}.cm^{-1} pour des transitions n-π* alors que les transitions π-π* sont de l'ordre de 10^3-10^5 L.mol^{-1}.cm^{-1}.

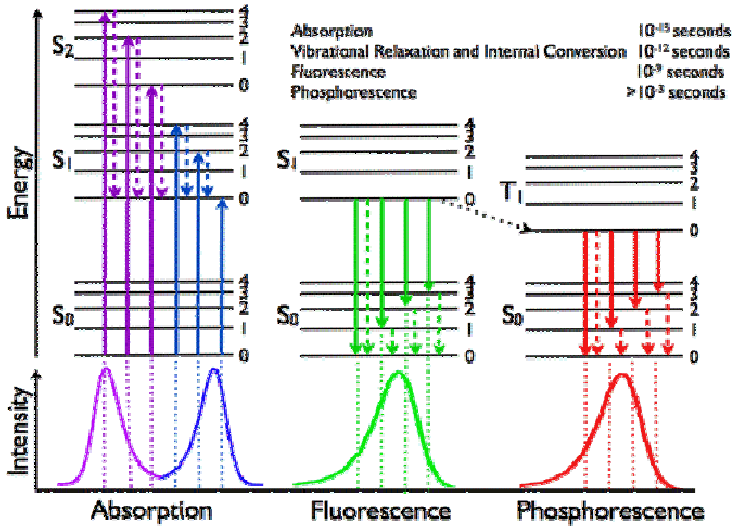


Figure 1. Diagramme de Perrin-Jablonski

Expérimentalement, la détermination du coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée s'effectue par une mesure d'absorption UV-visible. D'après la loi de Beer-Lambert (équation 1), l'absorbance ($A^{(\lambda)}$) d'un échantillon à une longueur d'onde donnée est dépendante linéairement de la concentration de l'échantillon (C), de la longueur du trajet optique à l'intérieur de l'échantillon (l) et du coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'irradiation ($\varepsilon^{(\lambda)}$). Ainsi, connaissant C et l et mesurant $A^{(\lambda)}$, il est très simple de remonter à la valeur de $\varepsilon^{(\lambda)}$.

$$A^{(\lambda)} = \varepsilon^{(\lambda)} \times l \times C$$

Équation 1. Loi de Beer-Lambert

Il est important de noter que la concentration impacte autant l'absorbance que ε, il est donc primordial lors d'une mesure en vue de déterminer une valeur d'$\varepsilon^{(\lambda)}$, de s'assurer que l'échantillon en solution est bien dissous ; auquel cas, la concentration réelle de l'échantillon est plus faible que celle espérée, ce qui induit une sous-estimation de la valeur de l'epsilon calculé.

1.3 Relation entre l'énergie et la longueur d'onde

D’après la relation de Planck-Einstein (équation 2), l’énergie E d’un photon est proportionnelle à sa fréquence ν (exprimée en Hz) et à la constante de Planck notée h (de valeur ~6,62.10^{-34} J.s). De plus, la fréquence d’un photon est proportionnelle à la célérité de la lumière dans le vide C (de valeur ~3.10^{8} m.s^{-1}) divisé par la longueur d’onde λ du photon (exprimé en nm).

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Équation 2. Relation de Planck-Einstein.

1.4 Émission de fluorescence

Lors du processus d’excitation, un transfert d’électron depuis l’état fondamental (S_0) jusqu’à un état excité (S_n), est initié. L’excitation est un processus tellement rapide (~10^{-15} s), que malgré l’état instable atteint (état excité), la molécule et sa cage de solvatation restent figées pendant tout le processus d’absorption (état de Franck-Condon). La molécule relaxe ensuite très rapidement (10^{-11}-10^{-9} s) jusqu’à l’état excité de plus basse énergie (S_1) via des processus de conversion internes (figure 1). Lorsque l’état S_1 est atteint, l’électron peut retourner à l’état fondamental selon trois processus : conversion interne, émission de fluorescence et passage intersystème.

La conversion interne est un processus dit non radiatif, c'est-à-dire qu’il n’émet pas de photon. Lors de la relaxation de Sn à S1, la conversion interne est trop rapide pour que les autres processus de désexcitation puissent rentrer en compétition. Cependant, une fois l’état excité de plus basse énergie (S1) atteint, le gap énergétique entre les états électroniques S1 et S0 est trop grand pour que la conversion interne se fasse à la même vitesse que pour passer de Sn à S1. Ce ralentissement du processus de conversion interne permet aux autres processus, tels que la fluorescence, ou le passage intersystème, d’entrer en compétition.

Le passage de l’état S_1 à S_0 par émission d’un photon est le processus radiatif rapide (10^{-10}-10^{-6} s) appelé fluorescence. Il est important de noter que la vitesse du processus n’est pas liée à l’émission du photon (qui est aussi rapide que l’absorption ~10^{-15} s), mais à la durée de vie de l’état S1.

D’après la loi de Kasha, la fluorescence ne peut avoir lieu que depuis l’état excité de plus basse énergie, ce qui correspond au niveau vibrationnel V_0 de l’état S_1 (noté S_1V_0). Cette loi explique pourquoi l’émission de fluorescence a toujours lieu à des énergies plus faibles que l’absorption de photons.

Dans certains cas, le passage de S_1 à S_0 peut prendre une voie moins directe que l’émission d’un photon depuis S_1 ou bien la conversion interne. Cette voie est appelée le croisement intersystème. Ce processus est une transition dite « interdite » puisqu’elle fait intervenir des multiplicités de spin différentes. En effet, ce passage de l’état singulet à un état triplet nécessite un retournement de spin (inversion du moment magnétique du spin, illustration 1). Pour autant la rapidité de ce processus (10^{-10}-10^{-8} s) lui permet de rentrer en compétition avec la conversion interne et la fluorescence dans certaines configurations.

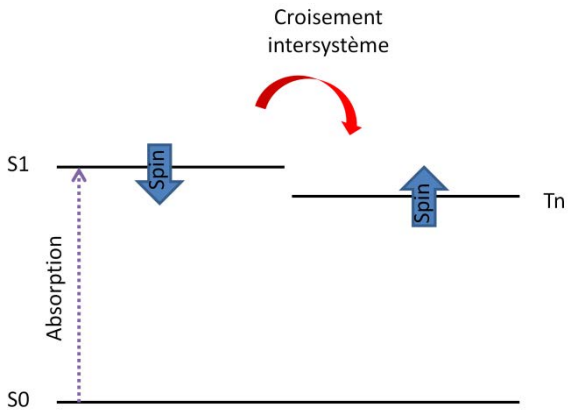


Illustration 1. Schématisation du retournement de spin.

Bien souvent, le passage de T_n à S_0 se fait via des processus non radiatifs de type transfert d’énergie par collision avec l’oxygène, un autre chromophore ou bien le solvant. Cependant, lorsque la température baisse, la probabilité de transferts d’énergies par collision diminue à mesure que la viscosité du solvant augmente. Ce phénomène favorise le retour à l’état fondamental S0 depuis l’état excité T_1 par émission d’un photon. Ce processus radiatif lent (temps de vie de T_1 ~ 10^{-6}-1 s) est appelé phosphorescence. Il est important de noter que les états triplets (T_n) sont toujours plus bas en énergie que les états singulets « correspondants », ce qui a pour conséquence un déplacement systématique de l’émission de phosphorescence vers les grandes longueurs d’onde par rapport à la fluorescence.

2. Mesure de rendement quantique de fluorescence et notion de temps de vie

Afin de pouvoir comparer des molécules fluorescentes entre elles, il est nécessaire de déterminer un critère de comparaison. Dans cette optique, et dans le but de comprendre le comportement émissif des fluorophores, la mesure de l'efficacité de l'émission de fluorescence est un élément essentiel.

2.1 Notion et mesure du rendement quantique de fluorescence Φ_F.

Comme expliquée précédemment, l'émission d'un photon depuis l'état S1 (ou fluorescence) n'est pas un événement certain, plusieurs processus rentrent en compétition. Il est donc nécessaire de déterminer l'efficacité de l'émission de fluorescence, afin de déterminer si les processus non radiatifs sont majoritaires ou bien absents, et si la molécule est un émetteur efficace. L'efficacité de l'émission d'un photon est appelée rendement quantique de fluorescence (noté Φ_f). Ce rendement peut être calculé (équation 3) à partir des différentes constantes de vitesses des processus radiatifs (k_r) et non radiatifs (k_{nr}).

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r}$$

Équation 3. Calcul du rendement quantique de fluorescence à partir des constantes de vitesse.

De par cette équation, la vitesse relative des processus de désactivation radiative et non radiative détermine l'efficacité de fluorescence de la molécule. Ainsi si $k_r >> k_{nr}$, le composé est très fluorescent, si $k_r \sim k_{nr}$, le composé est moyennement fluorescent et si $k_r << k_{nr}$, le composé n'est pas fluorescent. Puisque la fluorescence a lieu depuis l'état S1, il est intéressant de mettre en relation le temps de vie de l'état singulet S1 (τ_s) avec le rendement quantique de fluorescence (équation 4).

$$\tau_s = \frac{1}{k_{nr}^s + k_r^s}$$

D'où

$$\Phi_f = \tau_s \times k_r^s$$

Équation 4. Relation entre τ_s et Φ_f.

Expérimentalement, il est plus complexe d'obtenir les constantes de vitesses que le rendement quantique de fluorescence. Pour cette raison, les constantes de vitesses sont généralement déterminées à partir du calcul de Φ_f (équation 5) et de la mesure du temps de vie de fluorescence (τ).

Le rendement quantique de fluorescence est calculé par comparaison avec une référence (tableau 1) selon l'équation 5, où *n* est l'indice de réfraction du solvant de la référence (n_R) et du fluorophore (n), $A_{\lambda Exc}$ est la valeur de l'absorbance du fluorophore et de la référence ($_R$) à leur longueur d'onde d'excitation respective et Φ_{fR} est le rendement quantique de fluorescence de la référence. Le dernier terme est l'intégrale du spectre d'émission de la référence ($_R$) et du fluorophore.

$$\Phi_f = \Phi_{fR} \times \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_{Exc})}}{1 - 10^{-A(\lambda_{Exc})}} \times \frac{\int_0^\infty I_f(\lambda_{Exc}, \lambda_f)\, d\lambda_f}{\int_0^\infty I_{fR}(\lambda_{Exc}, \lambda_f)\, d\lambda_f}$$

Équation 5. Calcul expérimental de Φf.

À cause des phénomènes d'absorption non homogène dans l'échantillon (filtre interne), il est important lorsque l'on détermine un rendement quantique de fluorescence, de placer les valeurs d'absorbance de la référence et de l'échantillon dans la gamme 0.1-0.05.

Tableau 1. Propriétés photophysiques de références usuelles.

Référence	Solvant	n[a)]	λ_{abs}^{max} nm	λ_{em}^{max} nm	Φ_F[b)]
Quinine bisulfate (QBS)	Solution aqueuse d'acide sulfurique 0.1N	1.338	347	452	0.546
Fluorescéine (Flsc)	Solution aqueuse de soude 0.1N	1.33	474	512	0.90
Crésyl violet (CV)	Méthanol	1.329	570	620	0.54
Indocyanine Green (IR)	Diméthylsulfoxyde	1.477	678	813	0.11

a) Indice de réfraction du solvant. b) Rendement quantique de fluorescence.

2.2 Notion de temps de vie de fluorescence

Le temps de vie de fluorescence est une donnée expérimentale qui permet de calculer les constantes de vitesse des processus radiatifs et non radiatifs de l'état S1 (équation 4) à l'aide du rendement quantique de fluorescence. Physiquement, le temps de vie de fluorescence correspond au temps t pour lequel 63% de toutes les espèces excitées sont retournées à l'état fondamental par émission d'un photon, il est souvent donné en ns.

3. Influence des solvants sur les fluorophores : solvatochromie

Lorsque des molécules fluorescentes sont étudiées, mesurer l'impact de la nature des solvants sur les propriétés d'absorption et d'émission des molécules est une donnée essentielle pour la compréhension de systèmes plus complexes comme les nanoparticules.

3.1 Polarisabilité des solvants et interactions entre la molécule et le solvant

Les molécules de solvant utilisées en spectroscopie de fluorescence sont généralement de petites molécules dont les masses molaires variant de 18 $g.mol^{-1}$ (eau) à 119 $g.mol^{-1}$ (chloroforme). Mis à part les solvants alcanes (heptane, cyclohexane…), les molécules de solvant possèdent un moment dipolaire non nul et donc sont sensibles aux champs électriques locaux. C'est-à-dire que le nuage électronique du solvant va se réorganiser sous l'influence d'un champ électrique. Cette propriété des molécules à pouvoir être influencées par un champ électrique s'appelle la polarisabilité ; plus une molécule est polarisable, plus son nuage électronique va être affecté par le champ.

Lorsqu'un fluorophore est excité, un de ses électrons change d'orbitale ; de ce fait, une fois l'état de Franck-Condon atteint, le fluorophore possède un moment dipolaire différent de celui de l'état fondamental. Ce changement de moment dipolaire de l'état excité induit un champ électrique local différent de celui de l'état fondamental. Afin de retrouver une configuration stable, le solvant va se réorganiser sous l'influence de ce champ électrique (rotation de la molécule de solvant) et stabiliser l'état excité du fluorophore.

Une fois l'émission de fluorescence effectuée, le solvant qui stabilisait l'état excité, se trouve dans une configuration où il déstabilise l'état fondamental. Afin de retrouver un système stable, la cage de solvatation se réorganise de nouveau pour stabiliser l'état fondamental (illustration 2).

Il est important de noter que cette réorganisation de la cage de solvatation dépend de plusieurs paramètres dont la viscosité du solvant et le temps de vie de l'état excité, mais surtout de la différence de moment dipolaire du fluorophore entre son état fondamental (μ_g) et excité (μ_e).

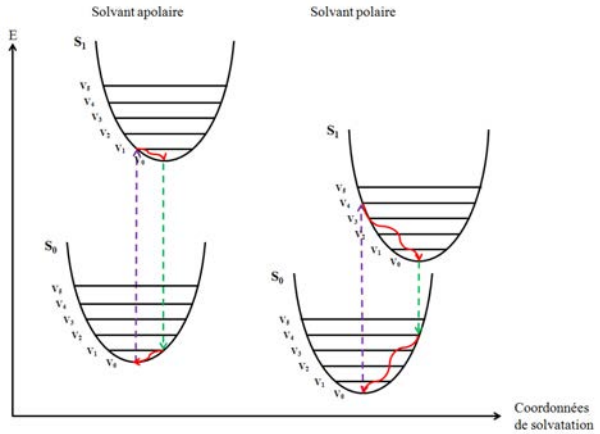


Illustration 2. Représentation de l'influence de la polarité du solvant sur un fluorophore où $\mu_g < \mu_e$, l'ordonnée est exprimée en énergie.

Une façon de simplifier cette relation complexe entre solvant et fluorophore est que dans la plupart des cas de figure (exemple du nile red, figure 2), un solvant apolaire stabilise l'état fondamental et déstabilise l'état excité (émission vers les courtes longueurs d'onde) à l'opposé, un solvant polaire stabilise l'état excité et déstabilise l'état fondamental (émission vers les longues longueurs d'onde).

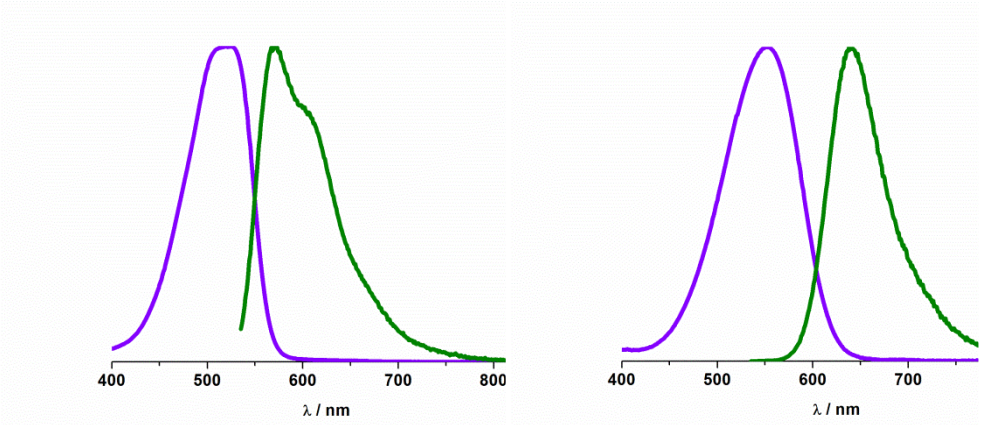


Figure 2. Spectres d'absorption et d'émission du nile red dans un solvant apolaire (toluène) à gauche et dans un solvant polaire (méthanol) à droite.

3.2 Déplacement de Stokes et équation de Lippert-Mataga

La différence de moment dipolaire Δμ entre l'état excité et l'état fondamental est un paramètre intéressant à déterminer puisqu'il permet de rationaliser le transfert de charge au sein du fluorophore lors de l'excitation (pour des chromophores de types push-pull).

La relation entre solvatations et Δμ est représentée dans l'équation de Lippert-Mataga (équation 6a). Les différents termes de cette équation sont : *h* (constante de Planck), *c* (célérité de la lumière), ν_{Abs} (énergie du maximum d'absorption de la bande de plus basse énergie), ν_{Em} (énergie du maximum d'émission), a (rayon de la cavité d'Onsager) et Δ*f* (polarisabilité d'orientation).

$$hc \times (\nu_{Abs} - \nu_{Em}) = \Delta\mu^2 \times \frac{2\Delta f}{a^3} + constante$$

Équation 6a. Équation de Lippert-Mataga.

Cette équation peut aussi s'écrire sous une autre forme :

$$(\nu_{Abs} - \nu_{Em}) = \Delta f \times \frac{2\Delta\mu^2}{hca^3} + constante$$

Soit :

$$\nu_{Abs} - \nu_{Em} = \Delta f \times \alpha + constante$$

Équation 6b. Équation de Lippert-Mataga

En regardant l'équation 6b, il apparaît clairement que si la différence d'énergie entre les maximums d'absorption et d'émission (appelé déplacement de Stokes) évolue linéairement avec le paramètre Δ*f*, alors la pente de cette droite est égale à ($2\Delta\mu^2/hca^3$).

Le paramètre Δ*f* est déterminé pour chaque solvant selon l'équation 7, où ε est la constante diélectrique du solvant et n son indice de réfraction.

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

Équation 7. Calcul de Δ*f*.

Le rayon de la cavité d'Onsager noté *a* correspond au rayon de la cavité (supposé sphérique) dans laquelle la molécule ou partie de molécule solvatée évolue. Une façon

d’estimer raisonnablement a, est d’utiliser l’équation de Perrin (équation 8) dans une certaine limite (approximation de la viscosité autour de la molécule comme étant celle du solvant et fluorophore considéré comme une sphère).

$$r_{max} = \frac{0.4}{1 + \frac{\tau}{\left[\frac{\eta V}{KT}\right]}}$$

Équation 8. Équation de Perrin.

Dans cette équation, l’anisotropie de fluorescence du fluorophore (r) est directement mise en relation avec le temps de vie de fluorescence (τ), la viscosité du solvant (η), la constante de Boltzmann (K), la température (T) et le volume hydrodynamique de la molécule (V).

Considérant la molécule comme une sphère, la relation entre V et *a* est décrite dans l’équation 9, ce qui permet de déterminer une valeur approximative du rayon de la cavité d’Onsager.

$$V = \frac{4\pi \times a^3}{3}$$

Équation 9. Équation reliant le volume de la molécule et le rayon de la cavité d’Onsager.

Il est important de noter que dans les fluorophores de type quadrupôle et octupôle, dans certains cas, malgré la présence de plusieurs parties dipolaires dans ces molécules, seul un des deux « dipôles » (pour les quadrupôles) ou un des trois « dipôles » (pour les structures octupolaires planes) est responsable de la fluorescence. Dans ces cas-là, il faut apporter un terme correctif pour la détermination du rayon de la cavité d’Onsager, puisque ce n’est pas toute la molécule qui est prise en compte, mais seulement une partie (Illustration 3). Les termes correctifs sont les suivants : pour un quadrupôle, *a* dans l’équation 9 doit être remplacé par (*a*/2) et dans le cas d’un octupôle, *a* doit être remplacé par (0.433**a*).

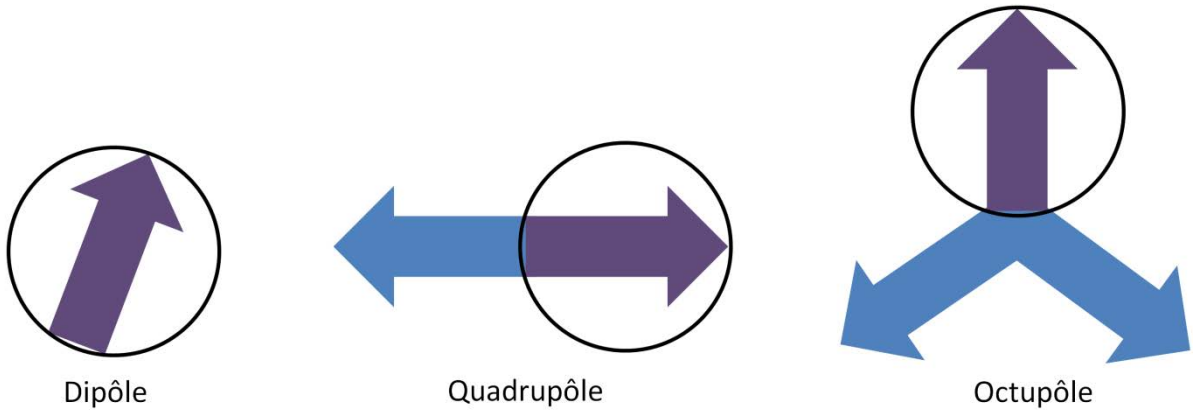


Illustration 3. Représentation de la cavité d'Onsager (cercle noir) dans des molécules de type dipôle, quadrupôle et octupôle. Afin de simplifier le schéma, l'octupôle n'est représenté que dans une configuration plane.

Lorsqu'un fluorophore est irradié par une source lumineuse, que cette source soit polarisée ou naturelle, dans la majorité des cas le fluorophore absorbe selon une direction préférentielle dépendante du moment de transition mis en jeu (S0-S1, S0-S2, etc.). Cependant, lorsque le fluorophore émet un photon, ce photon est émis parallèlement au moment de transition de plus basse énergie (S1-S0). Ainsi, entre l'absorption et l'émission, il peut y avoir une différence entre les plans de polarisation de l'excitation et de l'émission. L'anisotropie de fluorescence permet de mesurer la variation de l'intensité de fluorescence en fonction des plans de polarisation. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet de remonter à de précieuses informations comme le type d'environnement entourant le fluorophore (viscosité de la solution, fluorophore piégé dans une membrane, etc.).

4. Fluorescence induite par l'absorption à deux photons

La fluorescence induite par l'absorption simultanée de plusieurs photons est une technique qui devient de plus en plus populaire dans le milieu de l'imagerie cellulaire et des tissus puisqu'elle permet d'irradier les fluorophores en profondeur avec plus de précision. Afin de mieux comprendre l'intérêt de cette technique, les concepts de base de l'absorption à deux photons sont présentés dans cette section.

4.1 Principe de l'absorption à deux photons

L'absorption à deux photons est un phénomène qui a été proposé pour la première fois pas Maria Goeppert Mayer en 1929. Cette lauréate du prix Nobel de physique (1963) n'a pu voir sa théorie confirmée qu'à partir de l'arrivée des lasers dans les années 1960.

Conceptuellement, le principe de l'absorption à deux photons est assez simple : si une molécule peut passer de l'état fondamental à l'état excité par l'absorption d'un photon de haute énergie *P1*, et si on irradie cette même molécule avec un flux de photons d'énergie deux fois plus faible *P2*, on peut par l'absorption simultanée de deux photons exciter la molécule (puisque *P1* = *P2* + *P2*) comme le montre l'illustration 4.

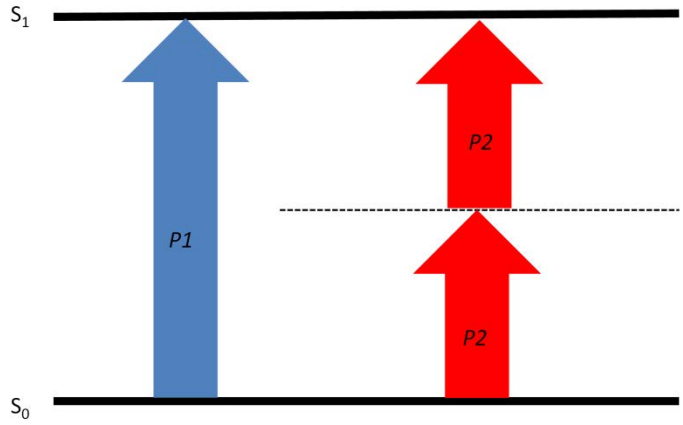


Illustration 4. Principe de l'absorption à deux photons.

Expérimentalement l'absorption à deux photons est un phénomène complexe à observer, puisque la probabilité d'absorber en même temps deux photons par une même molécule est nulle dans des conditions classiques d'excitation. L'absence de niveaux électroniques compatibles avec l'énergie d'un photon *P2*, implique que l'absorption de *P2* se fait sur un niveau virtuel dont le temps de vie est extrêmement court ($\delta t < 5\ 10^{-15}$ s). Afin de compléter l'excitation, il faut pendant la durée de vie de cet état virtuel qu'un autre photon *P2* soit absorbé par la molécule, afin de promouvoir l'électron sur un niveau électronique réel. L'efficacité de l'absorption à deux photons se nomme la section efficace d'ADP (σ_2) et s'exprime en GM (en hommage à M. Goeppert Mayer).

Le faible laps de temps entre l'absorption du premier et du second photon *P2*, explique pourquoi ce phénomène est improbable, et pourquoi il est nécessaire d'utiliser des lasers intenses pour observer ce phénomène. Le moyen le plus simple de favoriser l'absorption du second photon est d'augmenter la concentration en photons, et donc d'augmenter l'intensité

du flux de photon. La dépendance de σ_2 vis-à-vis de l'intensité (I) de l'irradiation n'est pas linéaire, contrairement à l'absorption classique. Ainsi l'ADP est proportionnelle à I^2, et fait partie d'une branche « récente » de la physique qu'est l'optique non linéaire.

La dépendance au carré de l'intensité de σ_2 implique que l'excitation d'une molécule par ADP a principalement lieu au point de focalisation du laser (figure 3), donnant ainsi une résolution d'excitation spatiale exceptionnelle.

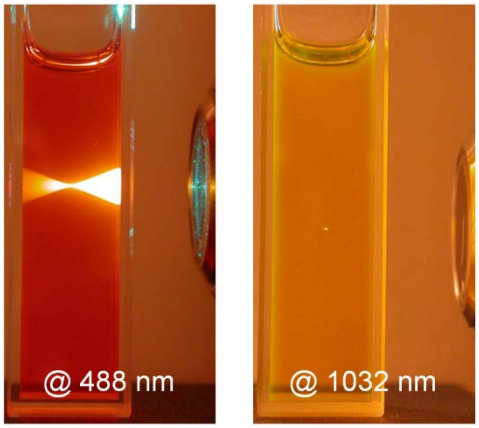


Figure 3. Irradiation d'une solution de fluorophore à un (gauche) et deux photons (droite).

Sans entrer dans les détails, les fortes puissances nécessaires pour observer l'ADP sont générées à partir de lasers pulsés focalisés.

4.2 Mesure de l'absorption à deux photons

Selon les propriétés du composé/matériau dont on souhaite mesurer l'ADP, deux types de mesures sont possibles. Si le système étudié est non fluorescent, la technique de mesure de l'ADP utilisée se nomme le Z-scan. Cette technique se base sur le fait que l'ADP est dépendante au carré de l'intensité, le maximum d'ADP se situant au point focal du laser. En faisant varier l'intensité d'excitation (en déplaçant l'échantillon le long du trajet optique) et en collectant l'intensité transmise, il est possible de remonter à la valeur de σ_2.

Cette technique est la seule manière de mesurer l'ADP d'un composé non fluorescent. Cependant la sous-estimation de divers paramètres (effet Kerr optique, absorption de l'état excité…) conduit à une surestimation de la valeur de σ_2, limitant ainsi son utilisation surtout lorsque les matériaux sont fluorescents.

Lorsque le système étudié est fluorescent, la technique utilisée se nomme la fluorescence par excitation à deux photons (TPEF). Puisque l'émission de fluorescence est effectuée depuis l'état excité de plus basse énergie (loi de Kasha), cette luminescence est indépendante de la source d'excitation. Cette règle est très importante puisqu'elle permet de s'assurer que lorsque l'état excité est atteint par excitation à deux photons, la fluorescence émise par le fluorophore est la même que par excitation classique.

Cette technique permet, via l'utilisation d'une référence fluorescente absorbante à deux photons (par exemple la fluorescéine), de mesurer la valeur de $\sigma_2\Phi_f$ du système étudié (appelé la brillance à deux photons) et connaissant la valeur du rendement quantique de luminescence du système, de déterminer σ_2.

Ainsi la fluorescence peut être utilisée pour mesurer la section efficace d'absorption à deux photons (σ_2) avec une excellente fiabilité. Cette technique est utilisée au sein du laboratoire pour déterminer les propriétés d'ADP des chromophores présentés dans ce manuscrit.

Références bibliographiques

[1] McPhie P 2000 Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. Joseph R. Lakowicz *Anal. Biochem.* **287** 353-4.

Chapitre II – Préparation de FONs à base de molécules dipolaires

Chapitre II – Préparation de FONs à base de molécules dipolaires

Les chromophores présentés dans ce chapitre ont été synthétisés au sein du laboratoire par différents opérateurs. La description de la synthèse de ces molécules est disponible dans les articles relatifs à ces composés.

1. Introduction

Antérieurement aux travaux présentés dans ce manuscrit, la synthèse et l'étude de nanoparticules à base de molécules comportant un motif triphénylamine[1-4] ont permis de légitimer la présence du tout organique dans le domaine de la nano-imagerie.[3] Le choix du motif triphénylamine amine est basé sur sa capacité à délocaliser les électrons et à générer de l'encombrement.

En effet, de par sa nature, le motif triphénylamine joue le double rôle de donneur d'électrons et de bouclier anti-empilement. Dans des molécules de type push-pull, le doublet électronique de l'azote peut, selon le type d'accepteur et de système π conjugué, se délocaliser facilement. Cette propriété se caractérise bien souvent en absorption par l'apparition d'une bande de transfert de charge intramoléculaire (ICT) dont l'intensité varie avec « la probabilité » de la délocalisation. Puisque l'ICT est majoritairement responsable des propriétés d'absorption et d'émission des fluorophores dipolaires en solution, pouvoir moduler ce paramètre est important.

La délocalisation électronique au sein de molécules organiques a largement été étudiée dans la littérature. Les principaux facteurs agissants sur la délocalisation électronique dans le cas de molécules push-pull sont : la force du couple accepteur/donneur,[5-8] la nature du système π conjugué[9-12] et la longueur du système π conjugué.[5, 13-15] Ces études montrent que l'utilisation de donneur/accepteur fort favorise fortement le transfert de charge. De même, un système π conjugué long et facile à délocaliser accentue l'ICT. Les systèmes π de type oligothiophène ont rapidement été utilisés pour la préparation de semi-conducteurs organiques[16-20] en tant que système π, puis pour la préparation de chromophores.[7, 8, 11]

L’engouement pour les dérivés à base d’oligothiophène provient de la faible aromaticité du thiophène, qui facilite le transfert de charge par un amoindrissement du coût en énergie (en comparaison avec les dérivés phényles). De plus les oligomères de thiophènes sont bien souvent non toxiques,[21] ce qui est un critère important lorsque des applications d’imagerie biologique sont visées.

Néanmoins, une des caractéristiques principales des dipôles est qu’ils ont tendance à s’assembler (interaction dipôle-dipôle) lorsque leur concentration est trop importante (Illustration 1).

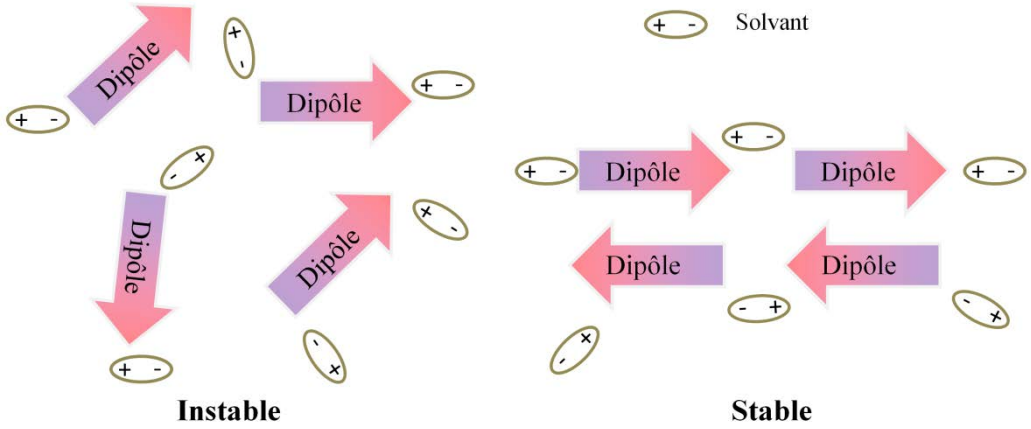


Illustration 1. Représentation du comportement des dipôles en solution.

L’inconvénient de cette association est qu’elle se fait dans une configuration dite antiparallèle. C’est-à-dire que les moments dipolaires des dipôles vont orienter les molécules de telle façon que le moment dipolaire résultant soit nul. La conséquence directe de cette atténuation/disparition du moment dipolaire global est une baisse de la délocalisation intramoléculaire des électrons, induisant une baisse de l’intensité de la bande ICT.

L’interaction antiparallèle au sein de dimères dipolaires peut, si elle est suffisamment forte, induire un déplacement hypsochrome (vers les hautes énergies donc les petites longueurs d’onde) des bandes d’absorption et d’émission. Ce décalage vers les petites longueurs d’onde s’explique par une scission de l’état excité (décrit dans la théorie de l’exciton moléculaire)[22, 23] en deux niveaux énergétiques (illustration 2); le passage de l’état fondamental à l’état excité *E1* par absorption est interdit pour raison de symétrie alors qu’il est autorisé pour le niveau le plus haut en énergie (*E2*) ; ainsi la transition S0-*E1* est peu probable et donc possède une valeur d’epsilon très faible contrairement à S0-*E2*.

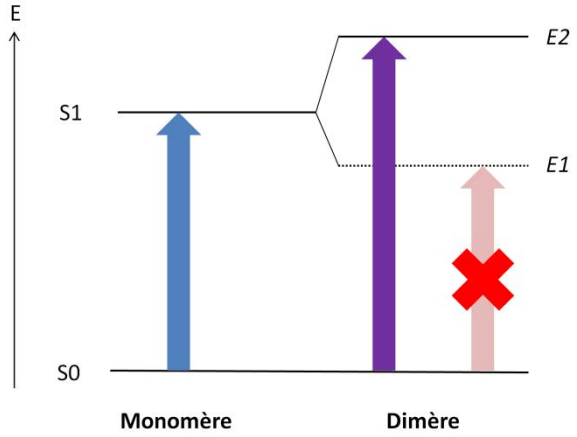
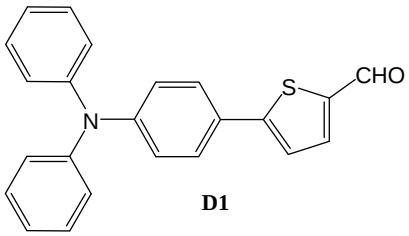


Illustration 2. Diagramme d'énergie des bandes excitoniques de dipôles moléculaires sous forme de monomère et de dimère, l'ordonnée est exprimée en énergie.[23]

Le décalage des bandes d'absorption et d'émission n'est pas la seule conséquence de ce type d'empilement, puisque généralement, la formation de dimères antiparallèles s'accompagne d'une baisse significative de l'émission.[23]

Comme le démontre la structure moléculaire (figure 4), la géométrie du motif triphénylamine génère un encombrement stérique important au voisinage du doublet non liant de l'azote. L'effet bouclier des deux phényles (qui ne participent pas à la conjugaison), diminue mécaniquement l'interaction entre les dipôles, atténuant ainsi les effets de l'empilement antiparallèle. Cette prévention de l'empilement antiparallèle a permis d'obtenir par agrégation dans l'eau des chromophores,[24, 25] des nanoparticules purement organiques[3, 4] qui, malgré la proximité évidente des molécules confinées à l'intérieur de la nanoparticule, conservent une émission de fluorescence facilement détectable à l'œil, par exemple le composé **D1**[3] (schéma 1).



D1

Schéma 1. Structure chimique de **D1**.

Les FONs **D1** absorbent dans le bleu (cf. tableau 1) avec une émission à forte dominance verte. Malgré d'excellentes propriétés d'émission, ces nanoparticules « primitives » possèdent une stabilité colloïdale faible (figure 1) de l'ordre d'un à deux jour.

Tableau 1. Caractéristiques des FONs **D1** dans l'eau.

	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} a) $M^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Φ_F b)	λ_{2PA}^{max} nm	σ_2^{max} c) GM	D_{TEM} d) nm	N e)
D1	418	$0.9\ 10^9$	538	0.15	827	$5\ 10^6$	34	$5.0\ 10^4$

a) Coefficient d'extinction molaire des FONs. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré par sphère d'intégration. *c)* Section efficace d'absorption à deux photons des FONs mesurée à λ_{2PA}^{max} (1 GM = 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$). *d)* Diamètre « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique. *e)* Nombre de chromophores constituant une nanoparticule.

En dépit de la présence d'une forte salinité, la stabilité colloïdale des FONs **D1** est rapportée comme étant suffisante pour permettre une observation in vivo du comportement de ces FONs dans des vaisseaux sanguins.[3] Néanmoins, augmenter la stabilité colloïdale de ces FONs pourrait permettre d'effectuer de l'imagerie sur plusieurs jours, ouvrant ainsi de nombreuses possibilités d'utilisation de ces NPs dans l'imagerie *in vivo* ; par exemple la détermination du temps de résidence des FONs dans le système vasculaire, du taux d'accumulation des FONs dans les organes filtrants, de la toxicité à court et moyen terme pour ce type de FONs, etc.…

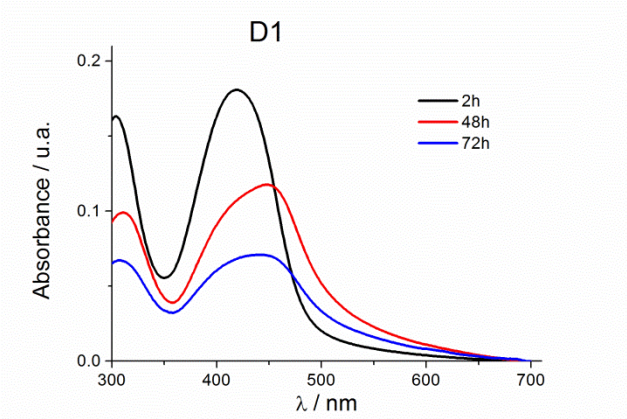
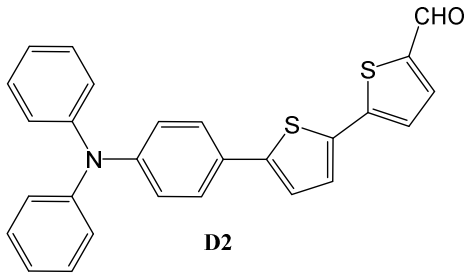


Figure 1. Évolution de la stabilité colloïdale des FONs **D1** par suivi de l'absorption UV-visible.

De même, que la stabilité des NPs est importante, il est important pour la bioimagerie de disposer de FONs émettant dans plusieurs domaines du visible. En s'inspirant de ce chromophore prototype et à l'aide de l'ingénierie moléculaire,[14, 26, 27] de nouvelles générations de chromophores (**D2-D4**) ont été synthétisées. Des variations de la structure chimique de **D1** ont permis de moduler les propriétés d'absorption et d'émission de ces nouveaux chromophores. Ces modifications de structures impactent également la stabilité chimique (**D4**) et colloïdale (**D2-D4**) de ces dipôles en solution aqueuse.

2. Propriétés photophysiques de D2 en solution moléculaire

L'élongation du système π dans les molécules conjuguées est une stratégie largement décrite pour décaler l'absorption et l'émission vers les basses énergies.[13] Le système π du nouveau chromophore **D2** est étendu grâce à l'utilisation d'un système bithienyl à la place du système monothienyl de **D1**.



D2

Schéma 2. Structure de **D2**.

Comme expliqué précédemment, le thiophène permet une meilleure communication électronique entre les groupements accepteurs et donneurs que le benzène.

Nombre de chromophores utilisent des polyènes afin d'étendre leurs systèmes π, par exemple les cyanines,[28] ou bien les caroténoïdes.[13, 24] Bien que la préparation de nanoparticules à base de caroténoïdes soit décrite dans la littérature,[24] la planéité des motifs vinylique ainsi que l'absence de groupements fortement encombrants favorisent les interactions de type empilement π-π, délétères pour l'émission de fluorescence.

Cependant, l'inconvénient majeur des motifs vinyliques n'est pas dû aux interactions intermoléculaires qu'ils engendrent, mais à leur faible photostabilité. Lors du processus d'excitation, un électron du chromophore est promu temporairement sur une orbitale de plus haute énergie, facilitant les processus d'oxydation de la molécule.

Cette photo-oxydation des chaînes vinyles[29] peut être amplifiée dans le milieu biologique, où de nombreux oxydants sont présents. D'ailleurs, il est intéressant de noter que les caroténoïdes sont utilisés dans le vivant comme antioxydants.[30, 31]

Pour ces raisons, le thiophène est un bon compromis entre une bonne délocalisation électronique et la stabilité chimique.

2.1 Solvatochromie

Tout comme **D1**, le chromophore **D2** est un absorbeur bleu lorsqu'il se trouve en solution moléculaire. Les mesures d'émission de fluorescence dans des solvants de polarités différentes (figure 2) montrent clairement un solvatochromisme positif, avec une émission couvrant quasiment le domaine du visible : du cyan (toluène) au rouge orangé (DMSO).

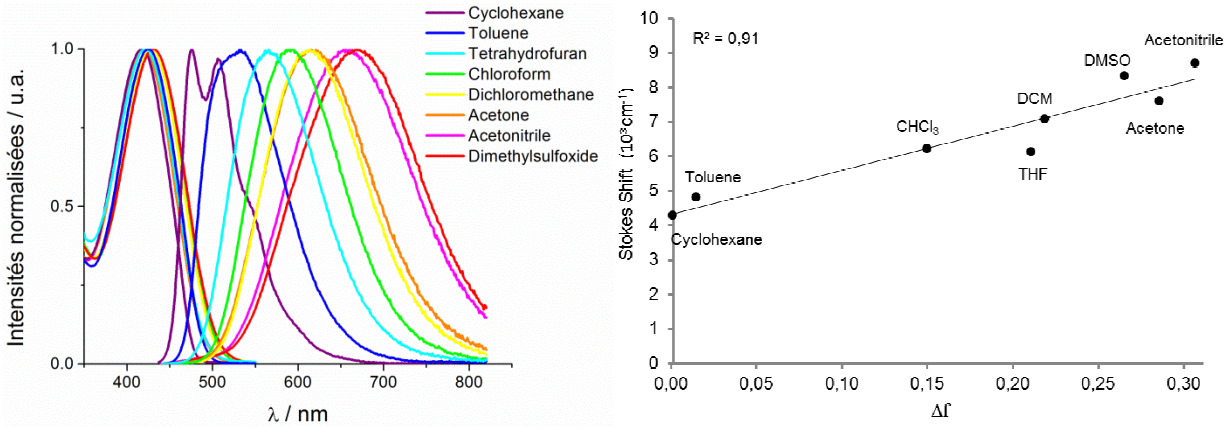


Figure 2. Gauche : Absorption et émission normalisées de **D2** dans des solvants de polarités différentes ; Droite : Corrélation de Lippert-Mataga **D2** en solution.

Cette variation de l'émission de fluorescence en fonction de la polarité des solvants indique une augmentation assez importante du moment dipolaire de la molécule lors de son excitation. Comme expliqué dans le chapitre dédié à la fluorescence, en utilisant les mesures de temps de vie de fluorescence, d'anisotropie et la corrélation de LM, il est possible de déterminer la différence de moment dipolaire induite par l'excitation ($\Delta\mu$).

La valeur obtenue pour le composé **D2** ($\Delta\mu$ = 15D) est supérieure à celle calculée pour **D1** ($\Delta\mu$ = 12.5D).

Cette augmentation de la différence de moment dipolaire entre l'état fondamental et l'état excité entre un chromophore monothienyl et son homologue bithienyl est une preuve supplémentaire que les motifs thienyls favorisent fortement la communication électronique entre les groupements donneurs et accepteurs au sein du dipôle.

Tableau 2. Propriétés photophysiques de **D2** en solution moléculaire.

Solvant	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	FWHM *b)* cm^{-1}	Φ_f *c)*	τ *d)* ns
Cyclohexane	417	$4.6\ 10^4$	508	$3.3\ 10^3$	0.47	1.0
Toluène	424	$2.9\ 10^4$	533	$3.7\ 10^3$	0.71	2.1
$CHCl_3$	431	$6.9\ 10^4$	589	$3.5\ 10^3$	0.91	3.1
THF	420	$3.6\ 10^4$	566	$3.6\ 10^3$	0.85	2.9
DCM	427	$4.4\ 10^4$	612	$3.5\ 10^3$	0.75	3.5
Acétone	419	$3.5\ 10^4$	615	$3.8\ 10^3$	0.60	3.2
Acétonitrile	419	$5.3\ 10^4$	660	$3.9\ 10^3$	0.32	2.1
DMSO	430	$4.3\ 10^4$	670	$3.8\ 10^3$	0.37	2.2

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Largeur à mi-hauteur de l'émission. *c)* Rendements quantique de fluorescence mesurés avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 0.1M ou la rhodamine 6G dans l'éthanol. *d)* Temps de vie de fluorescence.

2.2 Absorption à deux photons

De même que pour l'absorption linéaire, les propriétés d'absorption à deux photons (ADP) de **D2** en solution moléculaire montrent des différences significatives avec celles mesurées pour **D1** (tableau 3).

Tableau 3. Comparaison de l'absorption à un et deux photons de **D1** et **D2** dans $CHCl_3$.

Composé	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Φ_f *b)*	$2\lambda_{OPA}^{max}$ nm	λ_{2PA}^{max} nm	σ_2^{max} *c)* GM
D1	411	$2.8\ 10^4$	541	0.82	822	820	167
D2	431	$6.9\ 10^4$	589	0.91	862	910	590

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 0.1 M. *c)* Section efficace d'absorption à deux photons mesurée à λ_{2PA}^{max} (1 GM = 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$).

L'absorption à deux photons est très sensible aux effets de champ électrique ; pour cette raison, la meilleure délocalisation des électrons de l'état excité au sein de **D2** entraîne une forte réponse d'ADP dans la gamme 800-950 nm avec un maximum d'absorption à 910 nm (figure 3). Au-delà du fort décalage bathochrome de l'ADP, le composé **D2** possède une section efficace d'ADP (σ_2) plus de trois fois supérieure à celle de **D1**.

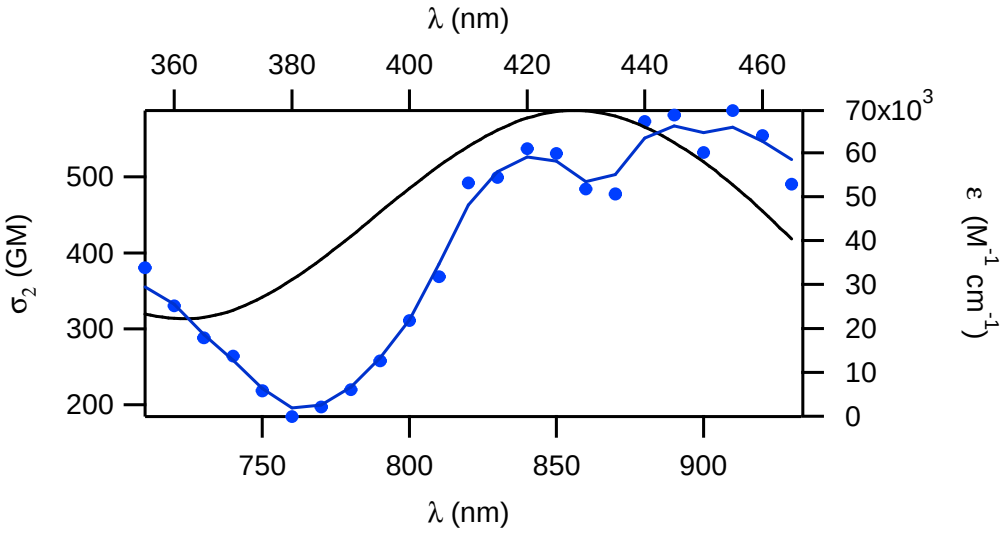


Figure 3. Spectres d'absorption à un (noir) et deux photons (bleu) de **D2** dans le chloroforme. L'échelle de gauche correspond à la section efficace d'absorption à deux photons et l'échelle de droite au coefficient d'extinction molaire.

3. Propriété de l'état solide et cristallin de D2

La structure cristalline de **D2** a été obtenue par diffraction des rayons X de cristaux issus de cette molécule.

D2 cristallise dans un système triclinique dans le groupe d'espace P-1 : alors que l'agencement moléculaire se fait sous forme de chevrons, la structure cristalline laisse clairement apparaître la présence de dimères antiparallèles (figure 4). De par leur fort encombrement stérique, les motifs triphénylamine gêne l'empilement des molécules et obligent celles-ci à ce décaler l'une par rapport à l'autre.

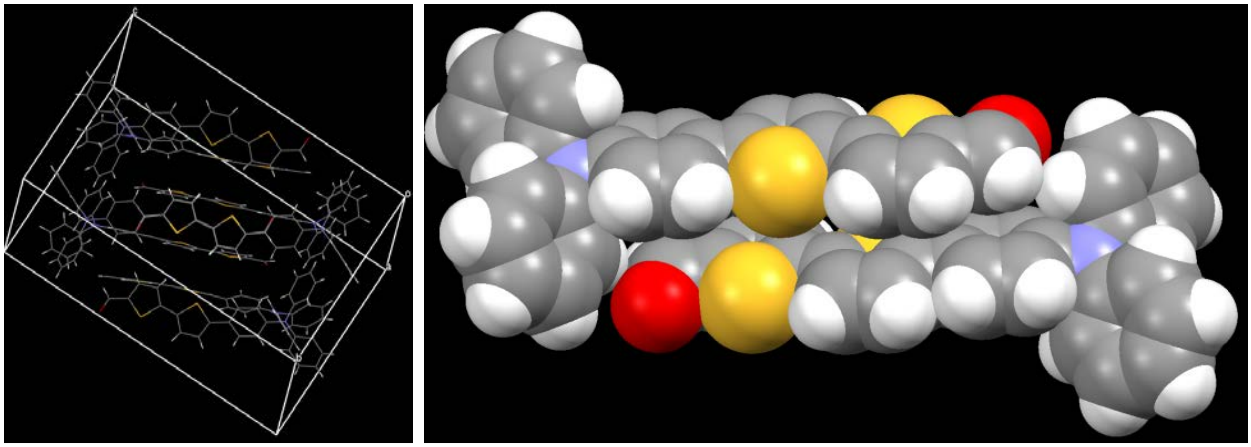


Figure 4. Représentation de la maille élémentaire (gauche) et de l'interaction moléculaire proche (droite) de **D2** dans le cristal.

Comme le montre la figure 4 à droite, un décalage « latéral » entre les deux chromophores empêche les aldéhydes d'interagir parfaitement avec les atomes d'azote,

malgré une distance intermoléculaire faible (centre à centre : d~4 Å). Ce type d'interaction moléculaire est attendu lorsque l'on travaille sur des composés dipolaires. Malgré cet agencement moléculaire défavorable à l'émission de luminescence, l'excellente planéité des systèmes π conjugués assure une excellente communication entre les groupements donneur et accepteur, permettant ainsi au cristal d'émettre dans l'orange (figure 5).

Comme la plupart des systèmes oligothiophènes, les thiophènes composant **D2** sont « twistés » d'environ 172°, ce qui leur fait adopter une conformation de type syn, conformation plus stable, permettant une meilleure délocalisation électronique des électrons par rapport à la conformation anti.

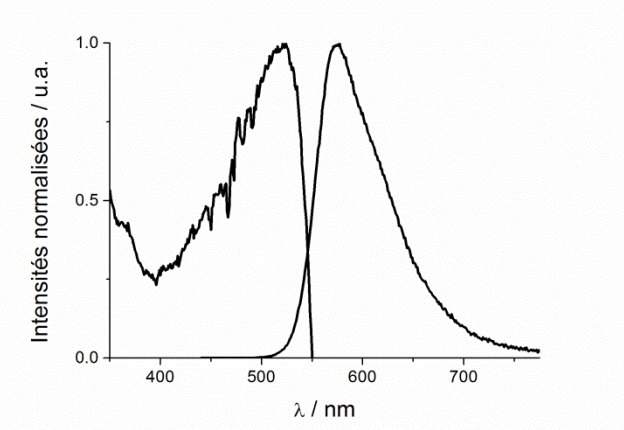


Figure 5. Spectres d'émission et d'excitation de **D2** à l'état solide.

4. Propriétés photophysiques des nanoparticules D2 dans l'eau

Les nanoparticules issues de **D2** sont préparées par la méthode dite de reprécipitation, en mélangeant une solution concentrée de **D2** dans du THF (1mM) avec de l'eau osmosé. Une fois la solution de chromophore ajoutée, le liquide résultant devient rapidement orangé tout en restant limpide. Puisque **D2** n'est pas soluble dans l'eau, la forte coloration orangée de la solution aqueuse indique que le chromophore se présente sous forme d'agrégats. La limpidité de la solution aqueuse indique que la taille des agrégats est inférieure à ~400 nm (diffusion de Mie).

4.1 Absorption et émission des FONs **D2**

Tableau 4. Propriétés photophysiques de **D2** dans l'eau en comparaison avec **D2** en solution dans le chloroforme.

Solvant	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	FWHM *b)* cm^{-1}	Φ_F *c)*	τ *d)* ns
$CHCl_3$	431	$6.9\ 10^4$	589	$3.5\ 10^3$	0.91	3.1
H_2O – (FONs)	422	$2.2\ 10^4$	597	$3.1\ 10^3$	0.07	1.1 (60%) 3.5 (40%)

a) Coefficient d'extinction molaire de **D2**. *b)* Largeur à mi-hauteur de l'émission. *c)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 0.1 M ou par sphère d'intégration. *d)* Temps de vie de fluorescence.

De la même façon que **D2** émet de la fluorescence à l'état solide, la solution aqueuse de nanoparticules issues de **D2** conserve ses propriétés de fluorescence et émet dans le visible. L'étude du comportement de **D2** en solution dans les solvants organiques a permis de mettre en évidence un solvatochromisme positif de l'émission de fluorescence. Du fait de cette propriété, **D2** est une sonde de polarité ; donc, en comparant l'émission de fluorescence de **D2** à l'état d'agrégats dans l'eau et en solution moléculaire (figure 6), il est possible de déterminer quel type d'environnement compose la nanoparticule.

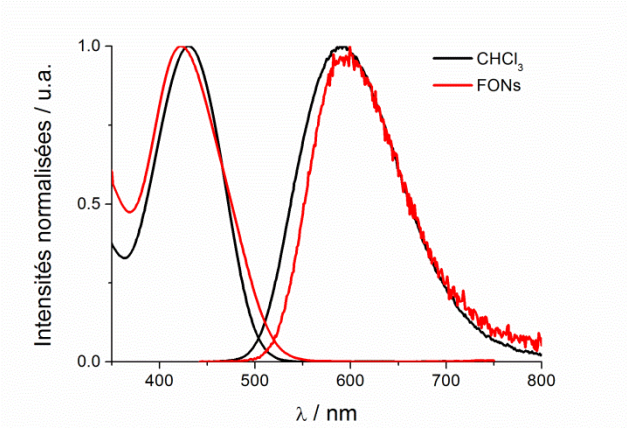


Figure 6. Spectres d'absorption et d'émission de **D2** en solution dans le chloroforme et sous forme de FONs.

De façon assez surprenante, l'émission de fluorescence dans les FONs coïncide avec une émission dans un solvant de polarisabilité moyenne comme le chloroforme. Alors que les FONs sont en suspensions dans l'eau, une émission de fluorescence correspondant à un environnement peu polaire est assez inattendue.

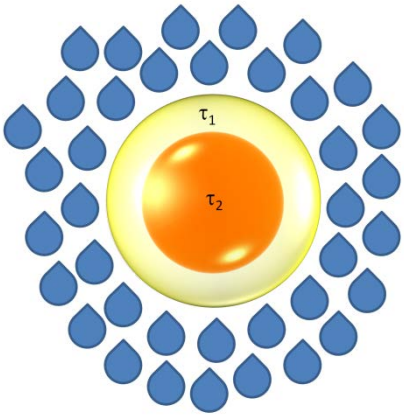


Illustration 3. Illustration des différentes espèces au sein d'une nanoparticule **D2**.

Cependant, en regardant le temps de vie de fluorescence des FONs **D2**, on remarque que celui-ci comporte une décroissance de type bi-exponentielle composé d'un temps de vie court (1.1 ns) et un temps de vie long (3.5 ns). Une des hypothèses pouvant expliquer la présence de ces deux temps de vie pourrait être que la présence du temps de vie court serait issue des molécules à l'interface de la nanoparticule puisque celles-ci subissent une forte proximité avec l'eau. À l'opposé, le temps de vie long, responsable de l'émission de fluorescence observée, pourrait correspondre aux molécules situées à l'intérieur de la nanoparticule, compatible avec un environnement peu polaire (illustration 3). Une seconde hypothèse pourrait être que le temps de vie court serait dû à la présence d'interactions intermoléculaires fortes au sein de la nanoparticule.

4.2 Absorption à deux photons des FONs **D2**

Le maintien des propriétés de fluorescence de **D2** permet de déterminer ses propriétés d'absorption à deux photons à l'état de FONs. De façon tout à fait remarquable, et malgré l'extrême dilution de ces FONs (C ~ nM), le spectre d'absorption à deux photons des FONs peut être enregistré avec un bon rapport signal/bruit.

Il est intéressant de remarquer que dans les FONs, les propriétés d'absorption à deux photons sont différentes de celles obtenues en solution dans le chloroforme. Le maximum d'ADP dans les FONs est décalé à 970 nm (figure 7) et la valeur de σ_2 est atténuée à 200 GM. Ces modifications des propriétés d'ADP démontrent la présence d'interactions intermoléculaires fortes au sein de la nanoparticule.

En effet, les interactions intermoléculaires de type dipôles-dipôles peuvent modifier profondément l'ADP de molécules polarisables. Or à l'état d'agrégats, les interactions entre les chromophores sont attendues pour être très fortes du fait de la grande proximité entre les molécules.

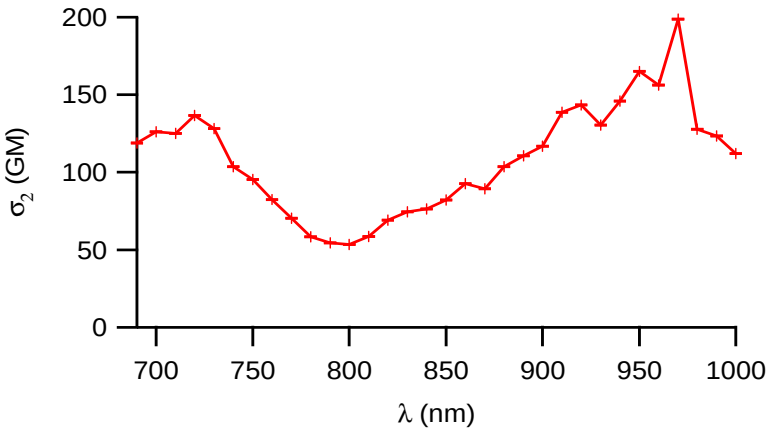


Figure 7. Spectre d'absorption à deux photons de **D2** à l'état d'agrégat dans l'eau.

4.3 Caractéristiques des FONs **D2**

Afin de caractériser les propriétés physiques des nanoparticules, des mesures de leur taille ont été entreprises, *via* des expériences de diffusion de la lumière (D_h) et de microscopie électronique (TEM). Les FONs **D2** sont des objets sphériques dont la taille brute se situe aux alentours de 35 nm (figure 8) et le diamètre des FONs hydratées est mesuré autour de 60 nm. Cette différence entre le diamètre « hydraté » et « brut » provient de la couche d'eau qui est orientée à l'interface et qui enveloppe la nanoparticule lorsque celle-ci est en solution dans l'eau.

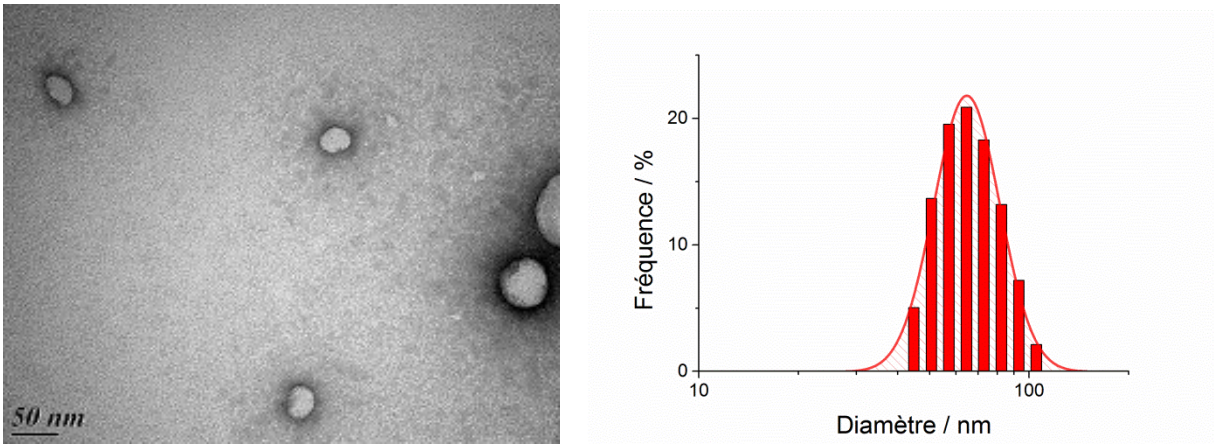


Figure 8. Image TEM (gauche) et DLS (droite) des FONs **D2** dans l'eau.

La détermination de la taille des nanoparticules permet de valider l'existence de particules dont la taille est inférieure à 400 nm, et donc la présence de nanoparticules. Puis en utilisant la densité mesurée dans la structure cristalline, on peut estimer le nombre de chromophores composant une nanoparticule. Ce nombre de chromophores (N) est ensuite utilisé pour estimer la concentration en nanoparticules et donc les paramètres liés à cette concentration (ε^{max} , $\sigma_2{}^{max}$).

Tableau 4. Caractéristiques des FONs **D2** dans l'eau

D_{TEM} *a)*	N *b)*	ε^{max} *c)*	$\sigma_2{}^{max}$ *d)*	$\varepsilon^{max}\Phi$ *e)*	$\sigma_2{}^{max}\Phi$ *f)*	ζ *g)*
nm		$L.mol^{-1}.cm^{-1}$	GM	$L.mol^{-1}.cm^{-1}$	GM	mV
36	$4\ 10^4$	$9\ 10^8$	$8\ 10^6$	$6\ 10^7$	$5.5\ 10^5$	-40

a) Diamètre « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique. *b)* Nombre de chromophores constituant une nanoparticule estimé avec la densité du cristal. *c)* Coefficient d'extinction molaire des FONs. *d)* Section efficace d'absorption à deux photons des FONs mesurée à $\lambda_{2PA}{}^{max}$ (1 GM = 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$). *e)* Brillance des FONs. *f)* Brillance à deux photons des FONs. *g)* Potentiel zêta des FONs.

Il est important de souligner que la détermination du nombre de chromophores constituant une nanoparticule n'est pas une valeur absolue ; puisque pour déterminer N, plusieurs hypothèses sont faites : taille des nanoparticules homogène et densité des FONs semblable à la densité dans le cristal. Pour cette raison, les valeurs des coefficients d'extinction molaire et de section efficace d'absorption à deux photons des FONs sont à relativiser avec les approximations induites par N.

4.4 Modification de la taille des FONs **D2**

La taille des nanoparticules est un paramètre important pour les propriétés photophysiques des FONs, mais aussi pour la bioimagerie. Le vivant n'est pas un milieu homogène, ainsi, selon le type d'observations, certains biologistes souhaitent avoir des FONs de très petites tailles (< 15 nm) ou bien des tailles plus grosses (>80 nm). Le contrôle de la taille est donc capital, celui-ci devient un véritable challenge compte tenu du mode de préparation des FONs.

Un paramètre intéressant pour faire varier la taille des FONs est la concentration de la solution mère. En effet, cette concentration est fixée par l'opérateur et est normalement facilement reproductible d'un opérateur à un autre. Une étude de variation de la concentration de la solution mère a donc été conduite en utilisant une gamme croissante de concentration (allant de 1 mM à 5 mM).

Les FONs **D2** ont été préparées de la même manière (décrite précédemment) avec pour seul changement, l'ajout d'une solution de concentration différente. Comme le montrent le tableau 5 et les figures 9 et 10, l'utilisation de solution mère de concentrations différentes, ne modifie pas la bande d'émission de fluorescence alors que la bande d'absorption devient légèrement plus large. Cette largeur inhomogène ainsi que l'apparition d'un début de diffusion de la bande d'absorption à C = 5 mM, prouvent que la concentration de la solution mère joue un rôle direct sur la taille des nanoparticules, mais n'affecte pas la structure interne des FONs.

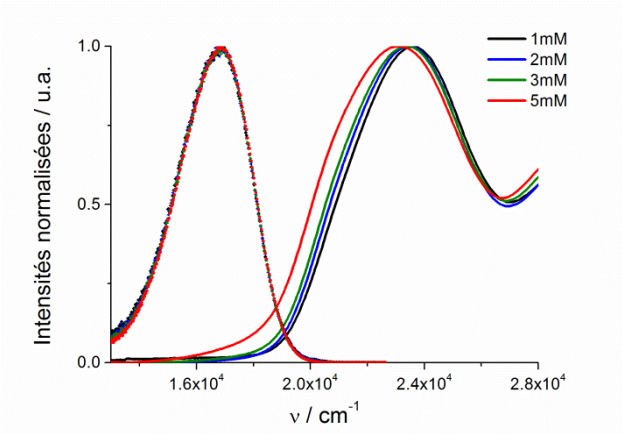


Figure 9. Influence de la concentration de la solution mère sur les propriétés optiques des FONs.

Cette augmentation de taille est validée par les mesures de DLS qui laissent clairement apparaître une tendance d'augmentation de taille avec la concentration.

Tableau 5. Influence de la concentration de la solution mère (S_m) sur les propriétés des FONs.

Concentration S_m mol.L^{-1}	λ_{abs}^{max} nm	FWHM *a)* cm^{-1}	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Φ_F *b)*	D_h *c)* nm
$1\ 10^{-3}$	422	$6.1\ 10^3$	597	0.07	60
$2\ 10^{-3}$	422	$6.5\ 10^3$	597	0.07	99
$3\ 10^{-3}$	422	$6.3\ 10^3$	597	0.07	115
$5\ 10^{-3}$	422	$6.7\ 10^3$	597	0.08	158

a) Largeur à mi-hauteur de l'absorption des FONs. b) Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 0.1 M. *c)* Diamètre hydraté des FONs.

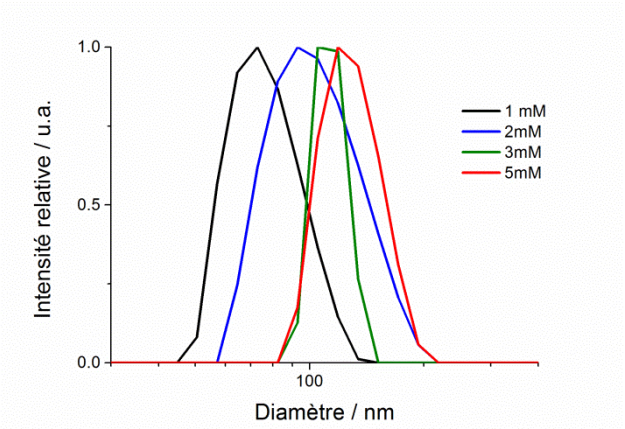


Figure 10. Distribution du D_h des FONs **D2** en fonction de la concentration de la solution mère.

4.5 Mesure de la stabilité colloïdale des FONs **D2**

La stabilité des FONs **D2** a été évaluée par mesure de l'évolution de l'absorption dans le temps. Comme expliqué au début de ce chapitre, la stabilité colloïdale des FONs est un critère important au vu de leur utilisation en milieu biologique, puisqu'une mauvaise stabilité peut au mieux affecter la mobilité des nanoparticules, au pire provoquer une occlusion mortelle. Le potentiel ζ des FONs **D2** (tableau 4) est assez négatif pour permettre une stabilité colloïdale correcte des FONs comme l'attestent les mesures d'absorption dans le temps (figure 11).

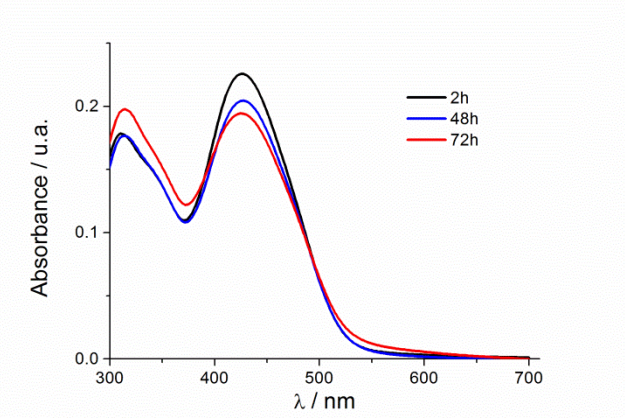
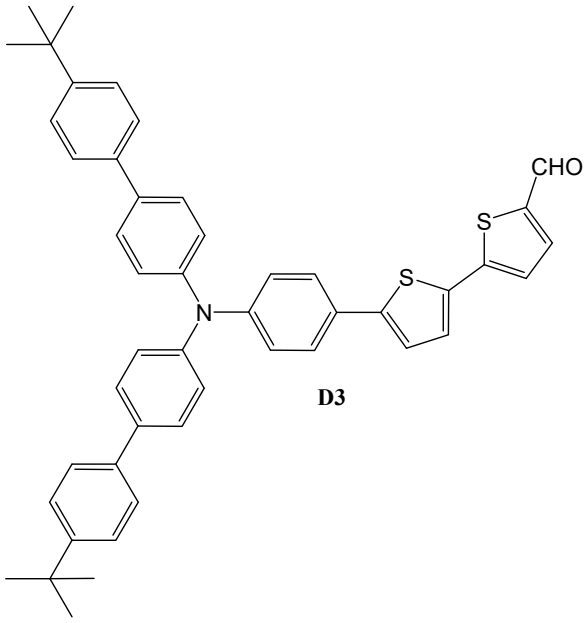


Figure 11. Évolution de la stabilité colloïdale des FONs **D2** suivie par absorption.

De façon très intéressante, les FONs **D2** présentent une meilleure stabilité colloïdale que les FONs **D1**. Il est possible d'expliquer cette augmentation de stabilité par des interactions plus fortes au sein des FONs **D2** qui structurent la surface de la nanoparticule et ralentissent les processus de réorganisation de surface qui peuvent affecter la stabilité.

5. Propriétés photophysiques des FONs D3 dans l'eau

Afin d'explorer la stabilité colloïdale des FONs, une version plus encombrée de **D2** a été synthétisée : **D3** (schéma 3). Cette molécule est identique à **D2**, à l'exception des motifs « ailettes », ajoutés sur les segments phényles dans le but d'augmenter l'encombrement stérique de la molécule et donc de défavoriser encore plus les interactions intermoléculaires antiparallèles.



D3

Schéma 3. Structure chimique de **D3**.

5.1 Absorption, émission et caractéristique des FONs **D3**

Puisque les phényles où sont mises les « ailettes » ne prennent pas franchement part au système π conjugué, les propriétés photophysiques en solution moléculaire sont pratiquement identiques à celles de **D2** (figure 12) excepté un léger décalage (tableau 6) des bandes d'absorption (Δ = +16 nm) et d'émission (Δ = -2 nm) certainement due à un renforcement du caractère donneur de la triphénylamine par les ailettes.

Tableau 6. Caractéristiques des FONs **D3** dans l'eau

D_{TEM} *a)* nm	N *b)*	λ_{abs} nm	ε^{438} *c)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{438}$ nm	Φ_F *d)*	$\varepsilon^{438}\Phi$ *e)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$	τ *f)* ns	ζ *g)* mV
40	$2.9\ 10^4$	438	$0.7\ 10^8$	595	0.05	$3.8\ 10^6$	0.9 (59%) 3.5 (41%)	-75

a) Diamètre « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique. *b)* Nombre de chromophores constituant une nanoparticule. *c)* Coefficient d'extinction molaire des FONs à λ_{abs} = 438 nm. *d)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 0.1M. *e)* Brillance des FONs à λ_{abs} = 438 nm. *f)* Temps de vie de fluorescence. *g)* Potentiel zeta des FONs.

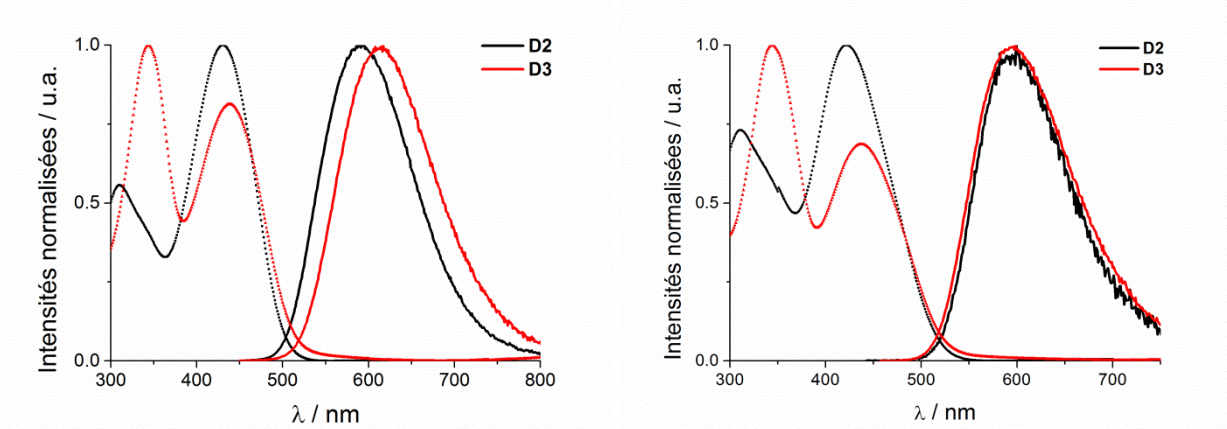


Figure 12. Absorption et émission de **D2** et **D3** dans le chloroforme (gauche) et sous forme de FONs dans l'eau (droite).

Curieusement, les propriétés d'absorption et d'émission des FONs D3 sont quasi identiques à D2 (Figure 12). Ce qui indique que l'introduction des motifs ailettes n'impacte pas la conformation des chromophores.

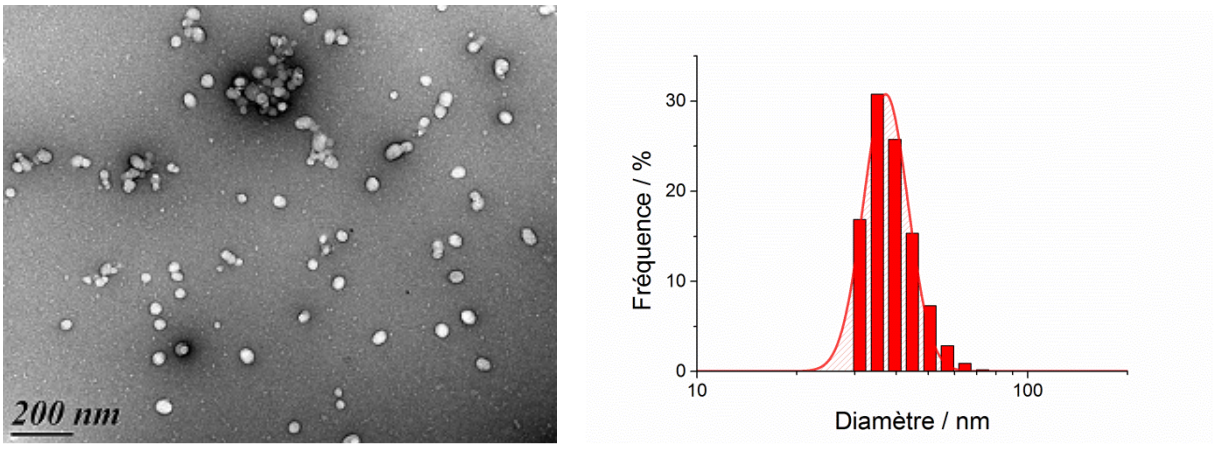


Figure 13. Image TEM (gauche) et DLS (droite) des FONs **D3** dans l'eau.

La taille des FONs **D3** est assez proche des FONs **D2** puisque les mesures de taille via l'exploitation des clichés de microscopie électronique permettent d'estimer le diamètre des

FONs **D3** à 40 nm, ce qui confirme les mesures de DLS donnant un diamètre moyen de 37 nm (figure 13).

5.2 Mesure de la stabilité des FONs **D3**

Bien que les caractéristiques des FONs **D2** et **D3** soient similaires, la stabilité colloïdale est très différente. Les FONs **D3** présentent une exceptionnelle stabilité colloïdale pour des nanoparticules purement organiques. En effet, 11 mois après leur préparation, ces nanoparticules ont une absorption très proche de celle mesurée juste après leur formation (figure 14).

Cette stabilité colloïdale est une conséquence directe de la valeur du potentiel de surface des FONs **D3** qui est très négative (ζ = -75mV). L'absence de signe évident d'agrégation et le maintien de l'absorption sur une période de temps aussi longue montrent que la surface des FONs **D3** est différente de celle de **D2** et **D1**.

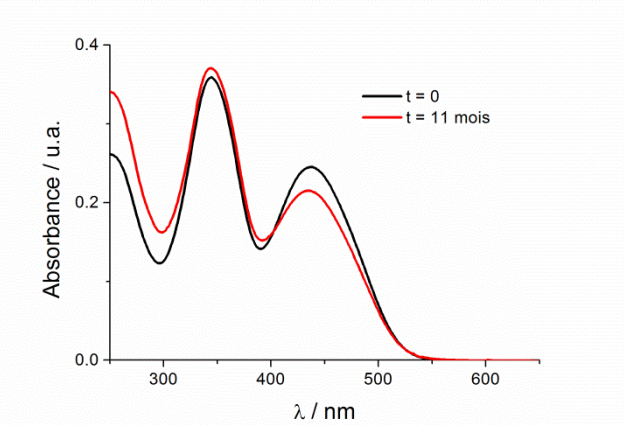


Figure 14. Évolution de l'absorption des FONs **D3** 11 mois après leur préparation.

Les différences de stabilité entre les FONs **D1-D3** ainsi que le déplacement bathochrome des bandes d'absorption et d'émission des FONs **D2** montrent que de légères modifications structurelles, tel que l'élongation du système π conjugué ou bien l'ajout de groupements encombrants affectent de façon significative les propriétés des FONs.

Afin de mieux comprendre les processus pouvant intervenir à la surface des FONs, l'organisation des chromophores à la surface des nanoparticules a été évaluée grâce à la diffusion de second harmonique (SHS).

Références bibliographiques

[1] Faucon, A.; Lenk, R.; Hemez, J.; Gautron, E.; Jacquemin, D.; Le, Q. J.-Y.; Graton, J.; Brosseau, A.; Ishow, E., Fluorescent carboxylic and phosphonic acids: comparative photophysics from solution to organic nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013,** *15*, 12748-12756.

[2] Ishow, E.; Brosseau, A.; Clavier, G.; Nakatani, K.; Tauc, P.; Fiorini-Debuisschert, C.; Neveu, S.; Sandre, O.; Leaustic, A., Multicolor Emission of Small Molecule-Based Amorphous Thin Films and Nanoparticles with a Single Excitation Wavelength. *Chem. Mater.* **2008,** *20*, 6597-6599.

[3] Parthasarathy, V.; Fery-Forgues, S.; Campioli, E.; Recher, G.; Terenziani, F.; Blanchard-Desce, M., Dipolar versus Octupolar Triphenylamine-Based Fluorescent Organic Nanoparticles as Brilliant One- and Two-Photon Emitters for (Bio)imaging. *Small* **2011,** *7*, 3219-3229.

[4] Campioli, E.; Rouxel, C.; Campanini, M.; Nasi, L.; Blanchard-Desce, M.; Terenziani, F., Enforcing Luminescence at Organic Nanointerfaces: Luminescence Spatial Confinement and Amplification in Molecular-Based Core-Shell Nanoparticles. *Small* **2013,** *9*, 1982-1988.

[5] Blanchard-Desce, M.; Bloy, V.; Lehn, J.-M.; Runser, C.; Barzoukas, M.; Fort, A.; Zyss, J., Push-pull polyenes and carotenoids with enhanced quadratic nonlinear optical susceptibilities. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1994,** *2143*, 20-9.

[6] Park, G.; Ra, C. S.; Cho, B. R., Amine donors in nonlinear optical molecules: Methyl and phenyl substitution effects on the first hyperpolarizability. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003,** *24*, 1671-1674.

[7] Tao, T.; Ma, B.-B.; Peng, Y.-X.; Wang, X.-X.; Huang, W.; You, X.-Z., Asymmetrical/Symmetrical D-π-A/D-π-D Thiazole-Containing Aromatic Heterocyclic Fluorescent Compounds Having the Same Triphenylamino Chromophores. *J. Org. Chem.* **2013,** *78*, 8669-8679.

[8] Yan, P.; Xie, A.; Wei, M.; Loew, L. M., Amino(oligo)thiophene-Based Environmentally Sensitive Biomembrane Chromophores. *J. Org. Chem.* **2008,** *73*, 6587-6594.

[9] Kim, O.-K.; Fort, A.; Barzoukas, M.; Blanchard-Desce, M.; Lehn, J.-M., Nonlinear optical chromophores containing dithienothiophene as a new type of electron relay. *J. Mater. Chem.* **1999,** *9*, 2227-2232.

[10] Ledoux, I.; Zyss, J.; Barni, E.; Barolo, C.; Diulgheroff, N.; Quagliotto, P.; Viscardi, G., Properties of novel azo dyes containing powerful acceptor groups and thiophene moiety. *Synth. Met.* **2000,** *115*, 213-217.

[11] Raimundo, J.-M.; Blanchard, P.; Gallego-Planas, N.; Mercier, N.; Ledoux-Rak, I.; Hierle, R.; Roncali, J., Design and synthesis of push-pull chromophores for second-order nonlinear optics derived from rigidified thiophene-based π-conjugating spacers. *J. Org. Chem.* **2002,** *67*, 205-218.

[12] Ripaud, E.; Olivier, Y.; Leriche, P.; Cornil, J.; Roncali, J., Polarizability and Internal Charge Transfer in Thiophene-Triphenylamine Hybrid π-Conjugated Systems. *J. Phys. Chem. B* **2011,** *115*, 9379-9386.

[13] Blanchard-Desce, M.; Wortmann, R.; Lebus, S.; Lehn, J.-M.; Kraemer, P., Intramolecular charge transfer in elongated donor-acceptor conjugated polyenes. *Chem. Phys. Lett.* **1995,** *243*, 526-32.

[14] Marder, S. R.; Cheng, L. T.; Tiemann, B. G.; Friedli, A. C.; Blanchard-Desce, M.; Perry, J. W.; Skindhoej, J., Large first hyperpolarizabilities in push-pull polyenes by tuning of the bond length alternation and aromaticity. *Science (Washington, D. C., 1883-)* **1994,** *263*, 511-14.

[15] Melucci, M.; Barbarella, G., Microwave assisted synthesis of functional oligothiophenes. *Targets Heterocycl. Syst.* **2008,** *12*, 460-485.

[16] Meng, H.; Zheng, J.; Lovinger, A. J.; Wang, B.-C.; Van Patten, P. G.; Bao, Z., Oligofluorene-Thiophene Derivatives as High-Performance Semiconductors for Organic Thin Film Transistors. *Chem. Mater.* **2003,** *15*, 1778-1787.

[17] Xiao, K.; Liu, Y.; Qi, T.; Zhang, W.; Wang, F.; Gao, J.; Qiu, W.; Ma, Y.; Cui, G.; Chen, S.; Zhan, X.; Yu, G.; Qin, J.; Hu, W.; Zhu, D., A Highly π-Stacked Organic Semiconductor for Field-Effect Transistors Based on Linearly Condensed Pentathienoacene. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127*, 13281-13286.

[18] Usta, H.; Lu, G.; Facchetti, A.; Marks, T. J., Dithienosilole- and Dibenzosilole-Thiophene Copolymers as Semiconductors for Organic Thin-Film Transistors. *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 9034-9035.

[19] Murphy, A. R.; Frechet, J. M. J., Organic Semiconducting Oligomers for Use in Thin Film Transistors. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007,** *107*, 1066-1096.

[20] Ong, B. S.; Wu, Y.; Li, Y.; Liu, P.; Pan, H., Thiophene polymer semiconductors for organic thin-film transistors. *Chem. - Eur. J.* **2008,** *14*, 4766-4778.

[21] Alesi, S.; Di, M. F.; Melucci, M.; Macquarrie, D. J.; Luque, R.; Barbarella, G., Microwave-assisted synthesis of oligothiophene semiconductors in aqueous media using silica and chitosan supported Pd catalysts. *Green Chem.* **2008,** *10*, 517-523.

[22] Davydov, A. S., THE THEORY OF MOLECULAR EXCITONS. *Soviet Physics Uspekhi* **1964,** *7*, 145.

[23] Kasha, M.; Rawls, H. R.; El-Bayoumi, M. A., Exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **1965,** *11*, 371-92.

[24] Horn, D.; Rieger, J., Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. *Angewandte Chemie International Edition* **2001,** *40*, 4330-4361.

[25] Masuhara, H.; Nakanishi, H.; Sasaki, K.; Editors, *Single Organic Nanoparticles*. Springer-Verlag2003; p 402 pp.

[26] Shu, C.-F.; Tsai, W.-J.; Jen, A. K. Y., A new synthetic approach for nonlinear optical chromophores possessing enhanced thermal stability. *Tetrahedron Lett.* **1996,** *37*, 7055-7058.

[27] Barzoukas, M.; Blanchard-Desce, M., Molecular engineering of push-pull chromophores. *Adv. Multi-Photon Processes Spectrosc.* **2001,** *13*, 261-337.

[28] Wiederschain, G. Y., *The Molecular Probes handbook. À guide to fluorescent probes and labeling technologies*. MAIK Nauka/Interperiodica2011; Vol. 76, p 1276.

[29] Ren, Y.; Szablewski, M.; Cross, G. H., Waveguide photodegradation of nonlinear optical organic chromophores in polymeric films. *Appl. Opt.* **2000,** *39*, 2499-2506.

[30] Lockwood, S. F.; O'Malley, S.; Watumull, D. G.; Hix, L. M.; Jackson, H.; Nadolski, G. Carotenoid ether analogs or derivatives for the inhibition and amelioration of diseases associated with reactive radical species. US20050009758A1, 2005.

[31] Foss, B. J.; Nadolski, G.; Lockwood, S. F., Hydrophilic carotenoid amphiphiles: methods of synthesis and biological applications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006,** *6*, 953-969.

Chapitre III – Explorer la surface des nanoparticules par diffusion de second harmonique

Chapitre III – Explorer la surface des nanoparticules par diffusion de second harmonique

1. Introduction

1.1 L'optique non linéaire

L'optique non linéaire est un domaine où les phénomènes optiques ne suivent plus de lois linéaires. Ainsi, lorsque l'on applique un champ électrique (E) à une molécule, dans l'optique dite classique (linéaire), le moment dipolaire (μ) de la molécule résultant dépend du moment dipolaire initial (μ_0) et de la polarisabilité (α) de la molécule selon l'équation 1.

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 + \alpha\vec{E}$$

Équation 1. Réponse linéaire du moment dipolaire d'une molécule soumise à un champ électrique E.

Cependant, lorsque l'on irradie cette molécule avec une intensité très forte (*via* un laser), de nouveaux tenseurs du second et du troisième ordre apparaissent dans l'équation 1, entraînant une perte de la dépendance linéaire du moment dipolaire au champ appliqué. Ces deux nouveaux termes sont : la première hyperpolarisabilité (β) et la seconde hyperpolarisabilité (γ). Le moment dipolaire de la molécule s'écrit alors selon l'équation 2.[1, 2]

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 + \alpha\vec{E} + \beta\vec{E}\vec{E} + \gamma\vec{E}\vec{E}\vec{E}$$

Équation 2. Réponse non linéaire du moment dipolaire d'une molécule soumise à un champ électrique E intense.

Au regard de l'équation 2, on remarque que β et γ sont très sensibles au champ électrique E, ainsi de très faibles variations de β ou de γ vont induire de profondes modifications de la réponse globale de la molécule. Cette hypersensibilité de la réponse moléculaire aux champs électriques est exploitée dans les expériences de diffusion de second harmonique (SHS) afin de donner des indications sur l'environnement dans lequel évolue une molécule possédant un β non nul.

D’une façon simple, la génération de second harmonique (aussi appelé doublement de fréquence) correspond à l’union de deux photons de même énergie pour former un photon dont l’énergie est double lorsque ceux-ci traversent un matériau possédant une hyperpolarisabilité (β) non nulle (illustration 1).

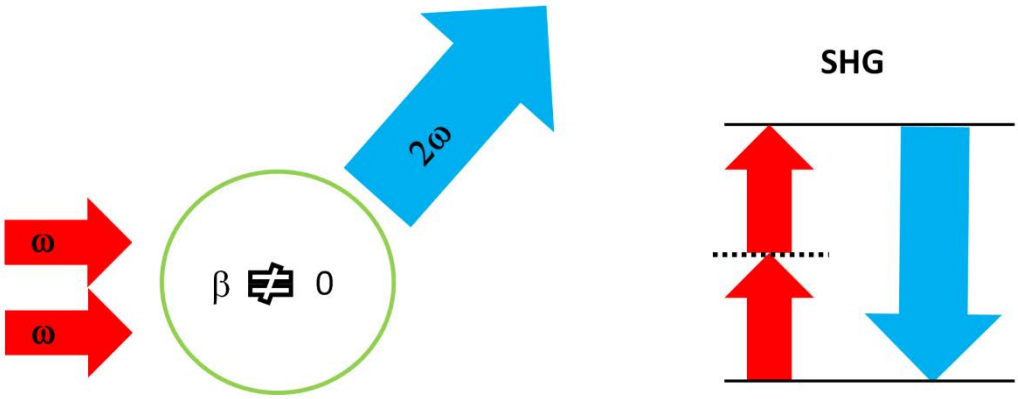


Illustration 1. Représentation de la génération de second harmonique dans un système non-centrosymétrique.

La génération de second harmonique est un outil très puissant qui n’est pas réservé aux molécules, elle s’applique à n’importe quel système non centrosymétrique. Cette restriction de symétrie est due au fait que les objets centrosymétriques possèdent une hyperpolarisabilité nulle ($\beta = 0$) et sont donc inactifs aux phénomènes d’ONL du second ordre tel que la SHG.

La SHG est utilisée en imagerie biologique (figure 1) puisqu’elle ne nécessite pas l’emploi de sondes particulières et la visualisation de membranes,[3] de fibres musculaires[4-6] ou de collagène[7-9] (qui sont de par leur forme des objets non centrosymétriques) est possible avec une excellente précision.

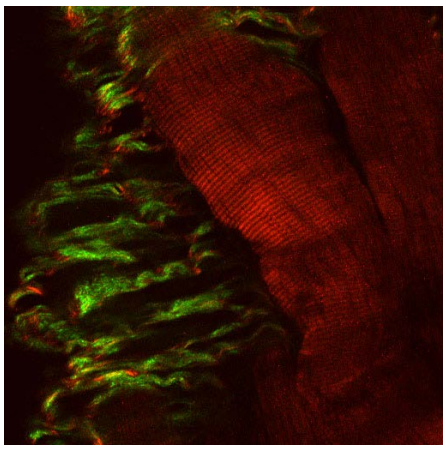


Figure 1. Imagerie par SHG de collagène et de myosine à la surface d’un muscle (λ_{ex} = 860 nm).[10]

1.2 La mesure de l'hyperpolarisabilité β

L'avènement des premiers lasers rubis dans les années 1960 a permis de nombreuses découvertes en optique non linéaire (ONL). Par exemple, la vérification expérimentale du phénomène d'absorption à deux photons,[11, 12] mais aussi la génération de second harmonique dans des cristaux de quartz,[2] de phosphate de potassium[13] et d'autres composés inorganiques.[12, 14]

Suite aux travaux de Bloembergen, Pershan[15] et de Bersohn,[16] la détermination de l'hyperpolarisabilité β devient possible par l'étude de la diffusion des harmoniques aussi appelée diffusion Rayleigh de Second Harmonique.

L'étude de la génération de second harmonique a rapidement été étendue aux cristaux à base de molécules organiques simples comme l'hexamine,[17] des dérivés aromatiques[18-20] ou bien des acides aminés.[21] Cet intérêt pour des matériaux organiques actifs en ONL est motivé par les variations quasi infinies de structures moléculaires. Très rapidement, les molécules aromatiques[19, 22-25] ont été identifiées comme étant de bons générateurs de second harmonique.

Afin d'optimiser l'activité ONL des molécules, des relations propriétés ONL-structure chimique ont été établies.[26-31] Ces études ont montré que le transfert de charge au sein de la molécule,[32] ainsi que l'alternance[33, 34] entre liaison double et liaison simple permettent d'obtenir des molécules avec de fortes hyperpolarisabilités.

Alors que les mesures de β étaient réservées à l'état solide, des techniques de détermination de β en solution ont commencé à émerger dans les années 1980. Citons par exemple l'EFISHG[35] et l'hyper-Rayleigh en solution.[1] Cette arrivée tardive des mesures en solution vient du fait qu'il n'est pas possible de mesurer directement la valeur de β en solution, à cause de l'orientation statistique des molécules en solution qui moyenne et annule l'hyperpolarisabilité globale de la solution.

L'EFISHG (Electric Field Induced Second Harmonic Generation) est une technique qui permet simplement de briser la symétrie de la solution, en orientant les molécules *via* l'application d'un champ électrique. L'inconvénient de cette technique est qu'il est nécessaire

de connaître les valeurs du moment dipolaire μ et de la seconde hyperpolarisabilité γ afin de pouvoir extraire la valeur de la première hyperpolarisabilité β.[1]

Une alternative plus simple à l'EFISHG est l'utilisation de la diffusion hyper-Rayleigh. Cette technique, présente l'avantage d'utiliser le solvant comme une référence interne (équation 3), permettant ainsi de déterminer la première hyperpolarisabilité du soluté avec une grande précision, sans nécessiter la connaissance du moment dipolaire de la molécule solvatée. Cette technique a rapidement émergé comme étant une technique de choix pour étudier les activités ONL de second ordre de molécules en solution[22, 32, 36-43] ou bien de colloïdes métalliques[44-48] en suspension dans l'eau.

2. Calcul de l'hyperpolarisabilité β

Comme le montre le schéma 1,[49] les expériences de génération de second harmonique utilisent un laser émettant dans l'infrarouge ($\lambda^{cohérent}$ = 1064 nm) qui traverse un jeu de polariseurs rotatifs (λ/2 et λ/4), puis le signal SHG résultant ($\lambda_{SH}^{incohérent}$ = 532 nm) est collecté à 90° par un capteur CCD.

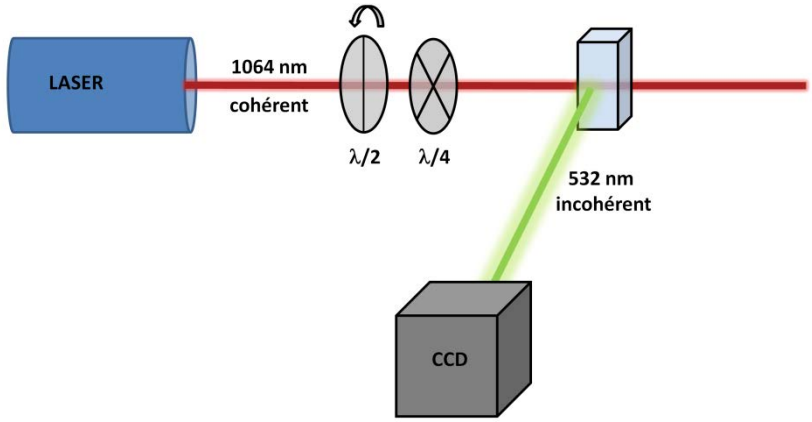


Schéma 1. Illustration du montage expérimental pour les mesures HRS.[49]

L'utilisation de la diffusion de second harmonique (SHS ou HRS) permet de déterminer la valeur de β_{HRS} pour un système donné et donc de déterminer la sensibilité électrique de ce système aux hautes intensités. Dans un souci de clarté, le calcul de la valeur de β_{HRS} à partir du jeu de données expérimentales est détaillé dans les équations 3 à 10.
D'un point de vue général, l'intensité de la diffusion (incohérente) de second harmonique pour une solution moléculaire s'exprime ainsi :

$$I_{\Psi V}^{2\omega} = G \times \left[C_s \times \left\{\left|\beta_{J=1}\right|^2 \times C_{\Psi V}^{Incoh.}\right\}_s + C_m \times \left\{\left|\beta_{J=1}\right|^2 \times C_{\Psi V}^{Incoh.}\right\}_m\right] \times (I^{\omega})^2 \times 10^{-A_{2\omega}}$$

Équation 3. Calcul de l'hyperpolarisabilité moléculaire $\beta_{J=1}$.

Avec $I^{2\omega}$ l'intensité diffusée selon les plans de polarisation ΨV, G un facteur de correction lié à l'appareillage, C la concentration en solvant (C_s) ou en molécule (C_m), β la valeur de l'hyperpolarisabilité du solvant (β_s) ou de la molécule (β_m) et $C_{\Psi V}$ est une moyenne orientationnelle des composantes sphériques moléculaires de l'hyperpolarisabilité. La valeur I^{ω} correspond à la puissance incidente et le terme $10^{-A2\omega}$ permet de prendre en compte l'absorption de la molécule à la longueur d'onde correspondant à 2ω. Certaines valeurs sont connues (C_s, β_S, $C_{\Psi Vs}$ et $10^{-A2\omega}$) alors que d'autres valeurs sont fixées par l'expérimentateur (I^{ω} et C_m). Ceci permet de simplifier l'équation comme ceci :

$$I_{\Psi V}^{2\omega} = (I^{\omega})^2 \times \left[S + C_m \times \left\{\left|\beta_{J=1}\right|^2 \times C_{\Psi V}^{Incoh.}\right\}_m\right] \times 10^{-A_{2\omega}}$$

Ce qui donne si l'on considère les plans de polarisation suivant VV :

$$I_{VV}^{2\omega} = (I^{\omega})^2 \times \left[S + C_m \times \left\{\left|\beta_{J=1}\right|^2 \times C_{VV}\right\}_m\right] \times 10^{-A_{2\omega}}$$

Équation 4. Calcul de l'hyperpolarisabilité moléculaire $\beta_{J=1}$ simplifié.

Le fait de passer les plans de polarisation en position vertical-vertical (VV) est très important, puisque dans cette configuration, le signal dipolaire est maximal et d'après le comportement de **D2** et **D3** en solution, la composante dipolaire $\beta_{J=1}$ est attendue pour être très forte. De cette façon, en mesurant l'évolution de l'intensité $I^{2\omega}$ en faisant varier I^{ω} par l'utilisation de la même solution (tous les autres paramètres étant fixes), on détermine la valeur de $|\beta_{J=1}|^2 C_{VV}$ pour la molécule.

La seconde étape expérimentale est la mesure de la variation de l'intensité du signal hyper Rayleigh en fonction de l'orientation des plans de polarisation ΨV à 360 ° (de +VV à +VV). Cette expérience permet de déterminer le paramètre d'anisotropie non linéaire ρ selon l'équation 5. L'intérêt de travailler selon plusieurs plans de polarisation concerne les composantes quadripolaires non locales qui ne peuvent être sondées qu'aux angles 45°

modulo 90°. Ainsi en régime statique (0° et 90°), certaines informations très importantes ne peuvent être extraites des données.

$$C_{\Psi V}(i) = \left[\left(\frac{9}{45} + \frac{6}{105}\rho^2(i)\right) + \left(-\frac{20}{45} + \frac{10}{105}\rho^2(i)\right) \times cos^2(\Psi) + \left(\frac{12}{45} - \frac{12}{105}\rho^2(i)\right) \times cos^4(\Psi)\right]$$

Équation 5. Calcul de ρ à partir des scans en polarisations.

Ce facteur d'anisotropie correspond aux contributions relatives entre les composantes dipolaires ($\beta_{J=1}$) et octupolaires ($\beta_{J=3}$) selon la relation suivante :

$$\rho = \left(\frac{\beta_{J=3}}{\beta_{J=1}}\right)$$

Équation 6. Expression mathématique du facteur d'anisotropie non linéaire.

À partir de ce paramètre, le taux de dépolarisation (DR) peut être calculé selon l'équation 7. La valeur de DR se situe entre 3/2 et 9, et permet de déterminer quelle contribution est la majoritaire : si la valeur de DR se situe vers 9, la contribution dipolaire est majoritaire, si au contraire la valeur se situe vers 3/2, la contribution majoritaire est octupolaire.

$$DR = \frac{63 + 18\rho^2}{7 + 12\rho^2}$$

Équation 7. Calcul du taux de dépolarisation DR.

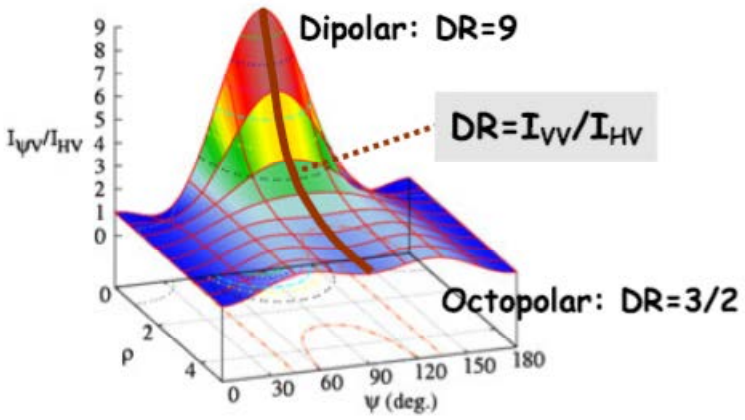


Figure 2. Dépendance du taux de dépolarisation (DR) aux paramètres ρ et Ψ.[49]

D'après l'équation 5, il apparaît clairement que pour une valeur de $\Psi = 90°$ (vertical), les parties en $\cos^2(\Psi)$ et $\cos^4(\Psi)$ s'annulent, ce qui permet de simplifier l'équation comme suit :

$$C_{VV} = \frac{1}{5} + \frac{2}{35}\rho^2$$

Équation 8. Calcul de C_{VV} à partir de ρ.

Précédemment (équation 4), les scans en intensité ont permis de déterminer la valeur de $|\beta_{J=1}|^2 C_{VV}$. Donc en utilisant la valeur de C_{VV} calculée dans l'équation 8, il est possible de déterminer la valeur de $\beta_{J=1}$ (équation 9) :

$$\beta_{J=1} = \sqrt{\frac{\left|\beta_{J=1}\right|^2 \times C_{VV}}{C_{VV}}}$$

Équation 9. Calcul de $\beta_{J=1}$.

Une fois la valeur de $\beta_{J=1}$ obtenue, la composante octupolaire $\beta_{J=3}$ est simplement calculée à partir de l'équation 6.

Enfin, la valeur du β_{HRS} peut être extraite selon les valeurs de $\beta_{J=1}$ et de ρ d'après l'équation suivante :

$$\beta_{HRS} = \beta_{J=1} \times \sqrt{\frac{2}{3} \times \left(\frac{1}{3} + \frac{\rho^2}{7}\right)}$$

Équation 10. Détermination du β_{HRS}.

La détermination de cette valeur β_{HRS} va permettre de comparer les différences de champs électriques autour de la surface des FONs. En effet, les résultats fournis par la comparaison entre les propriétés photophysiques des FONs **D1**, **D2** et **D3** semblent indiquer que les interactions à la surface des nanoparticules varient avec la structure moléculaire. Dans le but de comprendre comment les chromophores dipolaires s'agencent à la surface des FONs et de quelle façon cet arrangement affecte la stabilité colloïdale des FONs, des mesures de l'hyperpolarisabilité des chromophores **D2** et **D3** ont été effectuées.

Les mesures de solvatochromie de **D1** et **D2** ont mis en évidence le bon caractère dipolaire de ces molécules. Du fait de ce transfert de charge, des valeurs relativement importantes d'hyperpolarisabilité sont attendues et si cette hypothèse est validée, les mesures de SHS devraient permettre de détecter d'infimes modifications de la polarisation de la molécule du fait d'interactions intermoléculaires particulières.

Dans cette étude, le dipôle **D1** n'est pas utilisé pour comparer les effets de surface avec **D2** et **D3**. Ce choix s'explique simplement par le fait que les mesures de SHS sont des mesures relativement longues (> 1h) et puisque les FONs **D1** n'ont pas une stabilité colloïdale suffisante (figure 1 Chapitre II), il est impossible d'envisager une cohérence des mesures pendant la durée de l'expérience.

3. Mesure de l'hyperpolarisabilité β_{HRS} des dipôles D2 et D3 en solution

Avant d'étudier les nanoparticules, qui sont des systèmes très complexes, il est primordial de déterminer en amont les valeurs de β_{HRS} pour les chromophores **D2** et **D3** en solution dans un solvant organique. Dans ce but, des solutions de **D2** et **D3** dans le chloroforme et l'acétonitrile (pour **D2**) sont préparées à différentes concentrations, ce qui permet d'effectuer les scans en puissance, mais aussi sert de référence interne.

En effet, tout comme lors des mesures de TPEF, il est essentiel de vérifier la dépendance quadratique de la réponse HRS puisque des phénomènes d'absorption à un et deux photons peuvent fausser les valeurs obtenues et entraîner une surestimation de la valeur de β_{HRS}.

Les données de l'hyperpolarisabilité des FONs **D2** et **D3** dans le chloroforme sont rassemblées dans le tableau 1, et il apparaît que d'après les valeurs de DR dans le chloroforme, **D3** est légèrement plus dipolaire que **D2**.

Tableau 1. Données d'hyperpolarisabilités des molécules **D2** et **D3** en solution.

	D2 / chloroforme	**D2** / acétonitrile	**D3** / chloroforme
$\lvert\beta_{J=1}\rvert^2 C_{VV}^{incoh}$ (u.a.) [a)]	$124\ 10^6$	$145\ 10^6$	$172\ 10^6$
β_{HRS} (u.a.) [a)]	$12.5\ 10^3$	$13.3\ 10^3$	$14.6\ 10^3$
DR	3.6	4.6	4.1
ρ	1.22	0.91	1.05
$\beta_{J=1}$ (u.a.) [a)]	$20.7\ 10^3$	$24.2\ 10^3$	$25.6\ 10^3$
$\beta_{J=3}$ (u.a.) [a)]	$25.3\ 10^3$	$22.0\ 10^3$	$26.9\ 10^3$

a) Unité atomique (u.a.) de $\beta = 3.62\ 10^{-42}\ m^4V^{-1} = 8.641\ 10^{-33}$ esu.

Cette différence de caractère dipolaire peut s'expliquer par la présence des phényles des ailettes qui amplifient légèrement le caractère donneur de la triphénylamine et donc augmentent le transfert de charge (et donc le caractère dipolaire) de **D3**. Cette mesure est tout à fait cohérente avec les données d'absorption et d'émission mesurées précédemment dans le chloroforme (chapitre II). La conséquence de cette augmentation du caractère dipolaire de **D3** induit mécaniquement une valeur de β_{HRS} supérieure pour **D3** (équation 10).

Les réponses HRS de **D2** dans le chloroforme et dans l'acétonitrile, selon le scan en intensité et en Ψ sont représentées dans les figures 3a et 3b.

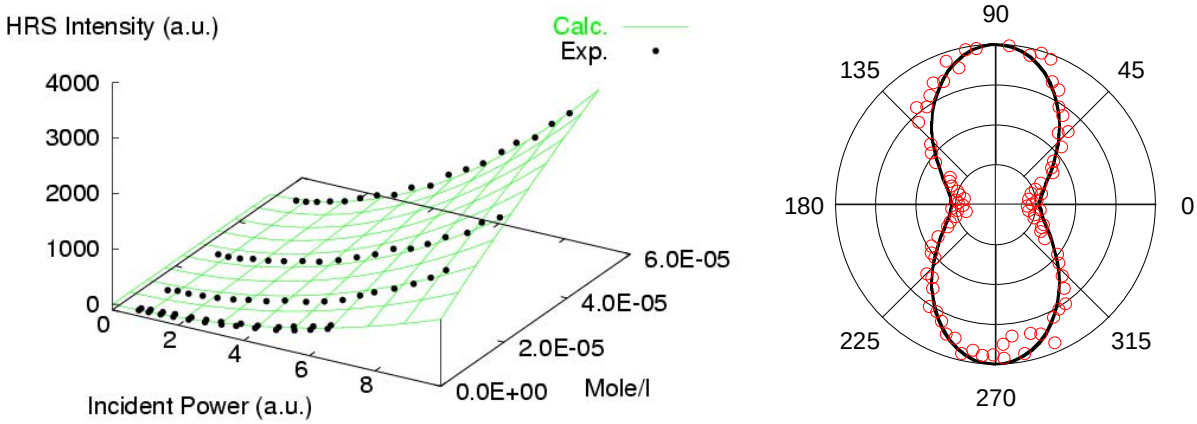


Figure 3a. Scan en puissance (gauche) et en Ψ (droite) de D2 dans le chloroforme.

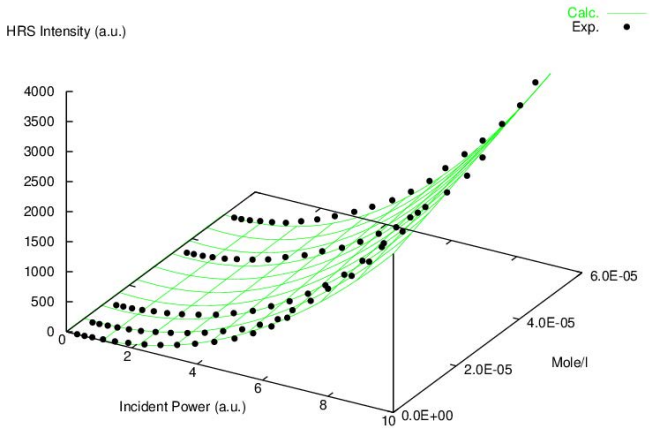


Figure 3b. Scan en puissance de **D2** dans l'acétonitrile.

Il est intéressant de remarquer que, comme les mesures de solvatochromisme l'ont démontré (figure 2 Chapitre II), la molécule **D2** présente un caractère dipolaire plus marqué lorsqu'elle est solvatée par de l'acétonitrile que par du chloroforme. Il est même remarquable de noter l'inversion des contributions, puisque dans le chloroforme, la contribution octupolaire est majoritaire alors que dans l'acétonitrile, la composante majoritaire est la composante dipolaire. Ceci indique que dans l'acétonitrile, la planéité de la molécule est plus importante.

Ces résultats montrent que les changements du champ électrique local autour des dipôles **D2** peuvent être détectés avec une excellente précision ; de plus il est possible de mesurer les effets de ces changements de champ sur les molécules.

4. Mesures de l'hyperpolarisabilité β_{HRS} des FONs D2 et D3 dans l'eau

D'après la structure chimique des chromophores **D2** (schéma 2 chapitre II) et **D3** (schéma 3 chapitre II), la présence d'une partie hydrophobe (motif triphénylamine) et d'un motif plus hydrophile (motif aldéhyde) laisse entrevoir la possibilité d'interactions spécifiques dans les nanoparticules. Ces interactions hydrophobes/hydrophiles ainsi que la présence d'un moment dipolaire important sont en effet attendues pour structurer la surface des nanoparticules selon un empilement de type H, comme illustré sur l'illustration 2.

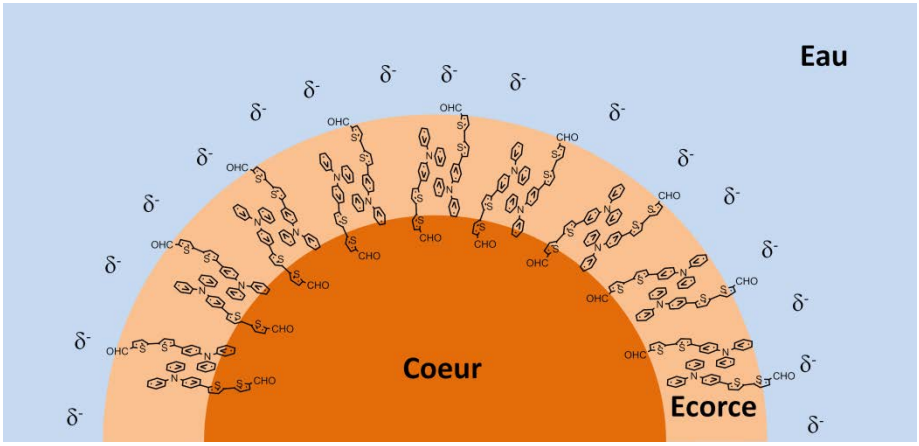


Illustration 2. Illustration de la surface des FONs **D2**.

Cette structuration spécifique des dipôles à l'interface doit majorer la contribution dipolaire à la surface des FONs, puisque l'alignement des dipôles devrait induire un moment dipolaire à la surface des nanoparticules bien plus important. Le cœur des nanoparticules doit être un milieu assez roche du cristal, puisque l'émission de fluorescence des FONs **D2** et **D3** démontre la présence d'un environnement de polarisabilité moyenne de type chloroforme proche de l'émission du solide microcristallin (pour **D2**).

La morphologie des FONs ayant été déterminée comme étant de nature sphérique, le cœur des nanoparticules peut être considéré comme un objet centrosymétrique où les réponses dipolaires s'annulent et donc la contribution majoritaire du cœur devrait être une contribution de type quadripolaire. La réponse globale des nanoparticules peut s'écrire sous la forme :

$$\beta = \beta^{Interface} + \beta^{Coeur}$$

Équation 11. Décomposition de l'hyperpolarisabilité des FONs.

Les scans en polarisations (figure 4) des solutions aqueuses de FONs montrent en effet que la réponse des nanoparticules est bien différente de la réponse des molécules en solution. Alors que les scans en polarisation des solutions moléculaires des dipôles présentaient deux lobes caractéristiques de contributions purement dipolaires, les scans en polarisation des FONs montrent l'apparition de faibles contributions quadripolaires non locales.

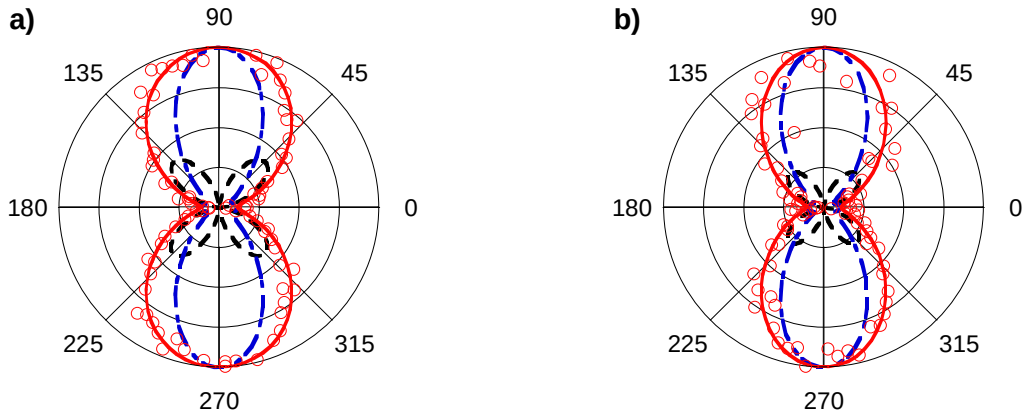


Figure 4. Scans en polarisations des nanoparticules **D2** (gauche) et **D3** (droite) dans l'eau. En rouge la réponse globale, en bleu la réponse dipolaire et en noir la réponse quadripolaire.

Ces mesures en polarisation ainsi que les valeurs d'hyperpolarisabilité des FONs (tableau 2) sont en adéquation avec l'hypothèse formulée plus haut, à savoir une surface très organisée avec une contribution dipolaire quasi exclusive (les valeurs de DR se situent aux alentours de 8-9).

Tableau 2. Données d'hyperpolarisabilités des FONs **D2** et **D3** en solution aqueuse.

	D2	**D3**
$\|\beta\|^2 C_{VV}^{Coh}$ (u.a.) *a)*	$120\ 10^{12}$	$38\ 10^{12}$
β (u.a.) *a)*	$3.7\ 10^{6}$	$2.5\ 10^{6}$
DR	8.7 (± 0.9)	9.2 (± 1.8)
Δ^{Q} (u.a.) *a)*	14.1	11.2

a) Unité atomique (u.a.) de $\beta = 3.62\ 10^{-42}\ m^4V^{-1} = 8.641\ 10^{-33}$ esu.

Les valeurs de première hyperpolarisabilité β des FONs **D2** et **D3** sont deux à trois ordres de grandeurs inférieures aux β de nanoparticules ferroélectriques de $BaTiO_3$ et $PbTiO_3$ de tailles comparables. A l'inverse, les valeurs de β par nanoparticule sont deux ordres de grandeurs supérieures au β de petites nanoparticules (D~10 nm) anti-ferroélectriques de $NaNbO_3$ ($166\ 10^{-30}$ esu).[50]

La valeur d'hyperpolarisabilité β est plus élevée dans le cas des FONs **D2** que pour les FONs **D3** ; cette différence est très intéressante, puisqu'en solution dans le chloroforme, la tendance est inversée (tableau 1). Ceci pourrait indiquer que la surface des nanoparticules est moins bien structurée/compacte dans le cas des FONs **D3** que pour les FONs **D2**. Dans cette hypothèse, les motifs ailettes en apportant un encombrement stérique important pourrait

générer une surface plus « poreuse » où les défauts d'arrangement sont plus nombreux. Cette perte de compacité réduirait la portée des domaines de cohérence (domaine où les dipôles interagissent coopérativement) à la surface des nanoparticules.

Selon l'hypothèse formulée plus haut, le cœur des FONs est la source des contributions quadripolaires Δ^{Q} mesurées lors des scans en polarisation (figure 4 et tableau 2). Dans le but de prouver cette hypothèse, l'étude du cœur isolé des FONs pourrait donner de précieuses indications sur les niveaux d'organisation au sein des nanoparticules. Malheureusement, la préparation des nanoparticules par la méthode dite de reprécipitation ne permet pas de préparer uniquement le cœur des nanoparticules, une autre approche indépendante de la préparation doit donc être envisagée.

Selon notre théorie, la surface des nanoparticules est le siège des contributions dipolaires mesurées, donc si l'arrangement moléculaire à la surface des nanoparticules est modulé, la contribution dipolaire devrait être affectée. Comme expliquée dans l'introduction de ce manuscrit, la surface des nanoparticules est très sensible au pH et à la force ionique. Il a été démontré dans la littérature que pour des molécules polaires organisées, le potentiel de surface est profondément perturbé lorsque la force ionique de la solution aqueuse est augmentée.[51] Cette modification du potentiel de surface s'explique par une réorganisation des molécules à l'interface avec l'eau, sous l'action d'électrolytes.

Tirant parti de cette action des électrolytes sur la surface des nanoparticules, des scans en polarisation sur des solutions salines (KCl) de FONs **D2** et **D3** ont permis de mettre en avant des modifications très importantes de la surface des nanoparticules en fonction de la concentration en sel.[52]

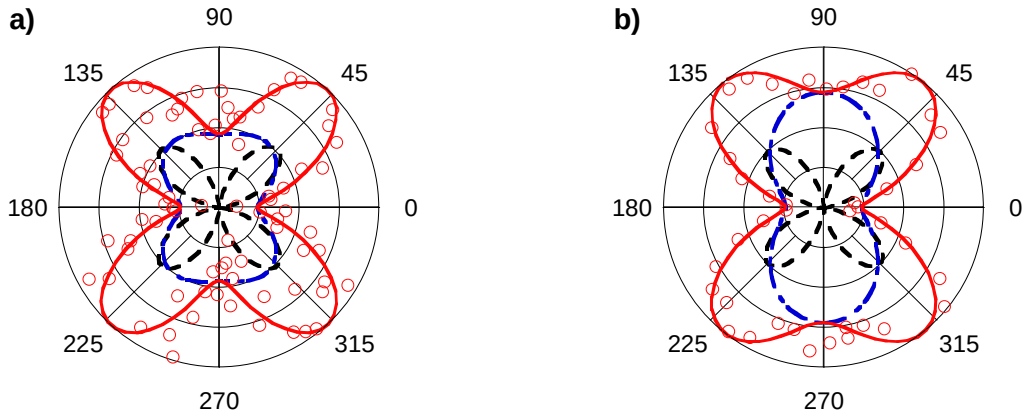


Figure 5. Scans en polarisation des FONs **D2** (gauche) et **D3** (droite) en solution aqueuse saline ([KCl]~0.2M). En rouge la réponse globale, en bleu la réponse dipolaire et en noir la réponse quadripolaire.

Comme le montrent les scans en polarisation (figure 5), les composantes dipolaires des FONs ont quasiment disparu (**D2**) ou sont fortement atténuées (**D3**). Cette diminution de la composante dipolaire n'est pas accompagnée d'un affaiblissement de la composante quadripolaire, on peut donc en conclure que la contribution quadripolaire provient exclusivement du cœur des nanoparticules. Il est intéressant de remarquer que les FONs **D3** sont moins impactées par la forte concentration en KCl que les FONs **D2** ; ceci indique que la stabilité colloïdale des FONs **D3** est vraiment exaltée par la présence des motifs ailettes.

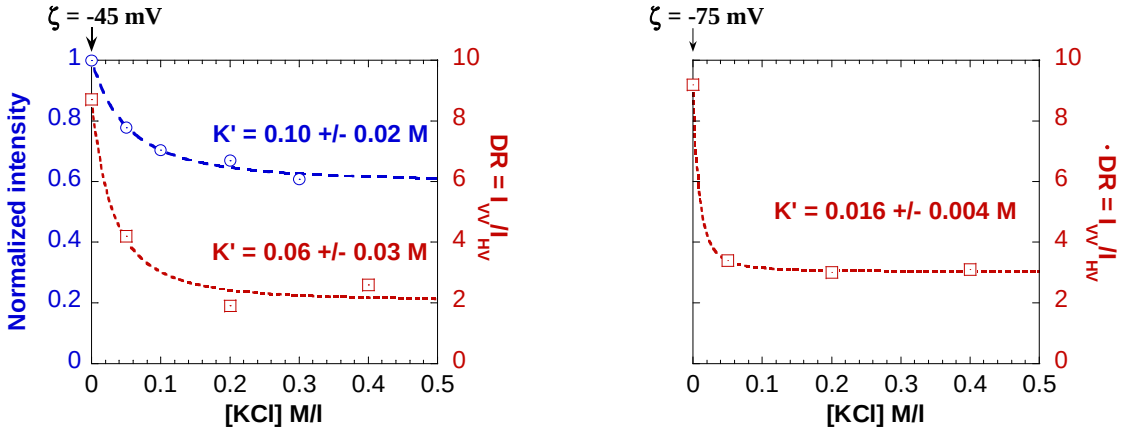


Figure 6. Influence de la concentration en KCl sur l'intensité HRS des FONs **D2** (gauche) en bleu et sur la constante de dépolarisation (en rouge) des FONs **D2** et **D3** (droite).

Comme le montre la figure 6, l'intensité HRS s'atténue avec l'ajout de KCl pour les FONs **D2** jusqu'à atteindre un plateau situé aux alentours d'une concentration en KCl~0.2M. Ce plateau correspond à une atténuation du signal de l'ordre de 40% du signal total, ce qui indique que malgré un début d'agrégation (causée par la force ionique très importante), les FONs **D2** conservent néanmoins 60% du signal HRS initial.

L’évolution des taux de dépolarisation avec la concentration en sel montre que pour les deux types de FONs, la contribution majoritaire devient octupolaire une fois le plateau atteint. Cette inversion des contributions est vraiment très rapide pour les FONs **D2**, ce qui indique une très forte modification de la surface des nanoparticules.

Ces modifications à la surface des NPs peuvent être assimilées à des mouvements des molécules à l’interface qui vont migrer d’un site polaire à un autre à la surface des FONs (illustration 3). Ces migrations sont représentées par des constantes d’équilibres K’ (figure 6). Ces migrations annihilent progressivement la compacité et l’arrangement des molécules à l’interface, ce qui entraîne une diminution de la portée des domaines de polarité et donc la baisse de signal HRS.

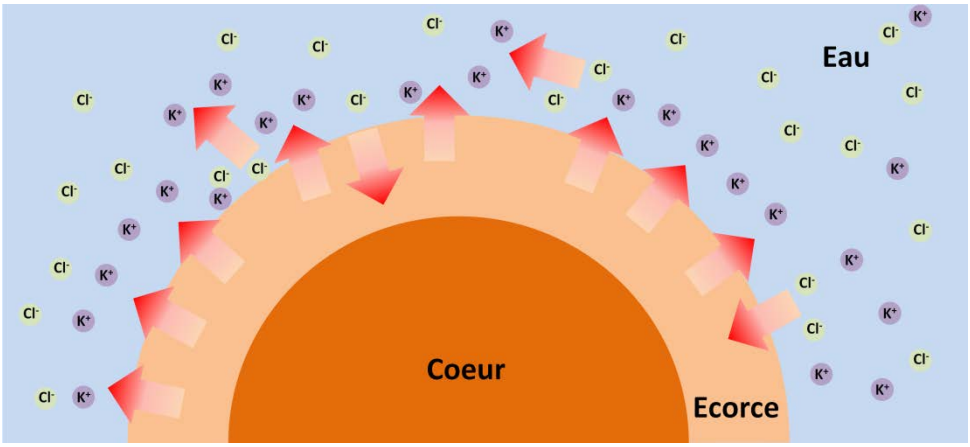


Illustration 3. Illustration des migrations moléculaires à la surface des FONs dans l’eau.

Ces résultats démontrent l’impact de la structure moléculaire de chromophores dipolaires sur la stabilité colloïdale des FONs préparées à partir de ces dipôles. Ainsi, augmenter l’encombrement stérique des chromophores semble diminuer la structuration/compacité de la surface, mais contribuerait à augmenter significativement la stabilité colloïdale de ces objets. D’après les mesures en polarisations des FONs, il semble que le cœur des nanoparticules soit le siège de fortes contributions quadripolaires semblant indiquer une organisation plus ou moins proche du cristal.

Ces données sont précieuses, puisqu’elles permettent au chimiste d’incorporer au design moléculaire des paramètres pouvant aider à augmenter la stabilité colloïdale des nanoparticules. Ainsi, tirant parti de ces résultats très prometteurs une nouvelle génération de dipôles moléculaires contenant des motifs de type « ailettes » a été synthétisée.

Références bibliographiques

[1] Clays, K.; Persoons, A., Hyper-Rayleigh scattering in solution. *Rev. Sci. Instrum.* **1992,** *63*, 3285-9.

[2] P. A. Franken, A. E. H., C. W. Peters, and G. Weinreich, Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters* **1961,** *7*, 121.

[3] Moreaux, L.; Sandre, O.; Mertz, J., Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* **2000,** *17*, 1685-1694.

[4] Both, M.; Vogel, M.; Friedrich, O.; von, W. F.; Kunsting, T.; Fink, R. H. A.; Uttenweiler, D., Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ. *J Biomed Opt* **2004,** *9*, 882-92.

[5] Nucciotti, V.; Sacconi, L.; Linari, M.; Lombardi, V.; Piazzesi, G.; Piroddi, N.; Poggesi, C.; Tesi, C.; Vanzi, F.; Pavone, F. S., Functional imaging of muscle cells by second harmonic generation. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2006,** *6089*, 60891I/1-60891I/9.

[6] Vogel, M.; Schuermann, S.; Friedrich, O.; von Wegner, F.; Both, M.; Fink, R. H. A., Scanning multi photon microscopy of SHG signals from single myofibrils of mammalian skeletal muscle. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2006,** *6089*, 60891J/1-60891J/7.

[7] Kim, B. M.; Eichler, J.; Reiser, K. M.; Rubenchik, A. M.; Da, S. L. B., Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med* **2000,** *27*, 329-35.

[8] Zoumi, A.; Yeh, A.; Tromberg, B. J., Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002,** *99*, 11014-11019.

[9] Huang, Z.; Zhuo, S.; Chen, J.; Chen, R.; Jiang, X., Multiphoton microscopic imaging of adipose tissue based on second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Scanning* **2008,** *30*, 452-456.

[10] Wikipedia, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d0/Forward-SHG-Collagen-Myosin-860nm-150um.jpg.

[11] Porter, J. F., Jr., Fluorescence excitation by the absorption of two consecutive photons. *Phys. Rev. Lett.* **1961,** *7*, 414-15.

[12] Loudon, R., Theory of nonlinear optical processes in semiconductors and insulators. *Proc. Phys. Soc., London* **1962,** *80*, 952-61.

[13] Kleinman, D. A., Theory of second harmonic generation of light. *Phys. Rev.* **1962,** *128*, 1761-75.

[14] Miller, R. C.; Kleinmann, D. A.; Savage, A., Quantitative studies of optical harmonic generation in CdS, BaTiO3, and KH2PO4 type crystals. *Phys. Rev. Lett.* **1963,** *11*, 146-9.

[15] Bloembergen, N.; Pershan, P. S., Light Waves at the Boundary of Nonlinear Media. *Physical Review* **1962,** *128*, 606-622.

[16] Bersohn, R., Scattering of optical harmonics by macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1964,** *86*, 3505-7.

[17] Heilmeier, G. H.; Ockman, N.; Braunstein, R.; Kramer, D. A., Relationship between optical second harmonic generation and the electrooptic effect in the molecular crystal hexamine. *Appl. Phys. Lett.* **1964,** *5*, 229-30.

[18] Rentzepis, P. M.; Pao, Y., Laser-induced optical second harmonic generation in organic crystals. SHG efficiency 5 × 10-6. *Appl. Phys. Lett.* **1964,** *5*, 156-8.

[19] Bass, M.; Bua, D.; Mozzi, R.; Monchamp, R. R., Optical second-harmonic generation in crystals of organic dyes. *Appl. Phys. Lett.* **1969,** *15*, 393-6.

[20] Gott, J. R., Effect of molecular structure on optical second-harmonic generation from organic crystals. *J. Phys. B* **1971,** *4*, 116-23.

[21] Rieckhoff, K. E.; Peticolas, W. L., OPTICAL SECOND-HARMONIC GENERATION IN CRYSTALLINE AMINO ACIDS. *Science* **1965,** *147*, 610-1.

[22] Boldt, P.; Blenkle, M.; Cabrera, I.; Lupo, D.; Hickel, W., Donor-acceptor substituted thieno[3,2-b]thiophenes, new blue transparent chromophores for second harmonic generation. *MCLC S&T, Sect. B: Nonlinear Opt.* **1994,** *8*, 173-82.

[23] Samoc, A.; Samoc, M.; Kohler, D.; Stahelin, M.; Funfschilling, J.; Zschokke-Granacher, I., Linear and second order optical properties of the trigonal adducts of triiodomethane with sulphur and quinoline. *MCLC S&T, Sect. B: Nonlinear Opt.* **1992,** *2*, 13-27.

[24] Schrader, S.; Prescher, D.; Zauls, V., New chromophores and polymers for second order nonlinear optics. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1998,** *3474*, 160-171.

[25] Wang, P.; Chang, Y. M.; Xu, Y.; Ye, C., The first hyperpolarizabilities of merocarbocyanines. *Chin. Chem. Lett.* **1998,** *9*, 679-682.

[26] Marder, S. R.; Cheng, L. T.; Tiemann, B. G.; Friedli, A. C.; Blanchard-Desce, M.; Perry, J. W.; Skindhoej, J., Large first hyperpolarizabilities in push-pull polyenes by tuning of the bond length alternation and aromaticity. *Science (Washington, D. C., 1883-)* **1994,** *263*, 511-14.

[27] Barzoukas, M.; Muller, J.; Fort, A.; Marder, S. R.; Alain, V.; Blanchard-Desce, M., Structure / quadratic hyperpolarizability correlation: Solvent effect. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1996,** *2852*, 132-141.

[28] Blanchard-Desce, M.; Alain, V.; Bedworth, P. V.; Marder, S. R.; Fort, A.; Runser, C.; Barzoukas, M.; Lebus, S.; Wortmann, R., Large quadratic hyperpolarizabilities with donor-acceptor polyenes exhibiting optimum bond length alternation: correlation between structure and hyperpolarizability. *Chem. - Eur. J.* **1997,** *3*, 1091-1104.

[29] Denning, R. G., Chromophores for second-order non-linear optic materials. *J. Mater. Chem.* **1995,** *5*, 365-78.

[30] Cho, B. R.; Je, J. T.; Kim, H. S.; Jeon, S. J.; Song, O.-K.; Wang, C. H., Steric effect on the molecular hyperpolarizabilities of β-nitrostyrene derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1996,** *17*, 693-695.

[31] Cho, B. R.; Je, J. T.; Lee, S. J.; Lee, S. H.; Kim, H. S.; Jeon, S. J.; Song, O.-K.; Wang, C. H., Molecular hyperpolarizabilities of barbituric acid and cyclobutene-1,2-dione derivatives. Electronic and steric effects. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 2141-2144.

[32] Pauley, M. A.; Wang, C. H.; Jen, A. K. Y., Hyper-Rayleigh scattering studies of first order hyperpolarizability of tricyanovinylthiophene derivatives in solution. *J. Chem. Phys.* **1995,** *102*, 6400-5.

[33] Blanchard-Desce, M.; Bloy, V.; Lehn, J.-M.; Runser, C.; Barzoukas, M.; Fort, A.; Zyss, J., Push-pull polyenes and carotenoids with enhanced quadratic nonlinear optical susceptibilities. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1994,** *2143*, 20-9.

[34] Alain, V.; Thouin, L.; Blanchard-Desce, M.; Gubler, U.; Bosshard, C.; Gunter, P.; Muller, J.; Fort, A.; Barzoukas, M., Molecular engineering of push-pull phenylpolyenes for nonlinear optics. Improved solubility, stability, and nonlinearities. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **1999,** *11*, 1210-1214.

[35] Meredith, G. R.; Buchalter, B., Solvent dependence of apparent third-order hyperpolarizability in p-nitroaniline. *J. Chem. Phys.* **1983,** *78*, 1938-45.

[36] Persoons, A.; Clays, K.; Kauranen, M.; Hendrickx, E.; Put, E.; Bijnens, W., Characterization of nonlinear optical properties by hyper-scattering techniques. *Synth. Met.* **1994,** *67*, 31-8.

[37] Verbiest, T.; Clays, K.; Persoons, A.; Meyers, F.; Bredas, J. L., Determination of the hyperpolarizability of an octopolar molecular ion by hyper-Rayleigh scattering. *Opt. Lett.* **1993,** *18*, 525-7.

[38] Hendrickx, E.; Boutton, C.; Clays, K.; Persoons, A.; van Es, S.; Biemans, T.; Meijer, B., Quadratic nonlinear optical properties of correlated chromophores: cyclic 6,6'-dinitro-1,1'-binaphthyl-2,2'-ethers. *Chem. Phys. Lett.* **1997,** *270*, 241-244.

[39] Yokoyama, S.; Nakahama, T.; Otomo, A.; Mashiko, S., Intermolecular Coupling Enhancement of the Molecular Hyperpolarizability in Multichromophoric Dipolar Dendrons. *J. Am. Chem. Soc.* **2000,** *122*, 3174-3181.

[40] Castet, F.; Blanchard-Desce, M.; Adamietz, F.; Poronik, Y. M.; Gryko, D. T.; Rodriguez, V., Experimental and Theoretical Investigation of the First-Order Hyperpolarizability of Octupolar Merocyanine Dyes. *ChemPhysChem* **2014,** *15*, 2575-2581.

[41] Kelley, A. M.; Leng, W.; Blanchard-Desce, M., Resonance Hyper-Raman Scattering from Conjugated Organic Donor-Acceptor "Push-Pull" Chromophores with Large First Hyperpolarizabilities. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125*, 10520-10521.

[42] Myers, K. A.; Shoute, L. C. T.; Blanchard-Desce, M.; Bartholomew, G. P.; Bazan, G. C., Resonance Raman, hyper-Raman, and hyper-Rayleigh depolarization ratios and symmetry breaking in solution. *Mol. Phys.* **2006,** *104*, 1239-1247.

[43] Lee, M. J.; Piao, M.; Jeong, M.-Y.; Lee, S. H.; Kang, K. M.; Jeon, S.-J.; Lim, T. G.; Cho, B. R., Novel azo octupoles with large first hyperpolarizabilities. *J. Mater. Chem.* **2003,** *13*, 1030-1037.

[44] Johnson, C. K.; Soper, S. A., Nonlinear surface-enhanced spectroscopy of silver colloids and pyridine: hyper-Raman and second-harmonic scattering. *J. Phys. Chem.* **1989,** *93*, 7281-5.

[45] Fu, D.-G.; Li, M.; Wang, X.; Cheng, J.-Q.; Yu, Z.; Lu, Z.-H.; Liu, J.-Z.; Cui, Y.-P., The CdS nanoparticle with capped surface and its nonlinear optical properties studied by hyper-Rayleigh scattering. *Supramol. Sci.* **1998,** *5*, 495-498.

[46] Vance, F. W.; Lemon, B. I.; Hupp, J. T., Enormous Hyper-Rayleigh Scattering from Nanocrystalline Gold Particle Suspensions. *J. Phys. Chem. B* **1998,** *102*, 10091-10093.

[47] Eisenthal, K. B., Second Harmonic Spectroscopy of Aqueous Nano- and Microparticle Interfaces. *Chemical Reviews* **2006,** *106*, 1462-1477.

[48] Rodriguez, E. V.; de Araujo, C. B.; Brito-Silva, A. M.; Ivanenko, V. I.; Lipovskii, A. A., Hyper-Rayleigh scattering from BaTiO3 and PbTiO3 nanocrystals. *Chem. Phys. Lett.* **2009,** *467*, 335-338.

[49] Rodriguez, V., New structural and vibrational opportunities combining Hyper-Rayleigh/hyper-Raman and Raman scattering in isotropic materials. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012,** *43*, 627-636.

[50] Valdez, E.; de Araujo, C. B.; Lipovskii, A. A., Second harmonic scattered light from a transparent glass-ceramic containing sodium niobate nanocrystals. *Appl. Phys. Lett.* **2006,** *89*, 031901/1-031901/3.

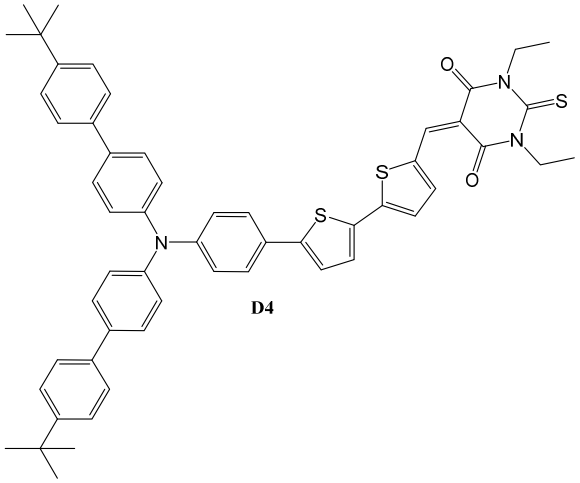
[51] Lis, D.; Backus, E. H. G.; Hunger, J.; Parekh, S. H.; Bonn, M., Liquid flow along a solid surface reversibly alters interfacial chemistry. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2014,** *344*, 1138-1142.

[52] Kim, J. H.; Park, J. S.; Kim, M.-G., Time-dependent change of Hyper-Rayleigh Scattering from silver nanoparticle aggregates induced by salt. *Chem. Phys. Lett.* **2014,** *600*, 15-20.

Chapitre IV – Préparation de FONs émettrices proche IR à base de molécules dipolaires

Chapitre IV – Préparation de FONs émettrices proche IR à base de molécules dipolaires

Les chapitres précédents (II et III) ont démontré qu'un design moléculaire adapté pouvait améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules et décaler l'absorption et l'émission vers les longueurs d'onde d'intérêt pour la bioimagerie. Dans le but d'amplifier ce décalage vers le rouge, un nouveau chromophore dipolaire (**D4**) possédant un système π conjugué plus étendu, ainsi qu'un groupement accepteur plus fort a été synthétisé.[1]



D4

Schéma 1. Structure chimique de **D4**.

1. Introduction

1.1 Le décalage vers le rouge pour l'imagerie

Le décalage vers le rouge est un aspect important pour l'imagerie biologique. L'irradiation et la détection dans les milieux biologiques sont affectées par la présence de chromophores endogènes absorbants dans le visible. Ces chromophores sont principalement certains acides aminés aromatiques (tableau 1), des flavines, la NADH, l'ADN ainsi que les différents types de porphyrines (la protophorphyrine IX chez l'animal et la chlorophylle chez les plantes, Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison de propriétés d'absorptions de chromophores endogènes.[2]

	Absorbeurs endogènes	λ_{abs}^{max} nm	λ_{abs}^{max2} nm	λ_{abs}^{max3} nm	ε^{max} *a)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$	ε^{max2} *b)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$	ε^{max3} *c)* $L.mol^{-1}.cm^{-1}$
UV	Phénylalanine	188	206	257	60.0	9.3	0.2
	Tyrosine	193	222	274	48.0	8.0	1.4
	Histidine	211	-	-	5.9	-	-
	Tryptophane	219	280	-	47.0	5.6	-
	Cystine	250	-	-	0.3	-	-
	NADH	259	340	-	14.4	6.2	-
	ADN	260	258	-	7.4	6.6	-
Visible et NIR	Hémoglobine	430	550	910	$\sim 5\ 10^{5}$	$\sim 4\ 10^{4}$	$\sim 1\ 10^{3}$
	Hémoglobine oxygénée	418	542	925	$\sim 5\ 10^{5}$	$\sim 4\ 10^{4}$	$\sim 8\ 10^{2}$
	Lipides	~930	-	-	$\sim 1\ 10^{-3}$	-	-
IR	Eau	980	1430	1930	$\sim 4\ 10^{-3}$	0.2	0.5

a) Coefficient d'extinction molaire à λ_{abs}^{max}. *b)* Coefficient d'extinction molaire à λ_{abs}^{max2}. *c)* Coefficient d'extinction molaire à λ_{abs}^{max3}.

Bien que les valeurs des coefficients d'extinction molaire de la majorité des chromophores endogènes semblent faibles, la forte concentration de ces chromophores, associée aux phénomènes de diffusion de Mie entraîne une atténuation très importante de la pénétration de la lumière dans les tissus.[3, 4]

Une expérience simple à réaliser pour comprendre l'importance de l'atténuation de la lumière dans les tissus est de mettre sa main devant une source lumineuse blanche intense (par exemple le soleil). Lors de cette expérience, un halo rouge apparaît au niveau des parties les plus fines de la main.

Ce phénomène s'explique par le fait que la diffusion et l'absorption de la lumière blanche dans les tissus sont suffisantes pour filtrer les UV et une partie de la lumière visible. Cependant, la partie rouge du spectre de la lumière blanche arrive à traverser la main. La formation du halo s'explique par la diffusion de la lumière rouge dans les tissus.

Cette diffusion est très problématique puisqu'elle induit une perte d'information. Alors que l'absorption atténue l'amplitude de l'excitation ou de la collection, la diffusion modifie la trajectoire de la lumière « aléatoirement », il est donc presque impossible de déterminer l'origine de la lumière à un instant *t* dans les tissus.[5]

Dans le but de minimiser les effets d'absorption et de diffusion dans les tissus, une zone spectrale où l'excitation et la collection de lumière doit s'effectuer a été définie, il s'agit de la fenêtre biologique 600-1200 nm (figure 1).

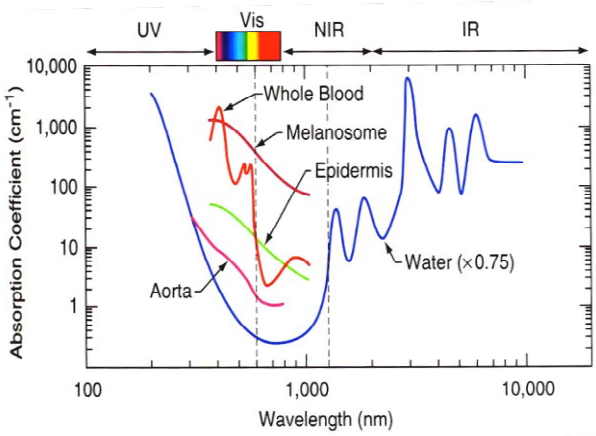


Figure 1. Fenêtre biologique pour l'excitation et la collection de lumière dans les tissus.[6]

1.2 Le casse-tête des filtres en imagerie

La synthèse de chromophores stables et compatibles avec la fenêtre biologique[7] est rendue difficile par l'agressivité du milieu biologique. En effet, l'émission dans le rouge nécessite des transferts de charges très importants au sein de la molécule, ce qui rend celle-ci très sensible aux phénomènes d'oxydation et de photo-oxydation.

De plus, émettre dans le rouge n'est que la moitié du chemin à parcourir, puisqu'avant de pouvoir émettre un photon, la molécule doit d'abord être excitée. Son absorption doit donc être au maximum compatible avec cette fenêtre biologique. Principalement pour ces raisons, le marché des sondes fluorescentes dans le proche IR, pour l'imagerie biologique est dominé par les cyanines,[8, 9] (figure 2) ou bien les dérivés de type rhodamine.[10] Bien que considéré comme un désavantage, le faible déplacement de Stokes de ces chromophores commerciaux leur permet d'absorber et d'émettre dans la gamme 600-900 nm, ce qui est un avantage lorsque l'on souhaite travailler dans les tissus.

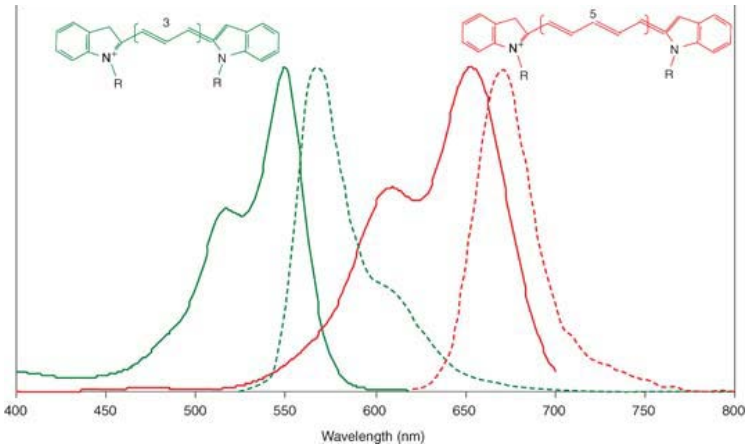


Figure 2. Structure chimique et spectre d'absorption/émission des cyanines C3 et C5.

Le désavantage des cyanines réside dans leur faible solubilité dans l'eau ; elles forment spontanément des agrégats[11] ce qui impacte leurs propriétés photophysiques. Il est donc nécessaire de proposer de nouveaux fluorophores plus stables pour l'imagerie biologique dans le proche IR.

Le faible déplacement de Stokes de ces fluorophores est un inconvénient majeur, puisqu'il induit des effets de filtres internes[12, 13] et de quenching[13] de la fluorescence à « haute » concentration. De plus, comme ces molécules ont tendance à s'agréger, ces effets délétères vis-à-vis des propriétés photophysiques sont amplifiés. Le second désavantage lié à un faible déplacement de Stokes provient de la diffusion de la lumière dans les tissus. La diffusion de l'excitation dans les tissus peut amener à polluer le signal détecté lorsque les longueurs d'excitation et de collection sont proches, et conduire ainsi à une image de mauvaise qualité ou bien à une mauvaise interprétation de l'image.

Il est intéressant de remarquer que le succès de ces chromophores a directement impacté la microscopie. Avec l'utilisation massive de ces molécules en microscopie de fluorescence, les constructeurs de microscope ont rapidement fourni des filtres optiques spécialement dédiés à l'excitation et à l'émission de fluorescence de ces nouveaux chromophores. Ainsi, les combinaisons de filtres (sous forme de cube) couramment utilisés en microscopie de fluorescence sont souvent nommées d'après la molécule commerciale pour laquelle ils ont été optimisés (GFP, DAPI, FITC, Texas Red, Cy5, etc.…) comme le montre la figure 3.[14]

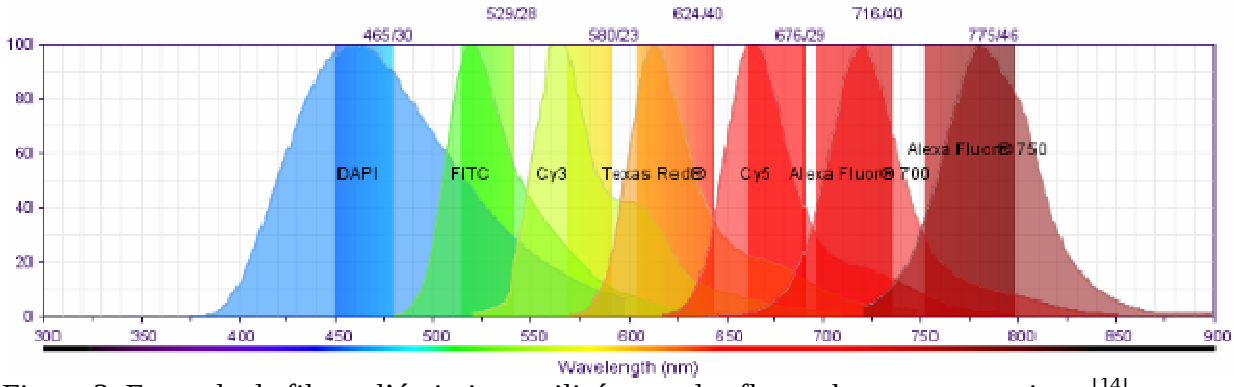


Figure 3. Exemple de filtres d'émissions utilisés pour les fluorophores commerciaux.[14]

Ainsi, en raison du coût élevé de ces cubes, les laboratoires sont souvent équipés de quelques combinaisons de filtres couvrant le visible (DAPI, FITC et Alexa Fluor®). Malheureusement, ce type « normalisation » des montages en microscopie de fluorescence à partir de ces chromophores commerciaux induit des difficultés lors de l'utilisation de fluorophores originaux. Le faible déplacement de Stokes des fluorophores commerciaux impose une irradiation et une collection de la fluorescence étroites et très proches.

Cette restriction des gammes d'absorption et d'émission (figure 4) ne permet pas d'utiliser des fluorophores à grand déplacement de Stokes au maximum de leur capacité : un choix doit bien souvent être fait entre une excitation vers le maximum d'absorption ou bien entre la collection de fluorescence vers le maximum d'émission. Ce choix est souvent tranché en fonction des caractéristiques photophysiques de la molécule fluorescente : pour une molécule avec un fort epsilon dans la zone où le microscope peut irradier, la collection sera privilégiée, alors que pour une molécule à petit epsilon, mais grand Φ_f, l'excitation sera privilégiée.

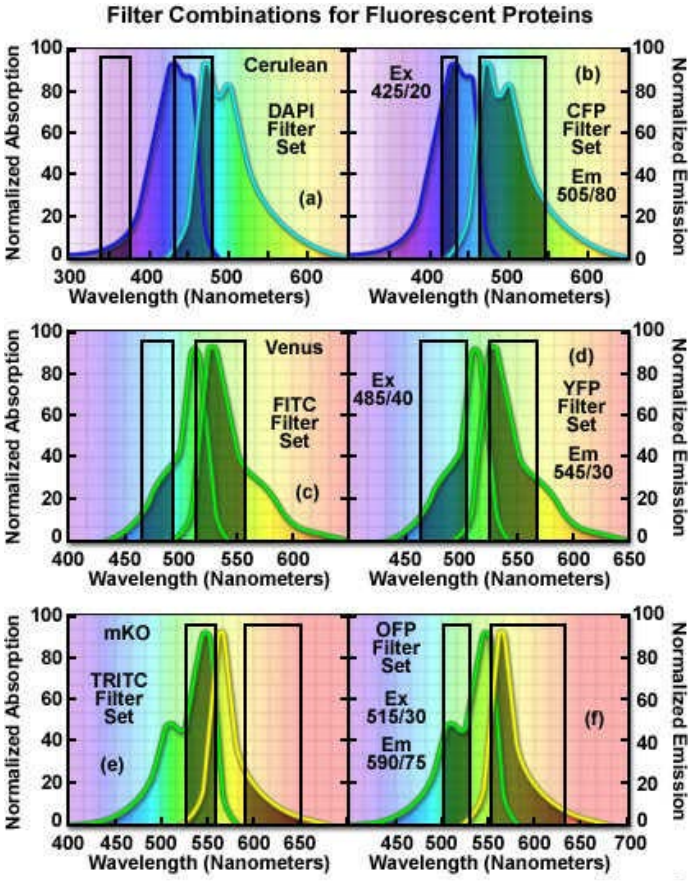


Figure 4. Exemple de combinaisons de filtres utilisées pour des protéines fluorescentes en microscopie de fluorescence.[15]

Néanmoins, ces limitations peuvent être outrepassées via l'utilisation d'une combinaison de filtres spécialement dédiée aux grands déplacements de Stokes ou bien via l'utilisation d'un laser accordable comme source d'excitation.

Ainsi, le manque de fluorophores à grands déplacements de Stokes et possédant des brillances élevées doit être comblé par les chimistes.

2. Propriétés photophysiques de D4 en solution

Du point de vue de la synthèse chimique, ce chromophore est obtenu en une étape à partir de la molécule **D3** par une simple condensation de Knoevenagel. Cette réaction est très intéressante puisqu'elle permet d'accéder facilement à des chromophores possédant des groupements électro-attracteurs forts. Le second intérêt se situe au niveau de la purification, puisque par un subtil jeu de concentration et de choix du solvant, la molécule cible peut être isolée du milieu réactionnel par une simple filtration. Cependant, cette réaction est une réaction équilibrée (schéma 2). Ainsi les produits obtenus peuvent réagir avec l'eau pour restituer l'aldéhyde de départ.

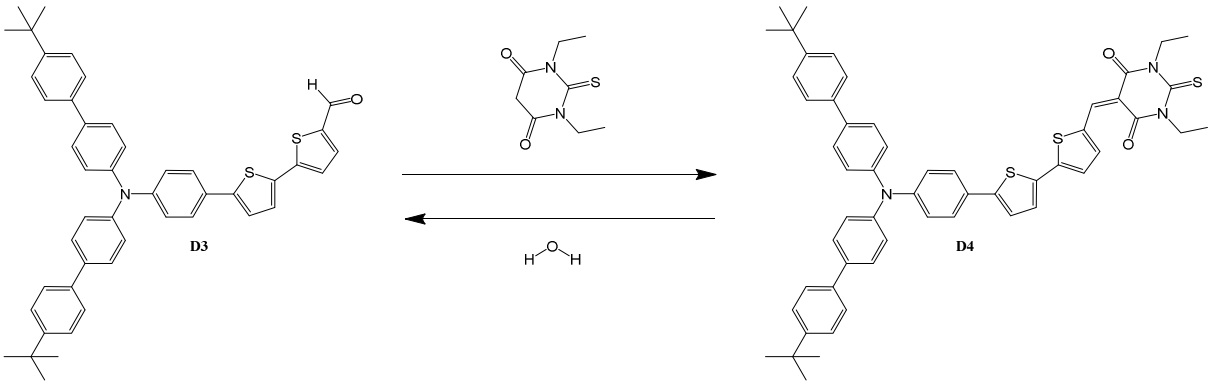


Schéma 2. Schématisation de la condensation de Knoevenagel permettant de synthétiser **D4** à partir de **D3**.

Cette instabilité chimique du produit de condensation vis-à-vis de l'eau est un problème lorsque l'on souhaite utiliser ces molécules dans des milieux hydriques, comme le montre l'étude de solvatochromie de **D4** en solution moléculaire (figure 5). En effet, pour des raisons d'instabilité chimique (figure 6), des solvants très hygroscopiques tels que l'éthanol, le DMSO, etc.… ne peuvent pas être utilisés pour solubiliser **D4**.

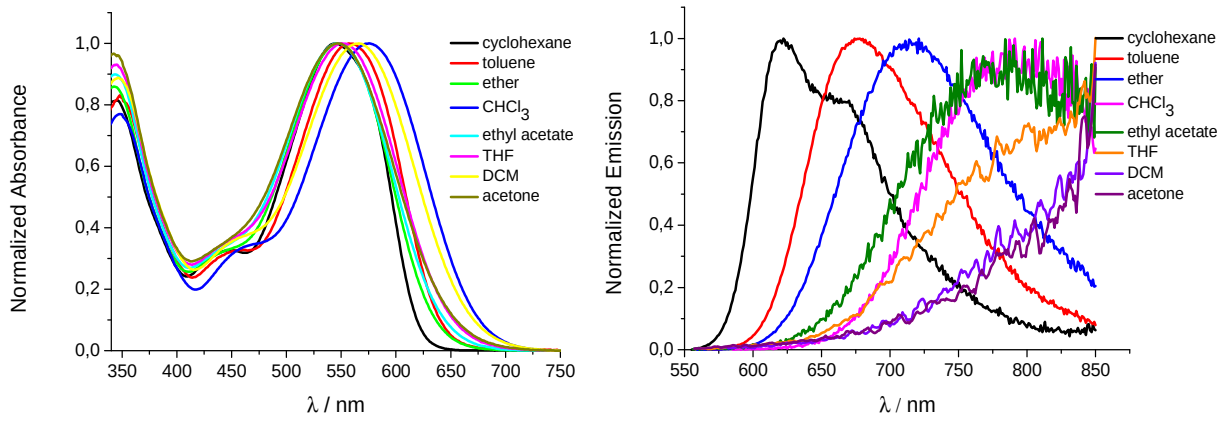


Figure 5. Étude de solvatochromie de **D4** en solution.

Le chromophore **D4** possède une solvatochromie positive en émission, ce comportement est attendu d'après le comportement de **D2** et **D3** en solution. Cette sensibilité de **D4** vis-à-vis de la polarité environnante fait de cette dernière une sonde de polarité efficace (figure 5 et tableau 2).

Tableau 2. Propriétés photophysiques de **D4** en solution moléculaire.

Solvant	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Stokes' shift cm^{-1}	Φ_F *b)*	τ *c)* ns
Cyclohexane	545	$4.4\ 10^4$	622	2 300	0.17	0.6
Toluène	558	$4.4\ 10^4$	678	3 200	0.50	2.2
Ether diéthylique	549	$4.6\ 10^4$	714	4 200	0.40	2.3
$CHCl_3$	575	$4.8\ 10^4$	792	4 800	0.08	0.9
Acétate d'éthyle	546	$4.2\ 10^4$	784	5 550	0.03	0.5
THF	553	$4.5\ 10^4$	800	5 580	0.01	-
DCM	566	$4.6\ 10^4$	800	5 170	0.02	-
Acétone	547	$4.8\ 10^4$	916	7 370	<0.01	-

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Temps de vie de fluorescence.

Ce chromophore possède sa bande de transfert de charge dans le jaune et son émission couvre la fin du visible (de l'orange à l'IR selon le solvant utilisé). La variation du maximum d'absorption vers les grandes énergies, à partir de solvants de polarisabilité supérieurs au chloroforme, indique que l'état fondamental est très délocalisé, induisant une stabilisation de cet état par les solvants polaires.

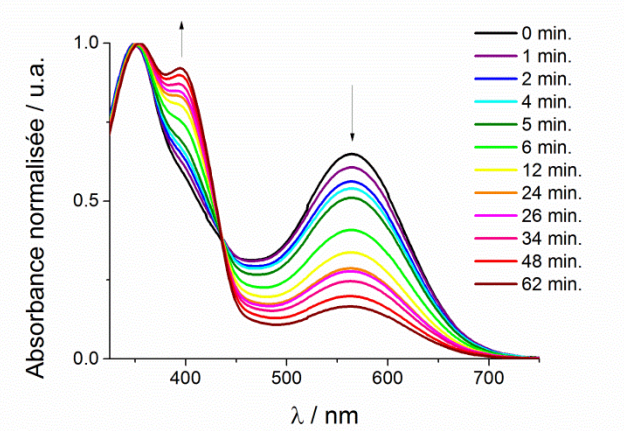


Figure 6. Étude de la stabilité chimique de **D4** dans le DMSO (avec 1% d'eau).

Puisque **D3** est régénéré à partir de **D4** par la présence d'eau dans les solvants hygroscopiques (figure 6), la préparation de nanoparticules dans une solution aqueuse peut donner de précieuses indications sur la stabilité chimique des nanoparticules à base de dipôles.

3. Propriétés photophysiques des nanoparticules D4

Les nanoparticules de **D4** sont préparées par reprécipitation et immédiatement, la solution aqueuse passe de l'incolore à un violet très marqué. Puisque cette molécule n'est pas soluble dans l'eau, la présence de cette couleur violette indique que la molécule est solvatée sous forme d'agrégats ; la limpidité indique la présence de nanoparticules.

3.1 Absorption et émission des FONs **D4**

Curieusement, la mesure d'absorption (figure 7) de la solution de nanoparticules présente une très forte similitude avec les mesures d'absorption dans le dichlorométhane. Cette absorption dans le jaune est une preuve irréfutable de la présence de **D4** à l'état de nanoparticules puisque la bande d'ICT des FONs **D3** est centrée sur 420 nm. L'émission de fluorescence quant à elle est centrée sur 800 nm, ce qui concorde avec l'émission dans le dichlorométhane.

Il est important de noter que ces nanoparticules fluorescentes présentent une émission dans le proche infrarouge (IR) fine pour ce type de système fluorescent (FWHM = 2970 cm^{-1}), ce qui est très utile dans les expériences d'imagerie multicouleur.

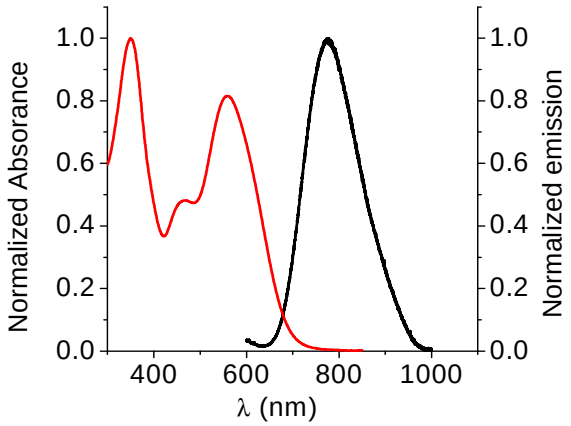


Figure 7. Spectres d'absorption et d'émission des FONs **D4**.

3.2 Caractéristiques des FONs **D4**

Les mesures de tailles (tableau 3 et figure 8) ont montré que les FONs **D4** sont de type sphérique avec un diamètre 40 nm (TEM) et un diamètre hydraté de 53 nm (DLS).

Tableau 3. Caractéristiques des FONs **D4** dans l'eau en comparaison avec les chromophores commerciaux AlexaFluor ®750,[10] Atto740,[16] Cy 5.5[17] et NIR 7.0-2[17] ainsi que le QDs 800[10] solubilisé dans l'eau tamponnée PBS.

Composé	D_{TEM} *a)* nm	λ_{Abs}^{max} nm	ε^{max} *b)* $M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{Em}^{max} nm	Stokes' shift cm^{-1}	Φ_F	$\varepsilon^{max}\Phi$ *d)* $M^{-1}.cm^{-1}$	τ *e)* ns	ζ *f)* mV
D4	40	560	$1\ 10^{9}$ *g)*	800	5 357	0.02 *c)*	$200\ 10^{5}$	1.0	-28
QDs 800	16-20	532 *h)*	$2.1\ 10^{6}$	795	6 218	0.63	$132\ 10^{5}$	-	-
Alexa® 750	-	749	$2.9\ 10^{5}$	775	448	0.12	$0.3\ 10^{5}$	0.7	-
Atto740	-	740	$1.2\ 10^{5}$	764	424	0.10	$0.1\ 10^{5}$	0.6	-
Cy 5.5	-	674	$1.9\ 10^{5}$	694	427	0.23	$0.4\ 10^{5}$	-	-
NIR 7.02-2	-	777	$1.2\ 10^{5}$	798	338	0.02	$0.03\ 10^{5}$	-	-

a) Diamètre « sec » des nanoparticules déterminé par TEM. *b)* Coefficient d'extinction molaire. *c)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard le crésyl violet dans le méthanol. *d)* Brillance des FONs, QDs et fluorophores commerciaux. *e)* Temps de vie de fluorescence. *f)* Potentiel zeta des FONs. *g)* Pour un nombre de chromophores par FONs estimé à 23 000. *h)* Longueur d'onde d'absorption à laquelle correspond la valeur d'epsilon fournie par le fabricant.

Du fait du grand nombre de chromophores composant ces FONs (N = 23 000 unités), la brillance de ces nanoparticules est gigantesque, avec typiquement plus de trois ordres de grandeur en comparaison avec les chromophores commerciaux (AlexaFluor®750, ATTO740, Cy 5.5 et NIR7.0-2). Ces FONs ont également une brillance supérieure aux quantums dots commerciaux QDs800 dans des conditions d'excitations similaires. Associé à cette brillance, le déplacement de Stokes de **D4** vis-à-vis des sondes fluorescentes commerciales est un ordre de grandeur supérieur (x10), ce qui est clairement un atout dans le cadre d'une utilisation en imagerie.

Cette brillance permet de qualifier ces nanoparticules de HiFONs (Hyper-brillantes FONs) et démontre l'intérêt des FONs pour l'imagerie comme alternative aux dispendieuses sondes commerciales.

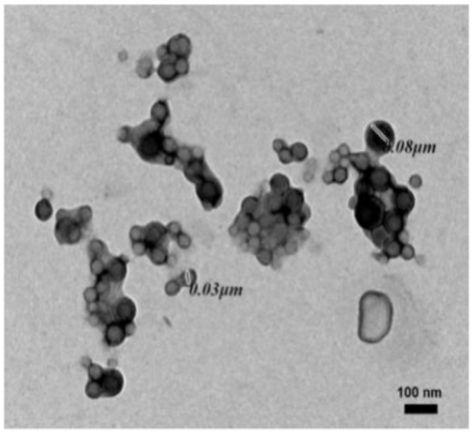


Figure 8. Image TEM des FONs **D4** dans l'eau.

3.3 Mesures de la stabilité des FONs **D4**

De façon surprenante et malgré un potentiel de surface faiblement négatif (-28 mV) les FONs **D4** présentent une très bonne stabilité colloïdale et chimique (figure 9). Ces profils de stabilité montrent que l'augmentation de la force de l'accepteur est aussi un facteur de stabilité et que le confinement moléculaire à la surface des FONs **D4** doit être suffisamment important pour empêcher l'eau de réagir sur le chromophore. De même, la stabilité de l'émission de fluorescence montre que le cœur de la nanoparticule ne subit pas de réorganisation.

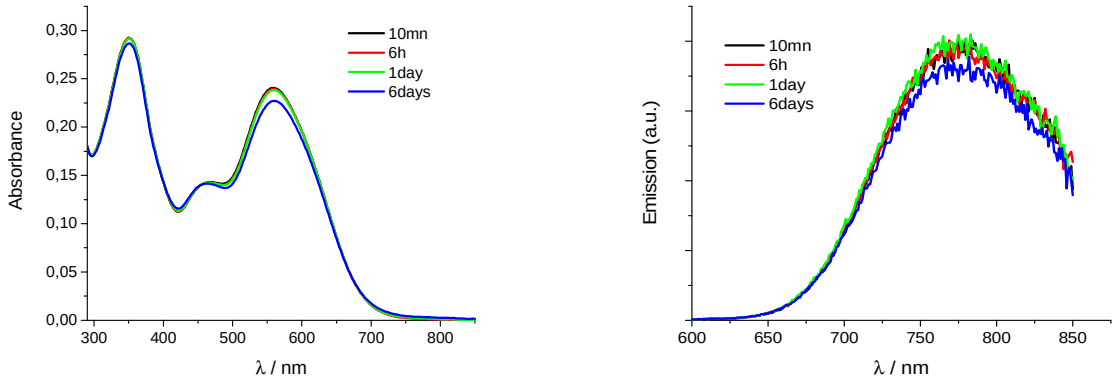


Figure 9. Évolution de la stabilité des FONs **D4** dans l'eau, suivie par absorption (gauche) et par émission de fluorescence (droite).

Les propriétés photophysiques de **D4** sont quasiment idéales pour de l'imagerie biologique, cependant le milieu biologique est un milieu très salin, or les expériences SHS sur les composés modèles **D2** et **D3** ont montré que sous l'action des électrolytes, les molécules de surface avaient tendance à migrer, exposant ainsi les chromophores aux molécules d'eau.

Dans le cas de **D4**, ce type de migration peut conduire à la réaction de rétro Knoevenagel à la surface des nanoparticules. Il est donc important dans le cadre d'une utilisation en milieu fortement ionique, de déterminer quelle est la stabilité chimique de ces FONs dans des conditions similaires à celles présentes dans les cellules.

Le pH de solutions aqueuses de FONs **D4** a été modulé (figure 10) pour atteindre des valeurs de pH faiblement acides (pH ~ 5) ou faiblement basiques (pH ~ 8). De façon tout à fait remarquable, ni l'absorption ni l'émission ne sont impactées par des variations de pH dans la gamme du vivant (5-8).

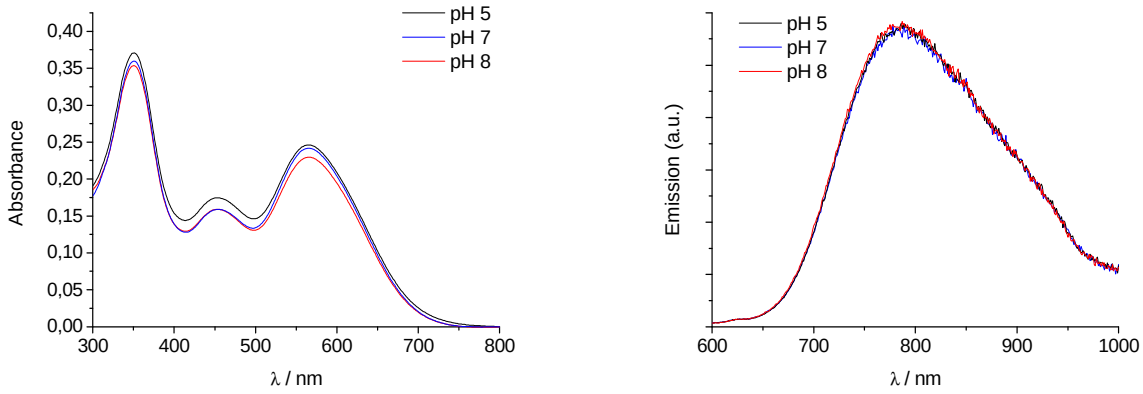


Figure 10. Évolution de l'absorption (gauche) et émission (droite) des FONs **D4** dans différentes solutions aqueuses.

Curieusement, l'ajout d'un tampon phosphate concentré (10% en PBS) entraîne une légère modification de la bande d'absorption (figure 11), mais une exaltation formidable de l'émission de fluorescence (facteur 10). Ceci s'explique par un effet d'écrantage du PBS qui « protège » la surface des nanoparticules de l'interaction avec l'eau, éliminant ainsi une source de désactivation non radiative, ce qui induit mécaniquement une augmentation de la luminescence.

La stabilité de ces FONs vis-à-vis de leur environnement est d'un intérêt majeur, puisque le vivant n'est pas un milieu homogène où le pH et la salinité sont des valeurs constantes. Ainsi, contrairement à certaines sondes commerciales[16] la stabilité vis-à-vis du pH est vraiment un atout essentiel de ces HiFONs en vue de l'utilisation en imagerie.

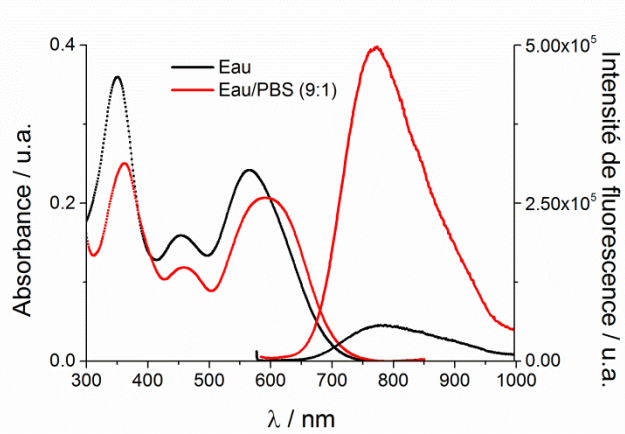


Figure 11. Évolution de l'absorption et de l'émission des FONs **D4** en présence de 10% de PBS.

Avant de tester les FONs **D4** dans un milieu cellulaire, une dernière caractéristique très importante des nanoparticules est à déterminer : leur photostabilité. Il est évident qu'un objet le plus brillant soit-il n'a que peu d'intérêt dans le cas d'imagerie cellulaire si celui-ci n'émet que pendant 1 à 2 secondes puis reste éteint définitivement.

Améliorer la photostabilité des molécules en milieu biologique est un réel défi, où un compromis doit être bien souvent établi entre couleur d'émission et photostabilité. Ce compromis s'explique par le fait que la méthode la plus couramment utilisée pour décaler l'émission de luminescence vers le rouge/proche IR est l'ajout de chaînes vinyliques.

Cet ajout entraîne effectivement un effet hyperchrome de l'absorption et un décalage vers le rouge ; cependant, les doubles liaisons ne sont pas des motifs stables du point de vue électrochimique. L'oxydation de ces doubles liaisons lorsque la molécule est à son état excité est relativement aisée dans l'eau, du fait de la présence d'une quantité non négligeable d'oxygène dissous. Or l'oxydation de cette double liaison entraîne une rupture de la conjugaison, et donc de la communication électronique entre les groupements accepteurs et donneurs de la molécule. Les conséquences sur la luminescence sont très néfastes, puisque dans la majorité des cas, au mieux la molécule continue d'émettre avec un déplacement hypsochrome de l'émission (et de l'absorption), ou bien la molécule n'émet plus.

L'oxygène moléculaire n'est pas la seule source d'oxydation des chromophores en milieu biologique, d'autres espèces oxydantes sont présentes telles que les ROS (espèces

oxygénées réactives) ou bien les RNS (espèces azotées réactives) et peuvent contribuer à dégrader le chromophore lorsque celui-ci est à l'état excité (photo-oxydation).

4. Utilisation des FONs D4 en imagerie

4.1 Imagerie par suivi de particule unique

Afin d'évaluer la photostabilité des FONs **D4**, des expériences de microscopie super-résolue ont été effectuées. Grâce à leur brillance gigantesque, ces FONs ont pu être observées individuellement par microscopie optique (figure 12). Il est intéressant de remarquer que les nanoparticules **D4** sont observables dans l'eau et dans le milieu PBS. De plus, comme le montre la figure 12, l'intensité de fluorescence des FONs est assez étroite, ce qui indique une bonne homogénéité de taille de nanoparticules.

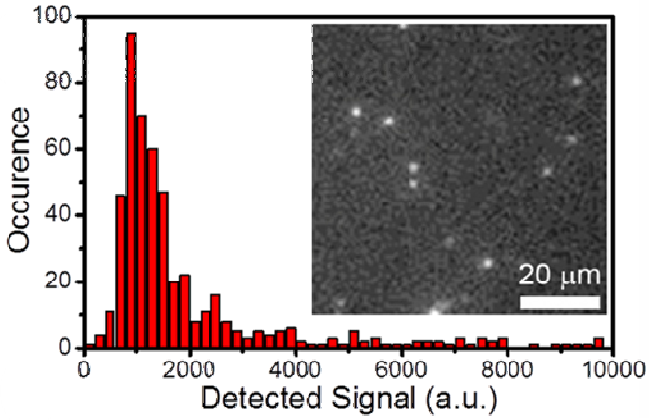


Figure 12. Cliché et profil de suivi de particule unique par fluorescence (λ^{ex} = 568 nm).

Cette dispersion de taille fine est confirmée par l'analyse des mouvements browniens des nanoparticules dans l'eau (figure 13). Cette technique permet de déterminer le coefficient de diffusion des nanoparticules qui est un paramètre dépendant de la viscosité du milieu, de la température, mais aussi de la taille des nanoparticules.

Ces analyses en solution sont très importantes, puisqu'elles indiquent que les FONs ne s'agrègent pas spontanément dans l'eau, comme peut le laisser supposer la microscopie électronique (figure 8) où des agrégats apparaissent.

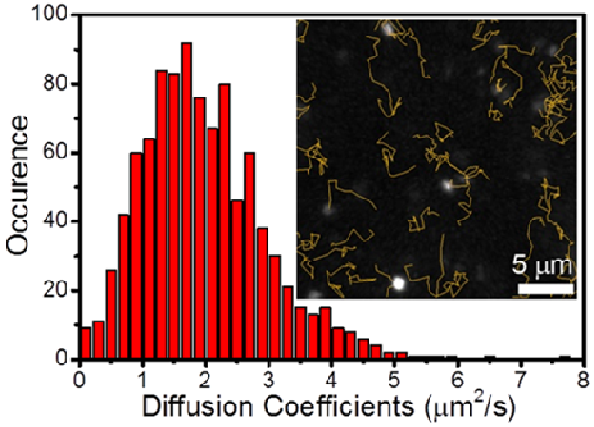


Figure 13. Distribution du coefficient de diffusion et reconstruction de la trajectoire des FONs dans l'eau.

Les mesures de photostabilité (figure 14) montrent que la photostabilité des FONs **D4** est très bonne pour un émetteur proche IR, et suit une loi biexponentielle décroissante avec le premier temps de vie de l'ordre de 6s (50%) et le second temps de vie situé à 40s (50%).

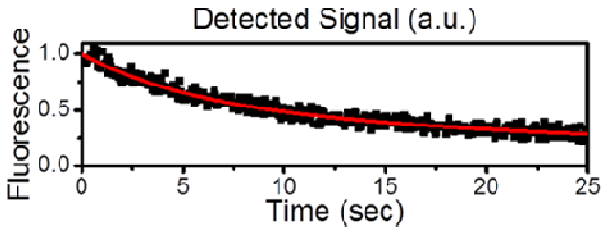


Figure 14. Photostabilité des FONs **D4** dans l'eau.

4.2 Imagerie cellulaire

La stabilité colloïdale et chimique des FONs **D4**, leur excellente brillance et photostabilité ainsi que leur émission dans l'IR, font de ces nanoparticules organiques une alternative intéressante aux semi-conducteurs classiquement utilisés. Afin de prouver l'utilité de ces nanoparticules, des cellules fibroblastes ont été mises en présence d'une solution diluée de FONs **D4** ([FONs]~0.1 nM). Après 24h d'incubation, la microscopie de fluorescence a permis de montrer que les FONs sont présentes à l'intérieur des cellules (figure 15). Les mesures de biocompatibilité ont montré que sur le temps d'incubation (24 h), aucun effet cytotoxique n'a été observé (l'activité mitochondriale et la membrane cellulaire restant intactes).

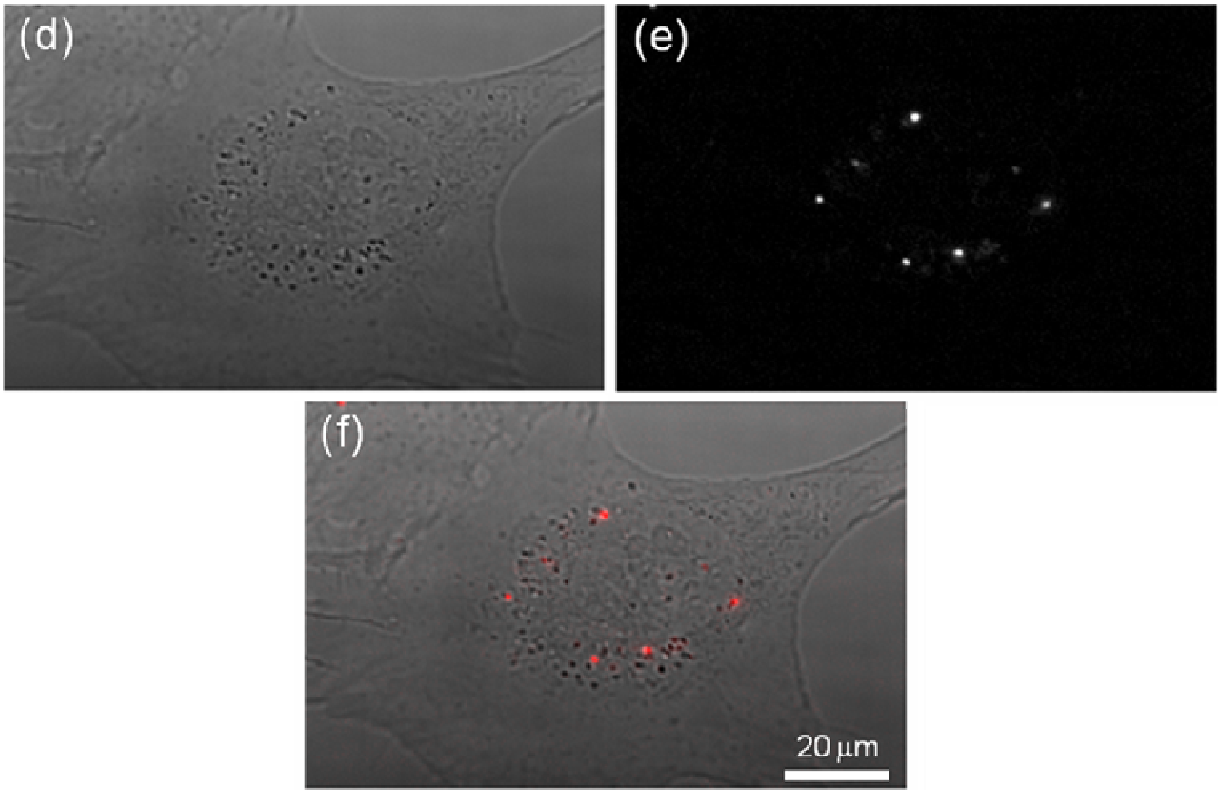


Figure 15. Imagerie de fluorescence de FONs **D4** incubées dans des fibroblastes.

Les résultats présentés dans cette section montrent que les FONs **D4** possèdent une bonne stabilité colloïdale et chimique, une excellente brillance et photostabilité pour un émetteur proche IR. Les mesures de biocompatibilité (figure 16) ont démontré la capacité qu'ont ces nanoparticules à pénétrer dans les cellules sans aucun impact sur celles-ci après 24 h d'exposition.

L'utilisation de MitoTracker (figure 16, images a2-c2) permet de montrer que l'activité cellulaire n'est pas modifiée dans l'échantillon témoin (figure 16, a2), ni dans les cellules contenant les FONs (figure 16, b2). Comme attendu, l'utilisation d'un tensio-actif fort comme le TritonX-100 induit la mort cellulaire par rupture de la membrane cytoplasmique. Pour cette raison, il n'y a pas de colocalisation entre le MitoTracker et le milieu cellulaire (figure 16, c2). Il est intéressant de remarquer que l'intensité de la fluorescence du MitoTracker est la même dans les cellules contrôles (figure 16, g1 et g2) et dans les cellules incubées avec les FONs (figure 16, h1 et h2), ce qui démontre que la présence des FONs ne perturbe pas l'activité des mitochondries.

L’intégrité de la membrane cytoplasmique est mesurée par l’utilisation d’iodure de propidium. Cette mesure montre clairement que les FONs (figure 16, e2) ne percent pas la membrane cellulaire, contrairement au tensio-actif TritonX-100 (figure 16, f2).

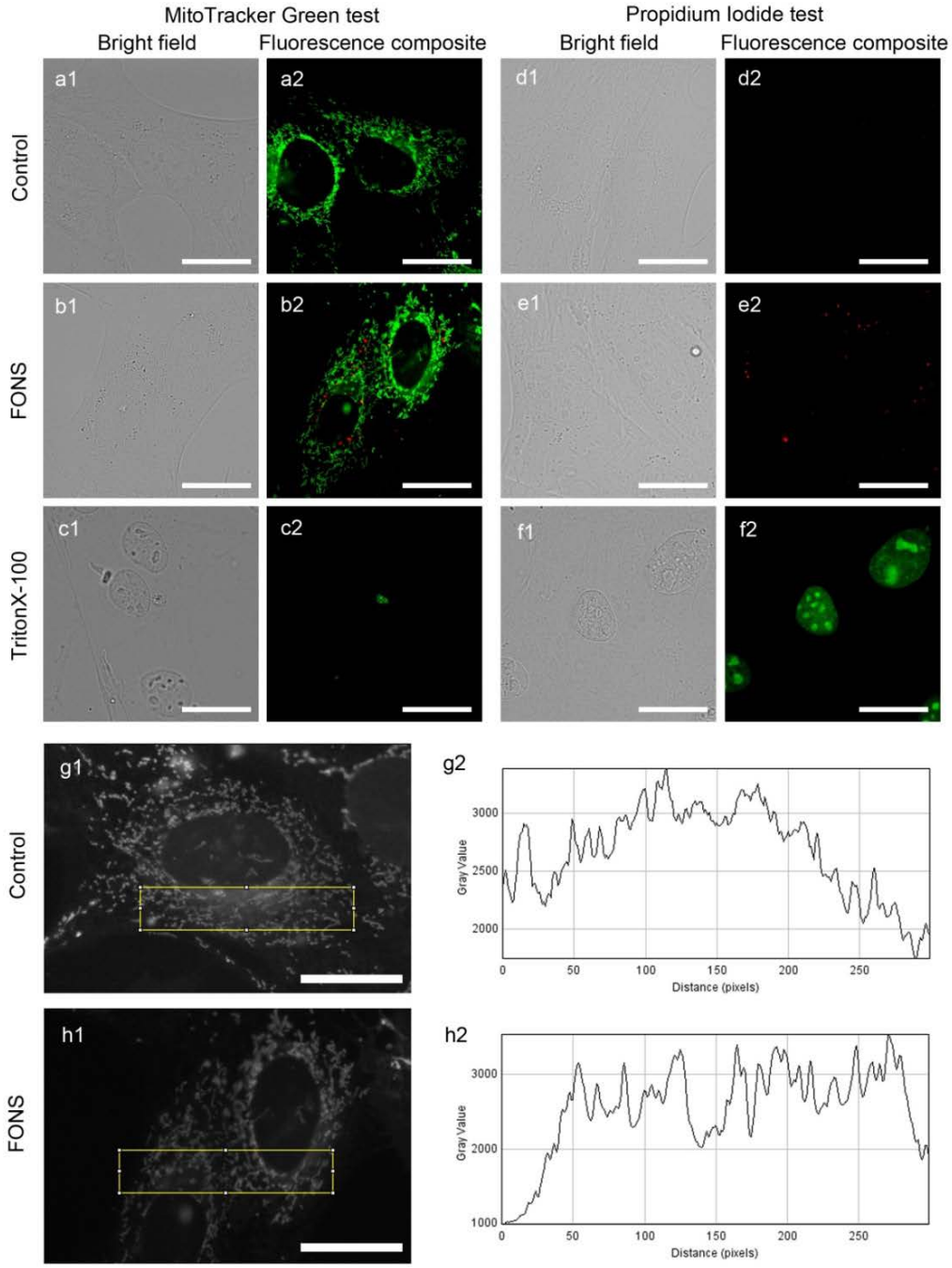


Figure 16. Mesure de biocompatibilité des FONs **D4** ([FONs] ~ 0.1 nM) dans des fibroblastes après 24h d’incubation.

Les caractéristiques exceptionnelles en termes de stabilité et de luminescence des FONs **D4**, prouvent que *via* un design moléculaire approprié, des nanoparticules préparées à

partir de molécules, peuvent devenir des candidats sérieux dans le but de fournir une alternative durable aux QDs toxiques et aux fluorophores commerciaux.

Références bibliographiques

[1] Genin, E.; Gao, Z.; Varela, J. A.; Daniel, J.; Bsaibess, T.; Gosse, I.; Groc, L.; Cognet, L.; Blanchard-Desce, M., "Hyper-bright" Near-Infrared Emitting Fluorescent Organic Nanoparticles for Single Particle Tracking. *Adv. Mater.* **2014,** *26*, 2258-2261.

[2] Wagnières, 3rd ESP Photobiology School. **2014**.

[3] Andersson-Engels, S., 3rd ESP Photobiology School. **2014**.

[4] Oheim, M.; Beaurepaire, E.; Chaigneau, E.; Mertz, J.; Charpak, S., Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *J Neurosci Methods* **2001,** *111*, 29-37.

[5] Mosk, A. P.; Lagendijk, A.; Lerosey, G.; Fink, M., Controlling waves in space and time for imaging and focusing in complex media. *Nat Photon* **2012,** *6*, 283-292.

[6] Vo-Dinh, T.; Editor, *Biomedical Photonics Handbook*. CRC Press LLC2003; p No pp. given.

[7] Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S., Bioimaging: Second window for in vivo imaging. *Nat Nano* **2009,** *4*, 710-711.

[8] Escobedo, J. O.; Rusin, O.; Lim, S.; Strongin, R. M., NIR dyes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010,** *14*, 64-70.

[9] Gorka, A. P.; Nani, R. R.; Schnermann, M. J., Cyanine polyene reactivity: scope and biomedical applications. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, Ahead of Print.

[10] Wiederschain, G. Y., *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. MAIK Nauka/Interperiodica2011; Vol. 76, p 1276.

[11] Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B., Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **2000,** *100*, 1973-2011.

[12] Territo, P. R.; Heil, J.; Bose, S.; Evans, F. J.; Balaban, R. S., Fluorescence absorbance inner-filter decomposition: the role of emission shape on estimates of free Ca2+ using Rhod-2. *Appl. Spectrosc.* **2007,** *61*, 138-147.

[13] McPhie, P., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. Joseph R. Lakowicz. *Anal. Biochem.* **2000,** *287*, 353-354.

[14] Moores http://cancer.ucsd.edu/research-training/shared-resources/microscopy/Pages/equipment.aspx.

[15] Zeiss http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html.

[16] Fluorescent Labels and Dyes. ATTO-TEC, Ed. ATTO-TEC2009.

[17] Bouteiller, C.; Clave, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A., Novel Water-Soluble Near-Infrared Cyanine Dyes: Synthesis, Spectral Properties, and Use in the Preparation of Internally Quenched Fluorescent Probes. *Bioconjugate Chem.* **2007,** *18*, 1303-1317.

Chapitre V – Synthèse et propriétés photophysiques de nouveaux chromophores quadripolaires

Chapitre V – Synthèse et propriétés photophysiques de nouveaux chromophores quadripolaires

1. Introduction

Bien que très prometteuses, les molécules dipolaires, présentent l'inconvénient de s'arranger antiparallèlement à l'état solide ou bien en solution à haute concentration (cf. chapitre II). Ce mode d'arrangement affecte profondément les propriétés photophysiques du chromophore (Φ_F, ε, etc.…). Il est donc nécessaire d'adapter le design moléculaire des dipôles vis-à-vis de leur environnement afin de préserver les propriétés de luminescence de la molécule. L'utilité d'adapter le design moléculaire des dipôles pour une utilisation dans un état confiné et concentré est exposée dans les chapitres II-IV. Une approche différente et plus originale consiste à utiliser des chromophores de type quadripolaires à la place de fluorophores dipolaires.

Pour simplifier, on peut considérer les quadrupôles moléculaires comme étant composés de deux dipôles moléculaires plus ou moins bien « alignés » et sont donc dénotées D-π-A-A-π-D ou A-π-D-D-π-A selon l'emplacement des groupements accepteurs et/ou donneurs. Le groupement central (A-A ou D-D) est souvent un cycle aromatique substitué ou non, pouvant jouer le double rôle d'accepteur ou de donneur d'électrons selon sa nature.[1-3]

Puisque le « cœur » du quadrupôle possède cette dualité, l'annotation D-π-A-A-π-D ou A-π-D-D-π-A -A permet d'identifier la nature du quadrupôle, à savoir un quadrupôle donneur (D-π-A-A-π-D) ou bien accepteur (A-π-D-D-π-A). Cette subtilité peut sembler anecdotique, cependant empiriquement, les quadrupôles donneurs présentent bien souvent une brillance à deux photons ($\sigma_2\Phi$) supérieure aux quadrupôles accepteurs.[2-4]

Dans le cas de quadrupôles possédant des groupements accepteurs forts (dicyano vinyle, thiobarbiturique, etc..), la faible valeur de $\sigma_2\Phi$ ne provient pas de l'absorption à deux photons qui est excellente, mais du rendement quantique de fluorescence très bas ($\Phi < 0.1$).[5] À l'opposé, les quadrupôles donneurs possèdent des valeurs d'absorption à deux photons élevées et des rendements quantiques de fluorescence élevés.[4-8]

Du fait de leur symétrie, les quadrupôles possèdent un moment dipolaire nul dans l'état fondamental. Cette caractéristique impacte fortement les propriétés d'absorption et d'émission de ces molécules. Comme le montre l'illustration 1, un quadrupôle moléculaire peut exister sous trois formes, une forme totalement neutre (N), et deux formes zwiterrioniques qui ont le même poids statistique (Zg et Zd).

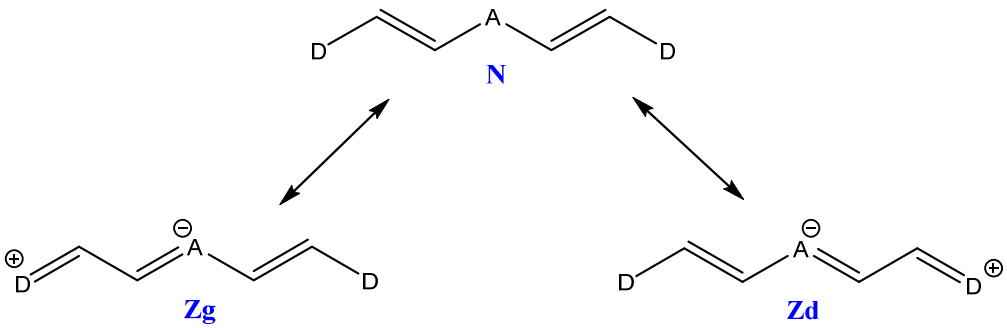


Illustration 1. Représentation des différentes formes d'un quadrupôle donneur.

Lors du processus d'excitation, dans certains cas (Zg et Zd), une délocalisation électronique peut s'opérer entre un groupement donneur et un groupement accepteur. Cette délocalisation électronique fait basculer le quadrupôle d'une forme à une autre, mais il est important de remarquer que les électrons sont délocalisés sur une des deux branches (D-A ou A-D) de la molécule.[9, 10] Ceci implique que dans certains cas, lors d'une excitation, la densité électronique est localisée sur une seule branche du quadrupôle. Néanmoins, dans la plupart des cas, la densité électronique dans l'état excité n'est pas répartie sur une seule branche, mais sur la molécule entière. Ainsi pour un nombre d'alternances simple liaison et double liaison identique et en présence d'accepteur ou de donneur de forces équivalentes, un chromophore quadripolaire présente un décalage hypsochrome de sa bande d'absorption par rapport à un dipôle (illustration 2).

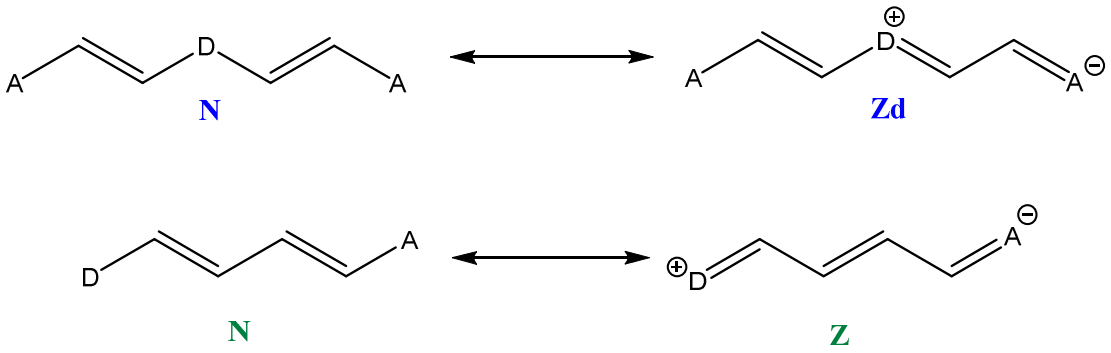


Illustration 2. Comparaison entre un dipôle (bas) et un quadrupôle (haut) de même longueur de système π conjugué et de même force d'accepteur.

Alors que le nombre d'insaturations dans le dipôle et le quadrupôle est le même, le nombre d'insaturations participant à la délocalisation électronique pendant l'absorption et l'émission est plus faible pour le quadrupôle (dans le cas ou une seule branche porte l'exciton); or plus la longueur du système π conjugué, impliqué dans l'absorption est importante, plus les bandes d'absorption sont décalées vers le rouge.

À l'inverse, considérant un dipôle (D-A) de composition identique à une des deux branches d'un quadrupôle (D-AA-D), la bande d'absorption de plus basse énergie du quadrupôle peut être plus décalée vers le rouge que celle du dipôle s'il existe un couplage interbranches au sein du quadrupôle.[30]

Ainsi, le décalage vers le rouge de chromophores quadripolaires requiert un allongement important des systèmes π conjugués, augmentant considérablement la masse molaire et le risque d'interaction intermoléculaires entre les chromophores (illustration 3). Principalement pour cette raison, les fluorophores quadripolaires sont peu utilisés en imagerie de fluorescence classique, au profit de fluorophores dipolaires (cyanines, rhodamine, etc.…).

Cependant, le terrain de jeux des quadrupôles n'est pas l'optique linéaire classique. Les molécules quadripolaires possèdent une hyperpolarisabilité du second ordre (γ) très importante. Or l'absorption à deux photons est une branche de l'optique non linéaire fortement dépendante de γ, comme le montre l'équation 1. Ces systèmes moléculaires sont donc, de par leur symétrie, de bons absorbeurs à deux photons, ce qui, dans le cas de quadrupôles fluorescents, est très intéressant pour l'imagerie dans les tissus biologiques ou dans les milieux diffusants.

$$\sigma_2(\omega) \propto Im[\gamma(\omega)]$$

Équation 1. Relation entre la section efficace d'absorption à deux photons σ_2 et l'hyperpolarisabilité cubique γ.[10]

Il est donc important de développer de nouveaux quadrupôles fluorescents possédant des brillances à deux photons élevées ainsi qu'une émission compatible avec la fenêtre biologique (600-1200 nm) pour l'imagerie *in vivo*.

2. Design moléculaire

Les quadrupôles étant destinés à être confinés sous forme de nanoagrégats, il est important d'éviter les interactions intermoléculaires défavorisant la fluorescence des fluorophores. Il est donc nécessaire de proposer un design moléculaire apte à détourner l'agencement des fluorophores de leur tendance naturelle à s'empiler face à face ou bien de manière antiparallèle.

L'absence de moment dipolaire des quadrupôles est attendue pour atténuer les interactions intermoléculaires antiparallèles dans les milieux concentrés/confinés. Cependant, le décalage vers le rouge impose une élongation du système π conjugué ainsi que l'utilisation de groupements accepteurs/donneurs forts. Ces éléments peuvent amener les chromophores quadripolaires à s'associer face à face conduisant à la formation de dimères (illustration 3).

La formation de dimère conduit généralement à une baisse des performances du chromophore (augmentation du knr, décalage vers le bleu, etc..). Il est donc nécessaire d'adapter le design moléculaire des quadrupôles en vue de leur utilisation en milieu confiné/concentré comme à l'état de nanoagrégats.

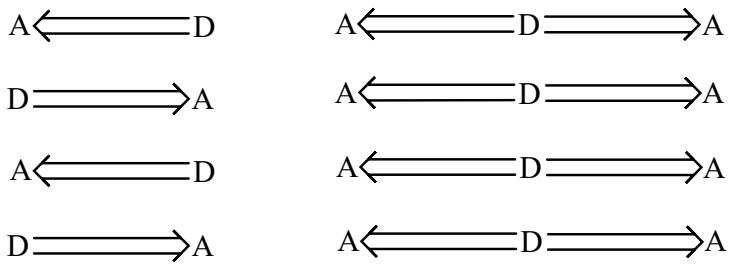


Illustration 3. Représentation de l'arrangement probable de dipôles (gauche) et quadrupôles accepteurs (droite).

L'augmentation de l'encombrement stérique du chromophore via l'intégration de groupements encombrants est une stratégie qui a montré son efficacité sur les chromophores dipolaires (cf. chapitre II-IV). Ces groupements volumineux qui éloignent les molécules les unes des autres sont « facilement » intégrables à la molécule (d'un point de vue synthétique) et pour cette raison se sont imposés comme la solution la plus simple et rapide.

Bien entendu, il est important de conserver la symétrie propre aux quadrupôles et donc il est nécessaire que le groupement encombrant n'induise pas de rupture de symétrie (ce qui modifierait fortement ces propriétés photophysiques) de l'état fondamental.

Cette précaution implique que le groupement encombrant doit se situer sur un axe/plan de symétrie de la molécule. Partant de ce constat, deux stratégies sont envisageables ; la première est de fixer les groupements encombrants de chaque côté de la molécule (illustration 4), et la seconde est de mettre un seul groupement encombrant au centre (symétriquement parlant) de la molécule.

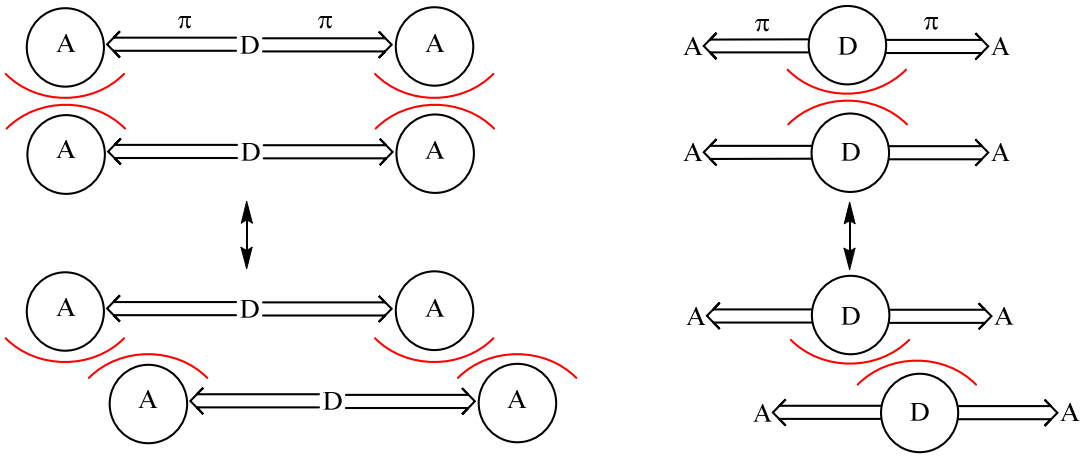


Illustration 4. Représentation de l'encombrement généré au sein d'un quadrupôle de type accepteur selon l'emplacement des gardes (groupements encombrants).

L'utilisation de gardes devrait diminuer les interactions entre les systèmes, π quelle que soit la position de ces groupements (illustration 4); du point de vue synthétique, les deux modèles sont tout à fait envisageables et simples à mettre en place. Cependant, l'emploi de deux gardes augmente « inutilement » la masse molaire du chromophore et peut entraîner une forte insolubilité du composé dans les solvants organiques selon leur composition.

Un second avantage à l'utilisation d'une garde unique concerne la nature du cœur des quadrupôles. En effet, des travaux antérieurs au sein du laboratoire ont montré que le fluorène est un excellent noyau pour la préparation de chromophores quadripolaires absorbants à deux photons. Sa forte planéité assure une bonne communication électronique ainsi que des couplages forts entre les différentes branches du chromophore. La présence d'un pont méthylène fonctionnalisable est un atout essentiel pour moduler la solubilité ainsi que les interactions interfaciales du fluorène.

Des résultats empiriques tendent à démontrer que la fonctionnalisation du pont méthylène n'interfère pas avec les propriétés optiques du chromophore, comme le montre la substitution des deux hydrogènes par des chaînes butyles[11] et nonyles.[2] Cette tendance est d'ailleurs vérifiée dans ce chapitre lorsque la comparaison entre différentes substitutions du pont méthylène est étudiée.

Puisque les molécules quadripolaires ne possèdent pas de moment dipolaire à l'état fondamental, contrairement aux dipôles, l'arrangement moléculaire au sein des FONs ne peut être influencé par la polarisabilité des chromophores environnants. L'organisation moléculaire est donc régie par d'autres types d'interactions (électrostatique, Van der Walls, π-stacking, etc.…). Il est donc nécessaire de déterminer quel type d'interactions prédomine dans les FONs et comment le chimiste peut moduler cette organisation.

Une étude systématique de l'influence des groupements terminaux (accepteurs ou donneurs), du système π conjugué ainsi que de la garde doit permettre de mieux identifier comment les propriétés d'absorption et d'émission de ces FONs sont influencées par le design moléculaire (schéma 1).

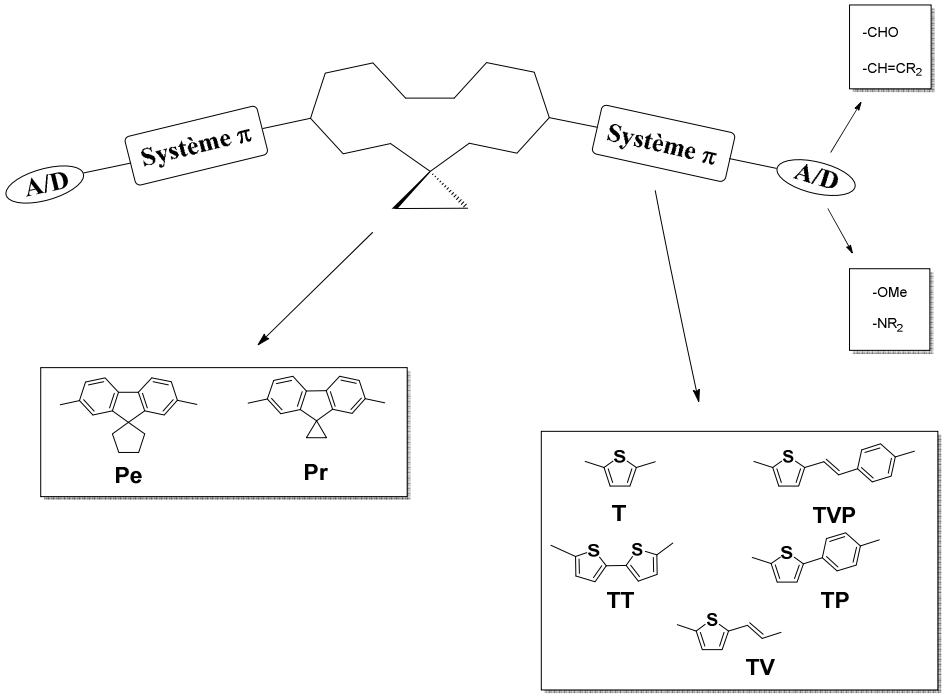


Schéma 1. Design général des quadrupôles.

Dans cette optique, nous avons décidé de tester différents groupes donneurs et attracteurs (-OMe, -NR_2/-CHO, -$CH=CR_2$), choisis pour leur fort caractère donneur ou accepteur (d'après leur constante de Hammett)[12].

Comme expliqué précédemment, le choix d'utiliser des groupements donneurs et accepteurs forts, doit permettre de décaler les bandes d'absorption et d'émission des quadrupôles vers le rouge. Le second effet attendu pour ces groupements est une réponse d'ADP (Absorption à Deux Photons) forte,[10] issue d'un réarrangement électronique important durant l'excitation.

En plus du choix des groupements donneur/accepteur, la sélection d'un système π conjugué est cruciale dans le design de fluorophores quadripolaires. Les hétérocycles aromatiques de type thiophène sont des connecteurs π très performants en terme de délocalisation électronique et pour cette raison sont largement utilisés dans le design de molécules nécessitant un transfert de charges (OLED,[13-16] fluorophores,[3, 17-20] semi-conducteurs[18, 21-23] et absorbeurs à deux photons[3, 15, 19, 24]).

Giershner et al.[20] ont montré que des nanoparticules à base d'oligothiophène présentaient un fort degré d'alignement des molécules, ayant pour conséquence l'apparition d'un couplage excitonique fort entre les molécules au sein de la nanoparticule. Cette orientation particulière induit une baisse significative du rendement quantique de fluorescence des nanoparticules. À l'opposé, des nanoparticules à base d'oligovinylphényl avec un désordre moléculaire plus important présentent des propriétés photophysiques plus proches des molécules en solution.[25]

Cette observation démontre que le contrôle des interactions intermoléculaires au sein des nanoparticules est primordial pour le contrôle des propriétés photophysiques de celles-ci (chapitre II). Afin d'explorer l'impact de l'ordre et du désordre moléculaire au sein de nanoparticules sur leurs propriétés photophysiques et leur ADP, des connecteurs de type vinylphényl et phényl sont utilisés dans la préparation des quadrupôles.

Le motif de garde sélectionné est un cycle aliphatique composé de 3 (Pr) ou 5 (Pe) carbones. Le choix d'un cycle aliphatique est motivé par le fait que celui-ci permet de diminuer la solubilité des chromophores dans l'eau (nécessaire pour une bonne stabilité des

nanoparticules) et génère un encombrement local très important. Cet encombrement étant restreint au cœur fluorène, peu de désordre moléculaire est attendu lors du confinement des chromophores dans les nanoparticules, ce qui devrait participer à une meilleure stabilité de ces dernières.

Le choix de la taille des cycles (3 et 5) est issu d'une volonté d'étudier l'influence de deux cycles de tension variables sans contraintes majeures au niveau de la synthèse. La flexibilité des cycles ainsi que l'encombrement local important qu'ils génèrent sont attendus pour moduler les interactions intermoléculaires dans les nanoparticules et donc affecter leur fluorescence.

3. Synthèse des quadrupôles à base d'accepteurs aldéhydes

3.1 Synthèse du cœur fluorène

Le cœur fluorène est obtenu via une double iodation sur les positions 2 et 7 du fluorène commercial. Cette iodation nécessite l'emploi d'un électrophile fort (I_3^+) obtenu par l'ajout de diiode dans une solution d'acide periodique. Une fois recristallisé, le fluorène diiodé **2** est obtenu avec un rendement de 85% sur une échelle de l'ordre de la dizaine de grammes.

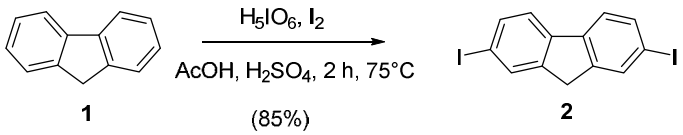


Schéma 2. Synthèse du 2,7-diiodo fluorène.

L'ajout des gardes sur le pont méthylène de **2** se fait par une simple substitution nucléophile du pont méthylène sur le dibromoalcane correspondant, suivi d'une cyclisation intramoléculaire via la substitution du second brome. Cette réaction s'effectue par catalyse en transfert de phase en condition basique. Classiquement, l'alkylation du pont méthylène se fait dans le toluène (**3**)[26] cependant le composé **4** n'a pas pu être obtenu en utilisant ce protocole d'alkylation. Cette alkylation est décrite dans la littérature en utilisant le DMSO à température ambiante comme conditions de solvant et de température.[27]

Une possible explication est la formation rapide de bromure de vinyle (par β élimination) qui polymérise dans le milieu réactionnel et/ou s'évapore rapidement ($T_{éb}$~16°C). Cette réaction parasite consomme le réactif avant qu'il n'interagisse avec le carbanion du fluorène. Or le DMSO est un solvant polaire protique qui accélère la substitution nucléophile et donc permet au carbanion du fluorène de réagir plus rapidement avec le dibromoéthane. De cette façon le composé **4** est obtenu avec un rendement de 52% et le composé **3** avec un rendement de 80%.

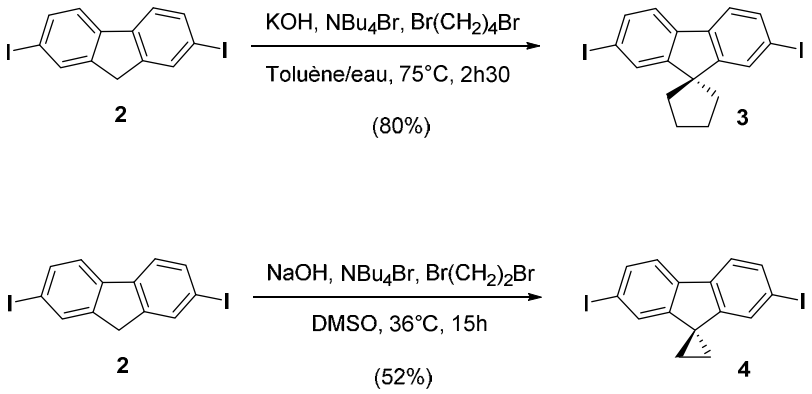


Schéma 3. Incorporation des gardes propyles et pentyles.

Notre approche synthétique étant de type bottom-up, les bras des chromophores ne sont pas assemblés au préalable, mais construits sur le cœur fluorène.

3.2 Synthèse des composés **5** et **6**

Un couplage croisé de type Corriu-Kumada est effectué sur le cœur **3** en présence de palladium et de bromure de thienylmagnésium (a) dans le THF. Pour des raisons pratiques et de stabilité évidente du magnésien, le bromure de thienylmagnésium est préparé juste avant la réaction puis est ajouté sur le cœur **3**. Après cristallisation, le composé **5** est obtenu sous forme de cristaux, à l'échelle du gramme avec un rendement de 75%.

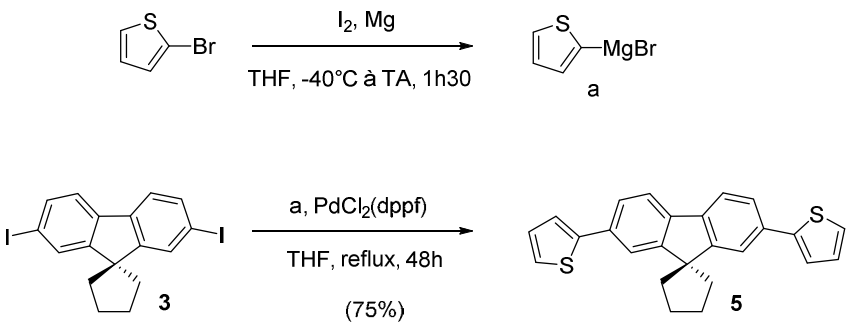


Schéma 4. Synthèse du chromophore 5.

La préparation des fragments bis-bithienyl se fait par un couplage de type Suzuki-Miyaura sur le cœur **3** en présence de l'ester boronique correspondant et de palladium en milieu basique. L'utilisation de dérivé boronique est une approche plus saine que l'utilisation de magnésien pour l'incorporation de motifs bithienyl ; dans la littérature les motifs oligothiophènes sont préparés soit à partir de magnésien en utilisant de la catalyse au nickel, soit en utilisant le couplage de Stille (utilisation de dérivés stanniques).

Le catalyseur utilisé ($PdCl_2$dppf) est un catalyseur encombré et riche en électrons, ce qui permet de faciliter (et donc d'accélérer) les phases d'insertion et d'élimination lors du cycle catalytique. Le composé **6** est obtenu après purification avec un rendement de 97%.

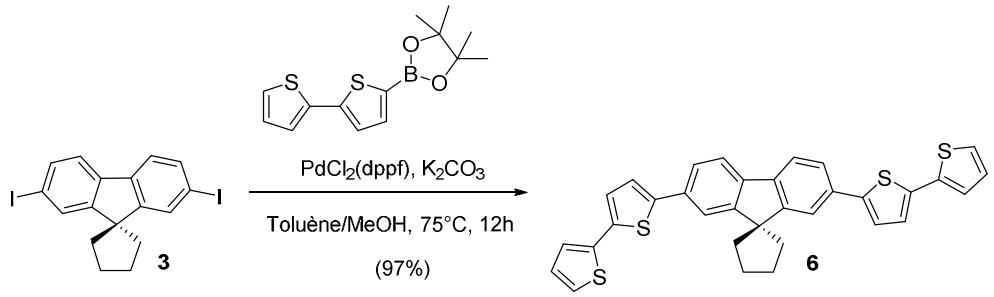


Schéma 5. Synthèse du chromophore 6.

3.3 Synthèse des aldéhydes **7** et **8**

Un premier test de formylation du composé **5** via une formylation de type Vilsmeier-Haack a été expérimenté sur le cœur **3** afin de conduire au composé **7**. Cependant, après purification, le produit souhaité n'est obtenu qu'avec un très faible rendement (4%), alors que les composés majoritaires sont le composé monoformyle et le produit de départ **5**. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par une désactivation de la nucléophilie du thiophène lorsque la première formylation a lieu, ce que diminue fortement la cinétique de la réaction. Une alternative plus efficace et plus simple à mettre en œuvre est l'utilisation d'un couplage de Suzuki à partir d'un thiophène déjà formylé.

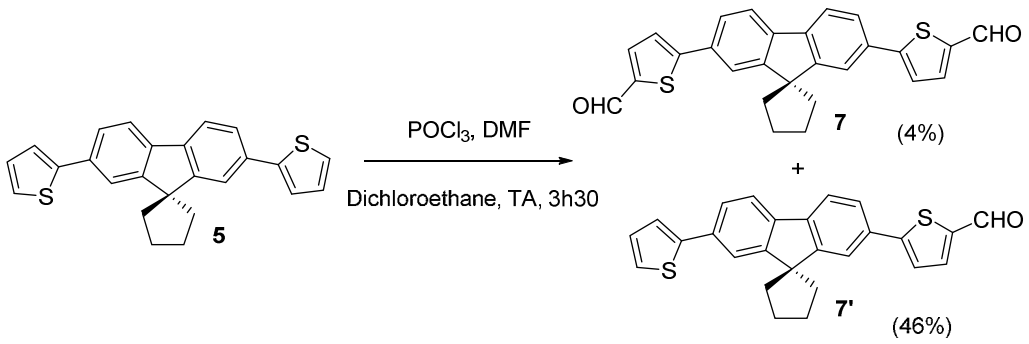


Schéma 6. Mono et bisformylation du chromophore **5**.

En vue d'obtenir à grande échelle et facilement les premiers accepteurs -CHO, les cœurs **3** et **4** sont engagés dans une réaction pallado-catalysée de type Suzuki-Miyaura, en présence de l'acide 5-formyl-2-thienyl boronique commercial et de K_2CO_3. Après cristallisation, le chromophore **7** est obtenu avec un rendement de 77% à l'échelle du gramme. Cependant, probablement dû à une mauvaise solubilité du cœur, l'obtention de **8** se fait avec un rendement faible de 25% après colonne.

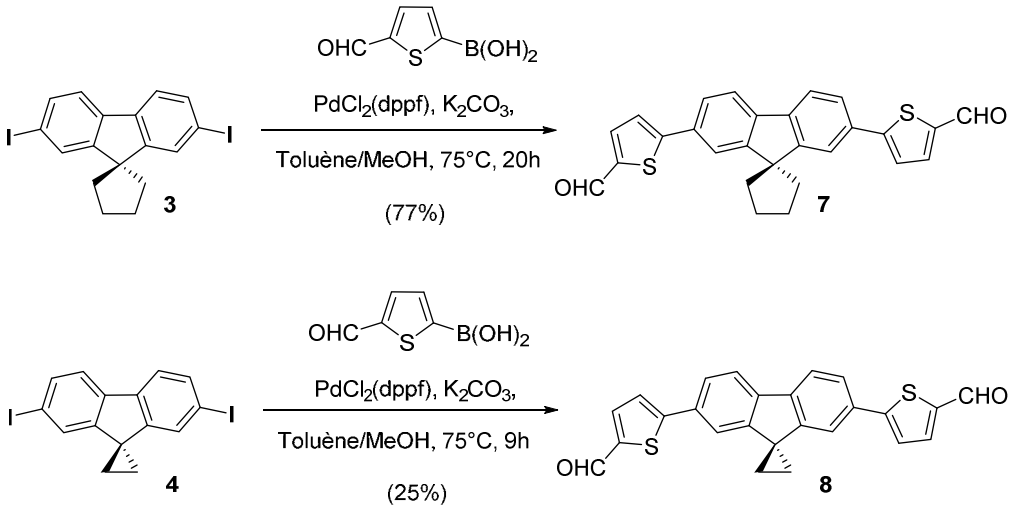


Schéma 7. Synthèse des bisaccepteurs CHO **7** et **8**.

3.4 Synthèse des aldéhydes **10** et **11**

Afin de pouvoir étudier l'influence du système π sur les propriétés photophysiques du chromophore et des FONs résultantes, un dérivé de **7** possédant un motif phényle est préparé. L'augmentation de la longueur du système π entraînant bien souvent une chute de la solubilité des composés, un dérivé plus long issu de **8** n'a pas été envisagé au vu de sa mauvaise solubilité dans les solvants organiques.

Pour obtenir le composé **10**, une bis-iodation du composé **5** est effectuée en milieu acide à l'aide de N-iodosuccinimide en vue d'obtenir le composé **9** avec un rendement quasi quantitatif.

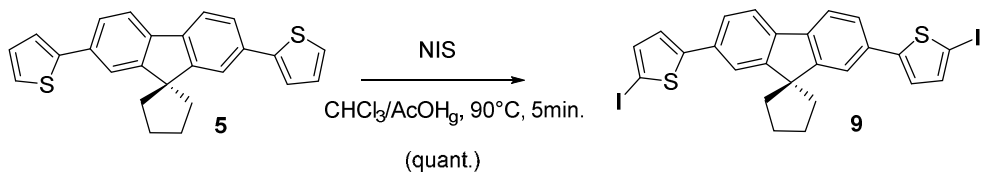


Schéma 8. Bis-iodation du chromophore **5**.

Le composé **9** est ensuite engagé dans un couplage de Suzuki-Miyaura avec l'acide 4-formylphenyl boronique commercial, dans des conditions similaires à la préparation de **7** et **8**. Après purification, le composé **10** est obtenu avec rendement de 28%.

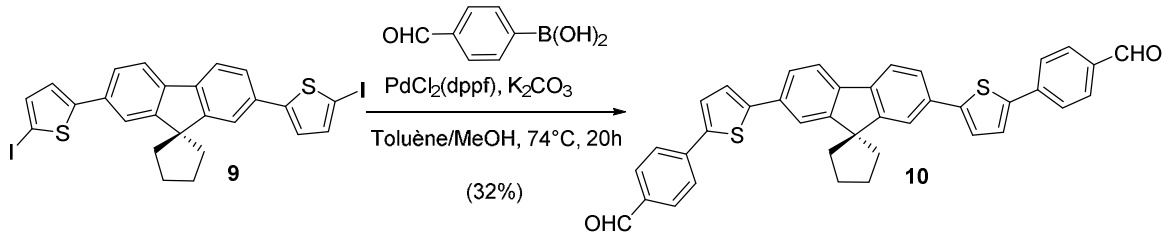


Schéma 9. Synthèse du bisaccepteur CHO **10**.

Un composé similaire à **10** est synthétisé pour étudier l'influence du type de cycle aromatique utilisé sur le chromophore. Le composé **11** est obtenu par un couplage de Suzuki-Miyaura mettant en présence le cœur **3** et l'acide 5'-formyl-2,2'-bithienyl-5-boronique dans les conditions précédemment décrites. Malgré la très mauvaise solubilité du composé **11**, celui-ci est obtenu après purification avec un rendement correct de 47%.

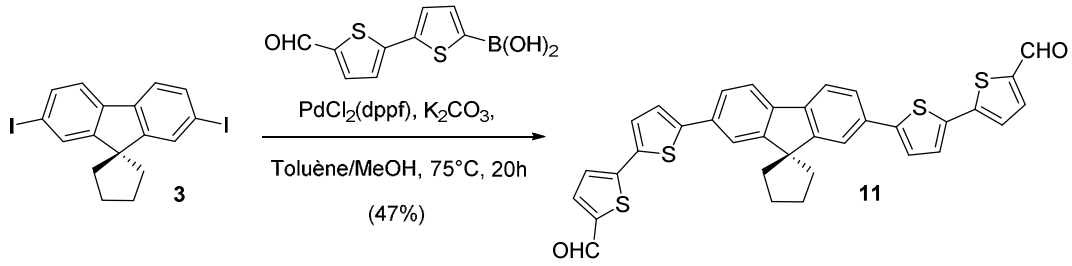


Schéma 10. Synthèse du bisaccepteur CHO bithienyl **11**.

4. Propriétés photophysiques des quadrupôles aldéhydes en solution

4.1 Solvatochromie des aldéhydes **7**, **8**, **10** et **11**

L'étude des propriétés d'absorption et d'émission des chromophores en solution dans des solvants de polarités différentes montre que les quadrupôles accepteurs aldéhyde (**7**, **8**, **10**, **11**) absorbent et émettent dans le visible.

Il est tout à fait intéressant de noter que ces chromophores présentent un solvatochromisme positif dans l'état excité, caractérisé par un déplacement bathochrome de la bande d'émission à mesure que la polarisabilité du milieu augmente (figure 1). Ceci indique que le chromophore est sensible à la polarité de son environnement dans l'état excité. Or pour

des raisons de symétrie, un quadrupôle ne possède pas de moment dipolaire et n'est donc pas sensible aux variations des champs électriques locaux.

Cette singularité déjà reportée dans la littérature[28-33] a été décrite comme étant le fait d'une rupture de symétrie du quadrupôle dans l'état excité.[9] Cette rupture de symétrie s'explique par le fait que lors de l'excitation du quadrupôle, une des deux branches subit un réarrangement électronique important, et donc la symétrie entre les branches est rompue (figure 2) et donc un moment dipolaire apparaît. Tout comme les dipôles moléculaires, ce dipôle induit par rupture de la symétrie est sensible à l'environnement électrique local, et donc à la polarité locale. Puisque ce processus n'a pas de mémoire, le moment dipolaire induit disparaît lorsque la molécule revient à l'état fondamental.

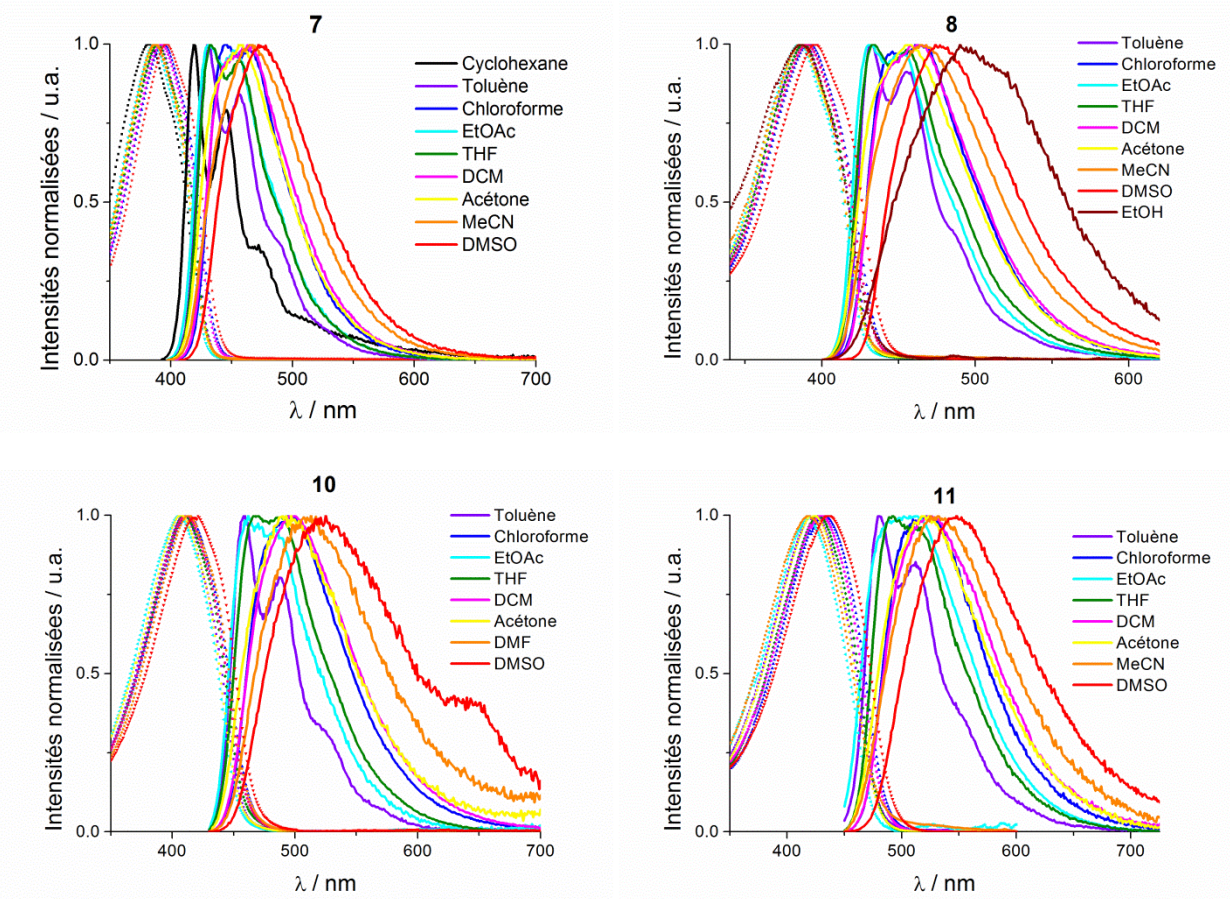


Figure 1. Absorption et émission des quadrupôles **7**, **8**, **10**, **11** dans différents solvants organiques.

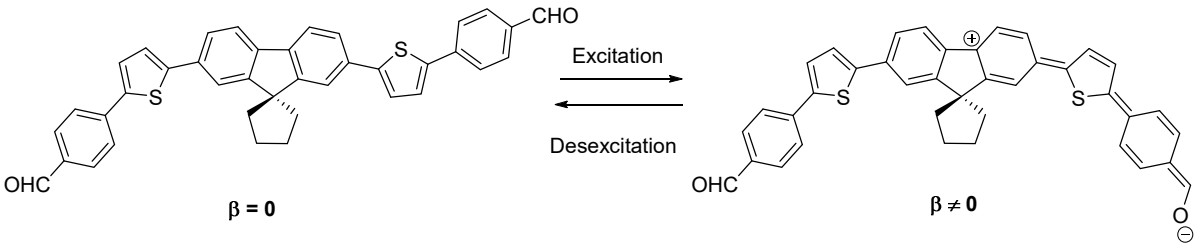


Figure 2. Représentation de la rupture de symétrie pour le chromophore **10**.

L'étude de la solvatochromie des composés **7** et **8** permet de valider expérimentalement que la substitution du pont méthylène du fluorène n'affecte pas les propriétés d'absorption et d'émission (tableau 1, figure 1). Naturellement, l'élongation du système π conjugué permet de décaler l'absorption et l'émission des chromophores **10** et **11** vers le rouge. Cet effet s'accompagne d'un hyperchromisme (ε^{max}) et d'une baisse de la luminescence (Φ_F), conséquences courantes d'une extension du système π.

Tableau 1. Propriétés d'absorption et d'émission des chromophores en solution dans le THF.

	λ_{abs}^{max}	ε^{max} *a)*	λ_{em}^{max}	Stokes' shift	Φ_F *b)*	τ *c)*	k_r *d)*	k_{nr} *e)*
	nm	$mol.L^{-1}.cm^{-1}$	nm	cm^{-1}		ns	ns^{-1}	ns^{-1}
7	388	$6.0\ 10^4$	433	2 700	0.65	0.9	0.7	0.4
8	388	$6.0\ 10^4$	434	2 700	0.62	0.9	0.7	0.4
10	410	$6.3\ 10^4$	467	3 000	0.80	1.0	0.8	0.2
11	427	$7.3\ 10^4$	491	3 000	0.53	0.8	0.6	0.6

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la quinine bisulfate dans H_2SO_4 1N ou la rhodamine 6G dans l'éthanol. *c)* Temps de vie de fluorescence. *d)* Constante de temps radiative. *e)* Constante de temps non radiative.

En comparant les chromophores **10** et **11**, il ressort que l'utilisation de système bithiophène permet un meilleur décalage des propriétés photophysiques vers les grandes longueurs d'onde. Ceci s'explique par la plus faible aromaticité du thiophène vis-à-vis du benzène, ce qui nécessite moins d'énergie pour passer d'une forme de résonnance à une autre.

A contrario, le chromophore **10** présente un rendement quantique de luminescence plus important, ce qui traduit une plus grande rigidité de l'état excité (k_{nr} plus faible). Pour cette raison, le choix du système π conjugué est affaire de compromis ; hyperchromisme et déplacement bathochrome plus importants des bandes d'absorption et d'émission, ou bien brillance plus élevée.

4.2 Absorption à deux photons des aldéhydes **7**, **8**, **10** et **11**

Afin de caractériser l'activité d'ONL des quadrupôles aldéhydes, l'absorption à deux photons des chromophores **7**, **8**, **10** et **11** est mesurée dans le THF (**7**, **8** et **11**) ou dans le chloroforme (**10**).

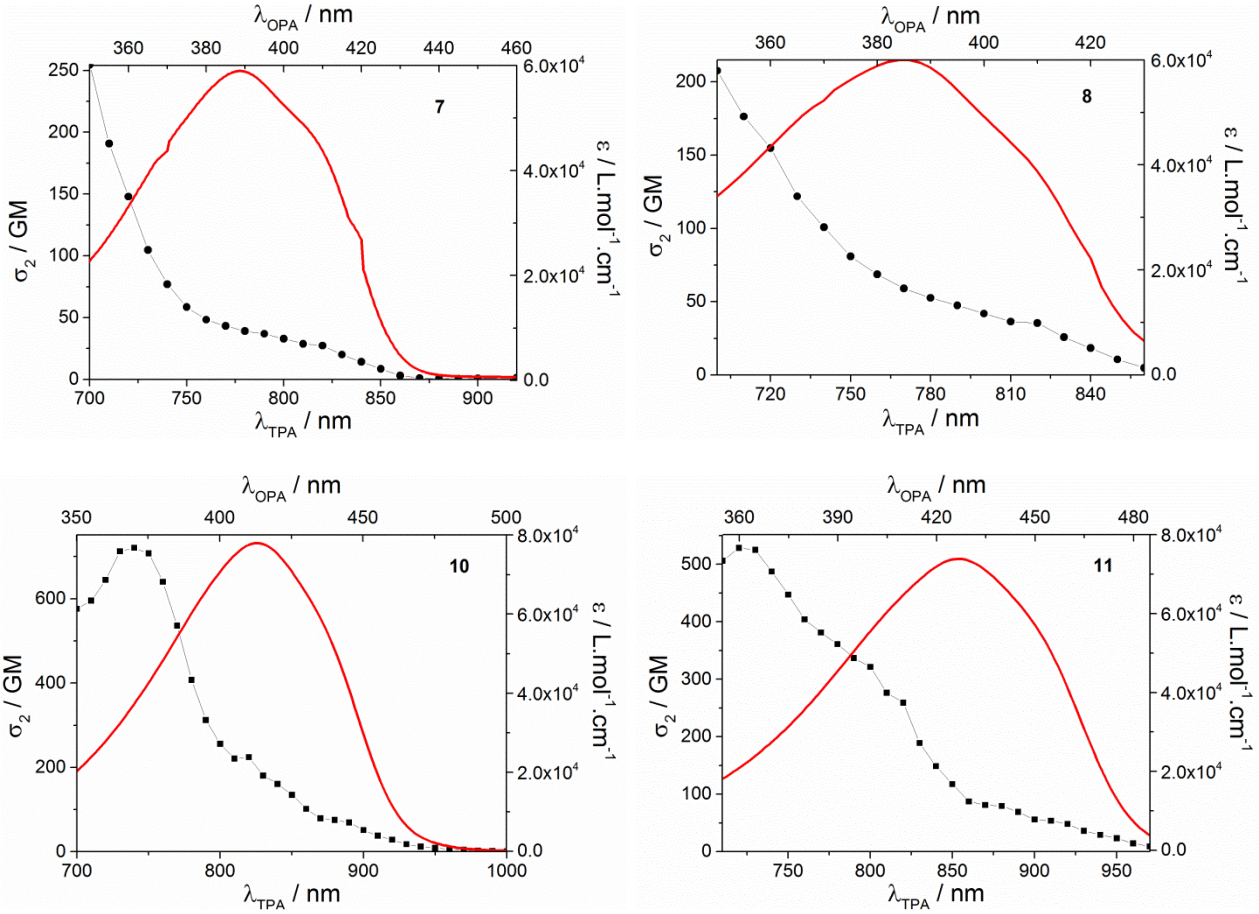


Figure 3. Spectres d'absorption à un photon normalisés en ε (trait rouge) et d'absorption à deux photons normalisés en σ_2 (points noirs) des quadrupôles **7**, **8**, **10** et **11** en solution dans le THF (**7**, **8**, **11**) et le chloroforme (**10**).

L'analyse des spectres d'absorption à deux photons (tableau 2) montre que ces chromophores quadripolaires sont d'excellents absorbeurs à deux photons dans la gamme 700-900 nm. Une légère différence de σ_2 apparaît entre les deux chromophores **7** et **8**, certainement dû à une surestimation de la concentration de **8** via la formation de microagrégats.

Il est intéressant de remarquer que contrairement à l'absorption à un photon, l'échange d'un phényle (**10**) par un thiophène (**11**) conduit à un décalage bathochrome du maximum

d'absorption. Cette observation s'étend à la valeur du σ_2^{max} qui est supérieure dans le cas de **10**.

Néanmoins, ces observations doivent être interprétées avec précaution puisque l'ADP des composés **10** et **11** n'est pas faite dans les mêmes solvants. Or les valeurs d'epsilon de **10** dans le chloroforme et le THF montrent une différence importante (ε_{THF}^{410} = 63 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ et $\varepsilon_{CHCl3}^{413}$ = 78 000 $M^{-1}.cm^{-1}$), indiquant que le chloroforme favorise la transition S_0-S_1. Il est donc probable que le chloroforme affecte aussi la transition S_0-S_2 et par conséquent la valeur de σ_2.

Tableau 2. Propriétés d'absorption à deux photons des chromophores **7**, **8**, **10** et **11** en solution dans le THF et dans le chloroforme.

	Solvant	$2\lambda_{abs}^{max}$ nm	λ_{2PA}^{max} nm	σ_2^{max} *a)* GM	λ_{2PA}^{max2} nm	σ_2^{max2} *b)* GM	Φ_F *c)*
7	THF	776	<700	>254	790	37	0.65
8	THF	776	<700	>207	790	47	0.62
10	$CHCl_3$	826	740	720	840	161	0.83
11	THF	854	720	528	870	81	0.53

a) Section efficace d'absorption à deux photons mesurée à λ_{2PA}^{max}. *b)* Section efficace d'absorption à deux photons mesurée à λ_{2PA}^{max2} (1 GM = 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$). *c)* Rendement quantique de fluorescence.

Il est frappant de remarquer que pour les quatre composés, les maximums d'absorption par excitation mono et biphotonique ne correspondent pas (figure 3, tableau 1). Cette absence de correspondance entre les maximums d'absorption à un et deux photons est caractéristique des systèmes quadripolaires.[34]

En effet, contrairement aux dipôles, la transition électronique S_0-S_1 n'est pas autorisée en absorption à deux photons pour des raisons de symétrie alors que la transition S_0-S_2 qui est interdite en absorption à un photon devient autorisée en ADP.[29]

Curieusement, les spectres d'ADP présentent des épaulements assez proches des longueurs d'onde $2\lambda_{abs}^{max}$ avec des valeurs de σ_2 beaucoup plus faibles que pour la transition autorisée. Ces épaulements sont probablement dus à la transition S_0-S_1 comme la montre la figure 4, qui bien qu'interdite est tout de même possible (d'où la valeur de σ_2 plus faible).

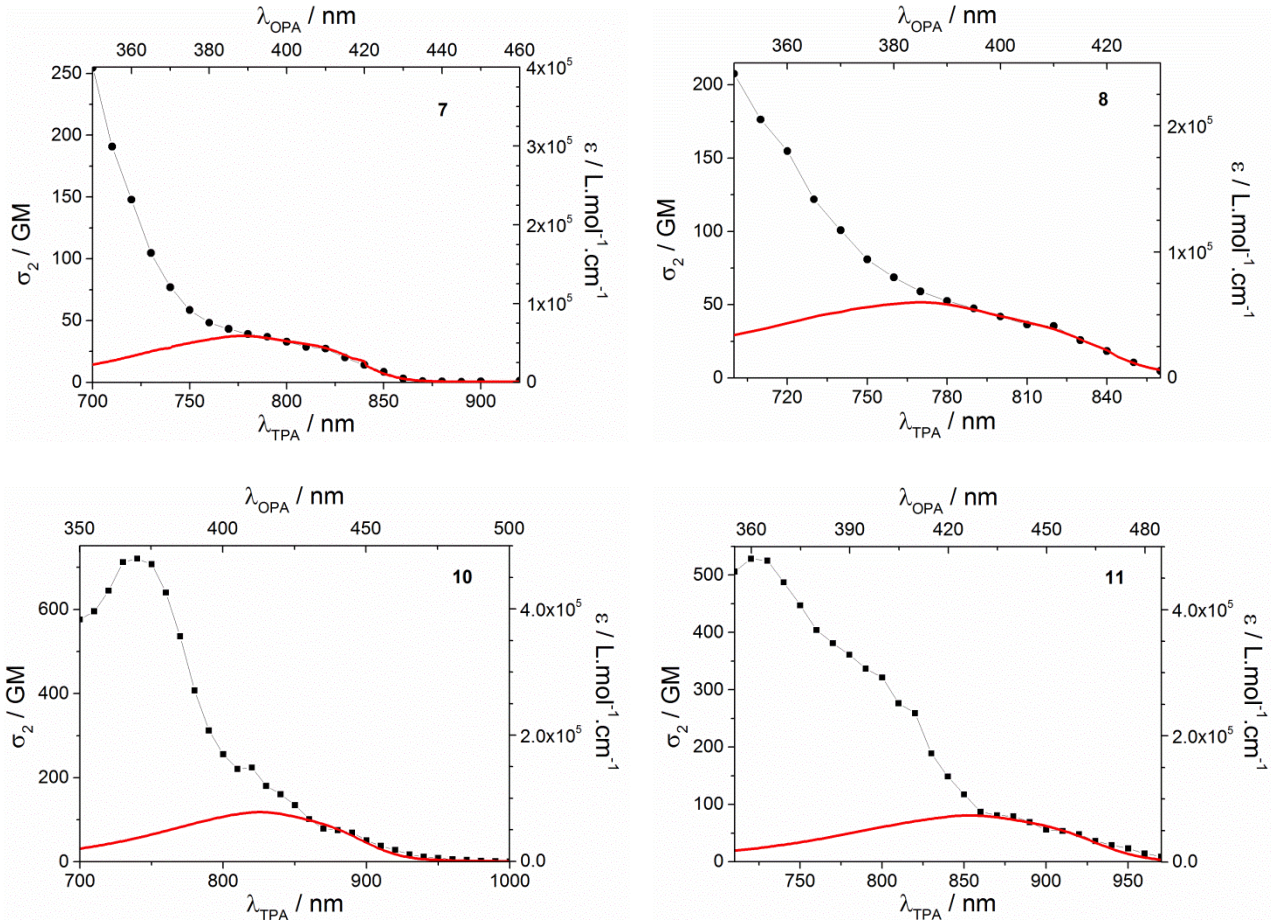


Figure 4. Spectres d'absorption à un et deux photons des chromophores **7**, **8**, **10** et **11** en solution dans le THF (**7**, **8**, **11**) et le chloroforme (**10**). L'échelle de l'absorption à un photon est modifiée pour correspondre aux seconds maxima de l'absorption à deux photons.

Les quadrupôles aldéhydes présentent des sections efficaces d'absorption à deux photons importantes pour de « petites » molécules. Dans le but d'accentuer le transfert de charge au sein des quadrupôles, des accepteurs plus forts sont utilisés à la place des fonctions aldéhydes des chromophores **7** et **8**. Cette augmentation du transfert doit permettre de décaler les propriétés photophysiques vers le rouge ainsi que d'augmenter la probabilité des transitions électroniques (S_0-S_1 et S_0-S_2).

5. Synthèse des quadrupôles à base d'accepteurs vinyliques

La fonction aldéhyde est un accepteur classique, commode à préparer et à utiliser. Plus qu'un simple groupe électro-attracteur, l'aldéhyde est aussi une fonction réactive. L'utilisation de certaines espèces chimiques permet de convertir facilement un aldéhyde en une fonction vinylique (par exemple : condensation de Wittig ou bien de Knoevenagel).

Cette approche est intéressante puisqu'elle permet d'accéder à de nouveaux chromophores à partir d'un chromophore déjà synthétisé. En utilisant cette stratégie, les aldéhydes **7** et **8** ont été convertis en accepteurs plus forts que sont les dérivés cyanés (**12**, **13**) et thiobarbituriques (**14**, **15**).

5.1 Synthèse des accepteurs vinyliques **12** et **13**

Les chromophores **7** et **8** sont engagés dans une condensation de Knoevenagel avec le cyanoacétate d'éthyle en présence de β alanine (qui sert de catalyseur *via* la formation d'une imine intermédiaire). Cette réaction étant équilibrée en présence d'eau, il est nécessaire de déplacer l'équilibre en faveur du produit final.

Ce déplacement d'équilibre s'opère généralement par la formation d'un azéotrope solvant/eau éliminé par déshydratation ($CaCl_2$ pour le mélange éthanol/eau) ou par l'utilisation d'un Dean-Stark (toluène/eau).

Notre stratégie est d'utiliser de l'éthanol comme solvant afin de former l'azéotrope, puis en jouant sur la saturation du solvant en produit de départ, de faire précipiter *in situ* le produit nouvellement formé. Cette technique permet d'obtenir les composés **12** et **13** purs après filtration (avec un rendement de 64% et 72% respectivement). La mauvaise solubilité des aldéhydes **7** et **8** dans l'éthanol est responsable du rendement non quantitatif de la réaction.

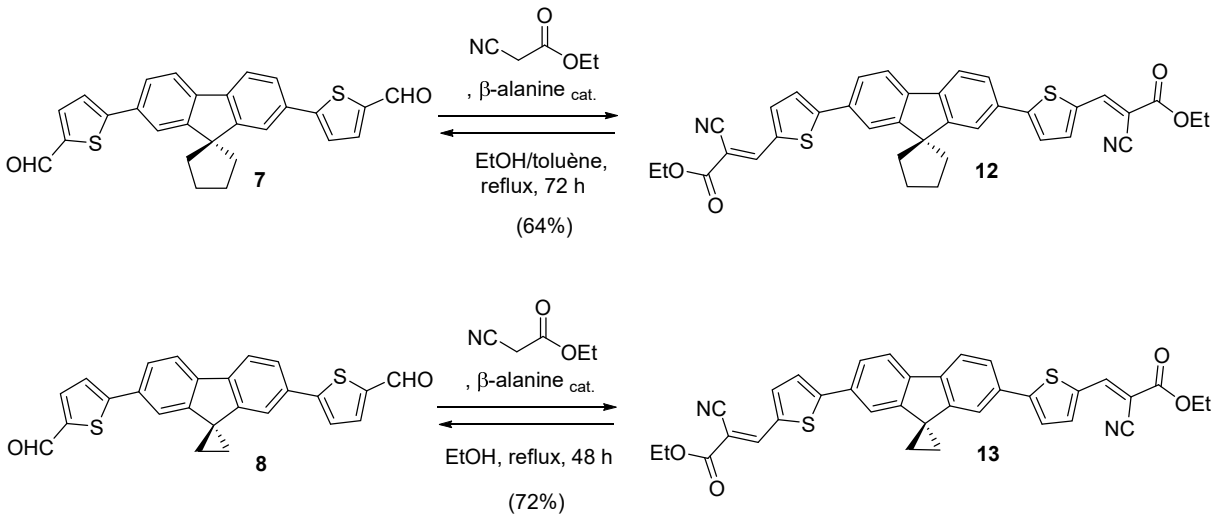


Schéma 11. Synthèse des bisaccepteurs cyano-ester 12 et 13.

5.2 Synthèse des accepteurs vinyliques **14** et **15**

Selon la même stratégie, les molécules **7** et **8** sont engagées dans une condensation de Knoevenagel en utilisant l'acide 1,3-diéthyl-2-thiobarbiturique, ce qui permet d'obtenir les cibles **14** et **15** avec des rendements de 83% et 26% respectivement.

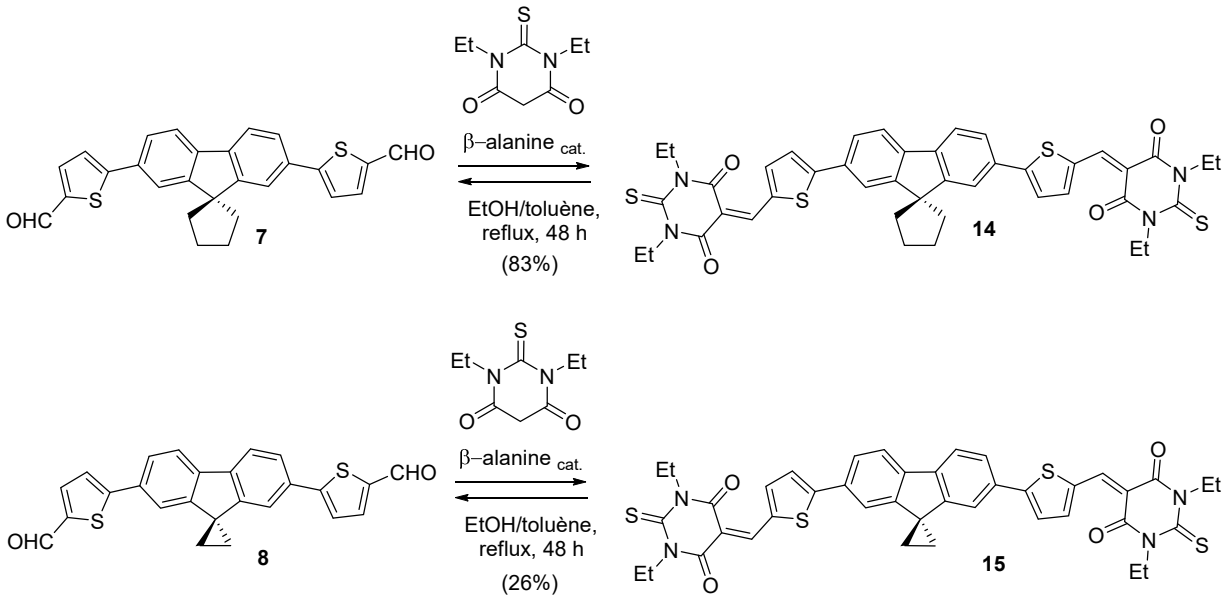


Schéma 12. Synthèse des bisaccepteurs thiobarbiturique **14** et **15**.

6. Propriétés photophysiques des quadrupôles accepteurs vinyliques en solution

6.1 Solvatochromie des accepteurs vinyliques **12-15**

Tout comme pour les quadrupôles accepteurs aldéhyde, l'étude de la solvatochromie des accepteurs vinyliques montre une influence plus ou moins marquée de la polarité du milieu sur l'émission des chromophores **12-15.**

La faible stabilité de ces chromophores en milieu organique hydraté (déplacement de l'équilibre chimique vers le composé de départ) empêche toute mesure dans des solvants polaires protiques (MeOH) et/ou hygroscopiques (DMSO). En comparant ces cinq chromophores dans le THF, il apparaît clairement que la force de l'accepteur joue un rôle important en vue de moduler l'absorption et l'émission vers le bleu ou le rouge.

Il est important de noter que les composés possédant le cycle propyle sont bien moins solubles que leurs homologues pentyles, impactant les valeurs d'epsilon mesurées (puisque les mêmes valeurs sont attendues pour les composés **12**, **13** et **14, 15**). De façon tout à fait surprenante, les rendements quantiques de fluorescence s'effondrent lorsque l'on compare les valeurs dans le THF entre les aldéhydes (**7**, **8**) et les accepteurs vinyliques (**12-15**). Cette baisse de la fluorescence peut être attribuée à divers processus non radiatifs, tels que la formation d'excimères ou bien des transferts d'électrons.

Les accepteurs vinyliques étant des accepteurs forts, leur potentiel de réduction est attendu pour être relativement bas. Donc le transfert d'électrons semble être l'hypothèse la plus probable, bien qu'aucune expérience pour étayer ou réfuter cette hypothèse n'ait été effectuée.

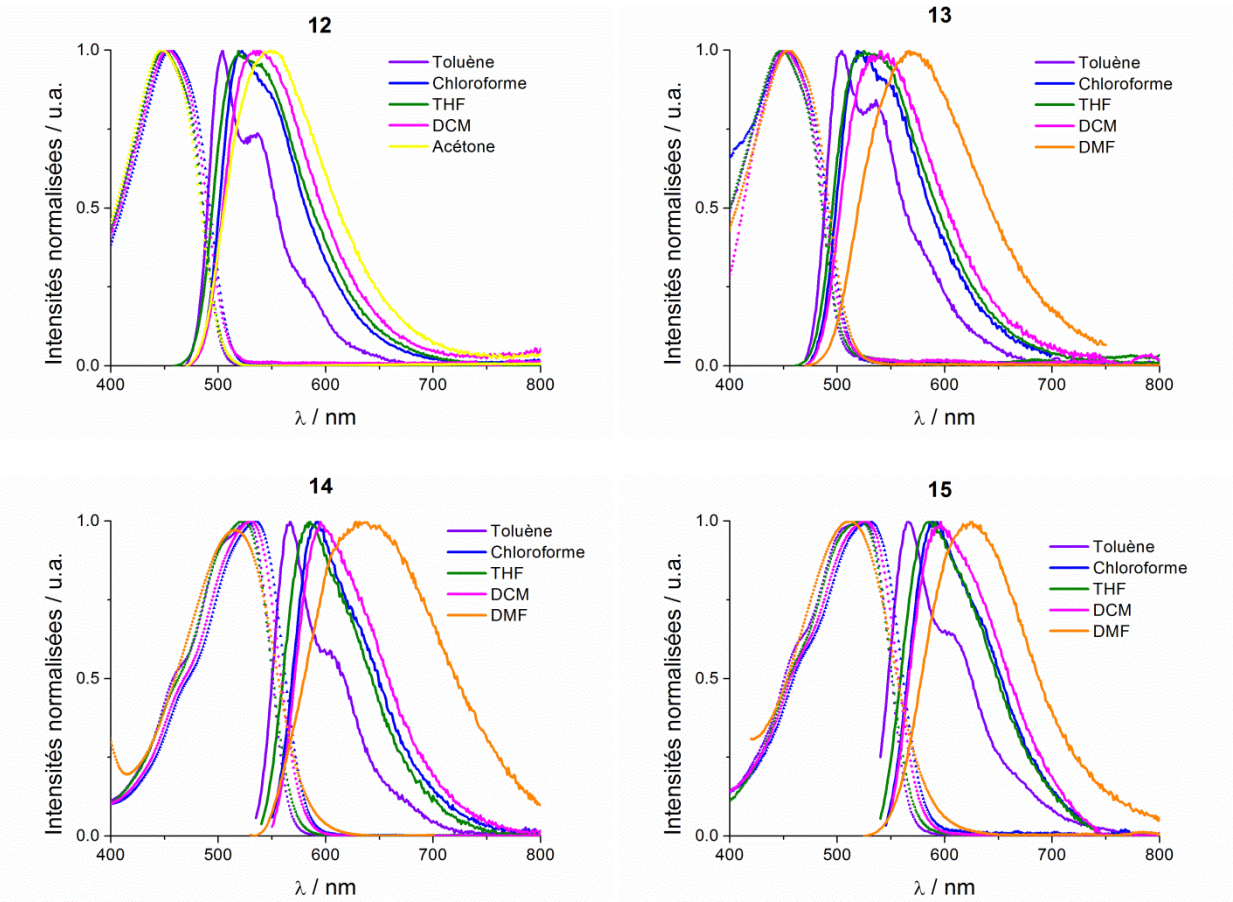


Figure 5. Absorption et émission des quadrupôles **12-15** dans différents solvants organiques.

Les composés **14**, **15** présentent de légères variations de l'absorption avec un subtil décalage bathochrome de l'absorption dans le toluène, le chloroforme et le dichlorométhane. Curieusement, les solvants possédant des doublets non liants disponibles comme le THF et le

DMF entraînent un déplacement hypsochrome de l'absorption. Cette observation semble indiquer que l'état fondamental de ces chromophores est légèrement sensible à la polarisabilité, comme l'état excité.

Il est raisonnable d'envisager que pour cette famille d'accepteurs très forts, une rupture de symétrie légère existe à l'état fondamental (A-D-D$^{\delta+}$-A$^{\delta-}$) puis est exaltée dans l'état excité (A-D-D^{+}-A^{-}).

Tableau 3. Propriétés d'absorption et d'émission des chromophores **12-15** dans le THF.

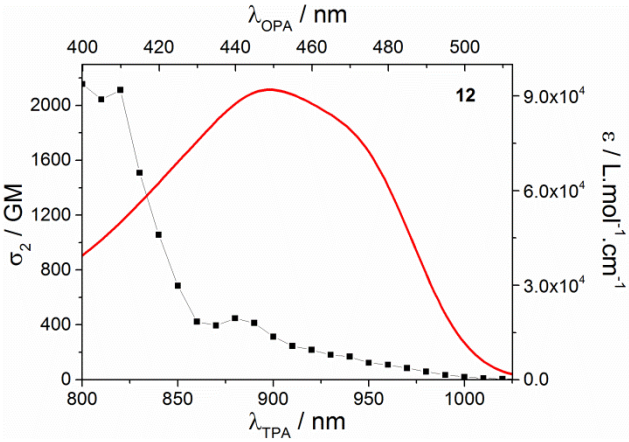
	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* mol.L^{-1}.cm^{-1}	λ_{em}^{max} nm	Stokes' shift cm^{-1}	Φ_F *b)*	τ *c)* ns
12	449	9.2 10^4	519	3 000	0.05	< 0.2
13	448	7.0 10^4	525	3 330	0.06	< 0.2
14	523	10.9 10^4	585	2 000	0.03	< 0.2
15	522	9.4 10^4	587	2 100	0.05	< 0.2

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Temps de vie de fluorescence.

En comparant les propriétés photophysiques en solution des quadrupôles accepteurs vinyliques, on observe que l'utilisation d'une garde différente (**12**/**13** et **14**/**15**) ne modifie pas les propriétés photophysiques des chromophores en solution. Cependant, il est important de remarquer que l'augmentation de la force de l'attracteur (**7**, **12** et **14**) entraîne un décalage bathochrome important de l'absorption et de l'émission, en plus d'un effet hyperchrome. Malgré la chute importante des rendements quantiques de fluorescence, qui impacte directement les brillances à un et deux photons, ces quadrupôles accepteurs sont très prometteurs.

6.2 Absorption à deux photons des accepteurs vinyliques **12-15**

Les mesures d'absorption à deux photons des chromophores **12**, **14**, **15** sont effectuées en solution dans le THF (**12**, **15**) et le chloroforme (**14**).



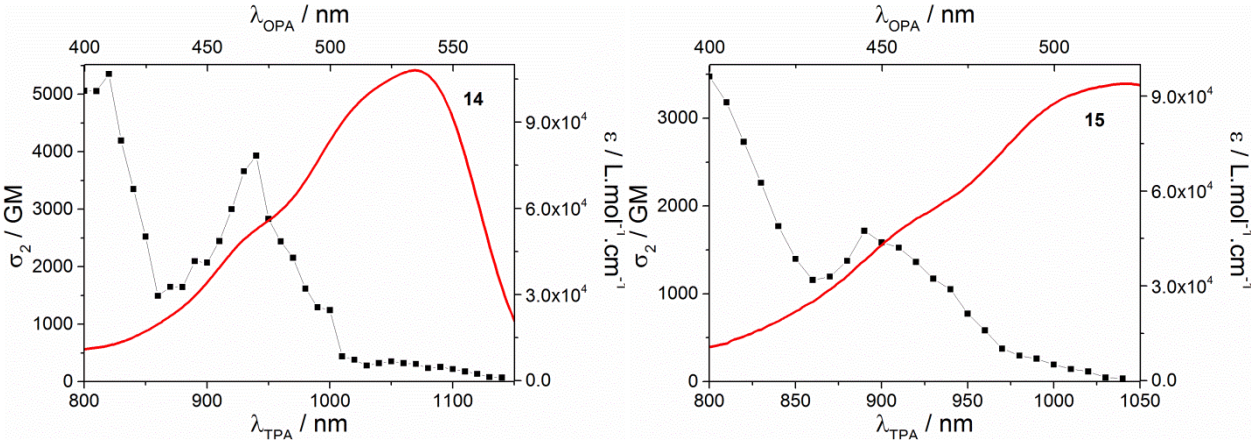


Figure 6. Spectres d'absorption à un photon normalisés en ε (trait rouge) et d'absorption à deux photons normalisés en σ_2 (points noirs) des quadrupôles **12**, **14**, **15** en solution dans le THF (**12**, **15**) et le chloroforme (**14**).

Les mesures d'absorption à deux photons des quadrupôles accepteurs vinyliques donnent des résultats tout à fait inattendus. En effet, ces petites molécules (M_w < 900 g.mol^{-1}) possèdent des sections efficaces d'absorption à deux photons supérieures[7, 35-40] ou équivalentes[5, 39, 41-43] à des chromophores longs et complexes. Ces composés présentent une très forte ADP dans la gamme 800-900 nm, ce qui est très prometteur quant à leur utilisation potentielle en imagerie biphotonique *in vivo*.

Tableau 4. Propriétés d'absorption à deux photons des chromophores **12**, **14**, **15** en solution dans le THF et dans le chloroforme.

	Solvant	$2\lambda_{abs}^{max}$ nm	λ_{2PA}^{max} nm	σ_2^{max} *a)* GM	λ_{2PA}^{max2} nm	σ_2^{max2} *b)* GM	Φ_F *c)*
12	THF	898	820	2110	880	447	0.05
14	$CHCl_3$	1068	820	5350	940	3930	0.03
15	THF	1044	>800	>3470	890	1720	0.05

a) Section efficace d'absorption à deux photons mesurées à λ_{2PA}^{max}. *b)* Section efficace d'absorption à deux photons mesuré à λ_{2PA}^{max2} (1 GM = 10^{-50} cm^4.s.$photon^{-1}$). *c)* Rendement quantique de fluorescence.

Il est intéressant de remarquer que les quadrupôles **14** et **15** possèdent trois bandes distinctes d'ADP ; une bande vers 1000-1100 nm correspondant à la transition S0-S1, une bande située vers 900 nm qui est autorisée à un et deux photons et la bande de plus haute énergie vers 800 nm qui n'est autorisée qu'à deux photons.

Les résultats en solution des quadrupôles aldéhydes et vinyliques sont très intéressants et montrent que l'utilisation d'accepteurs de forces différentes permet de moduler les propriétés photophysiques à un et deux photons. Cependant, afin d'avoir une vision globale de l'influence des groupements terminaux sur les propriétés des chromophores et des FONs issues de ceux-ci, l'utilisation de groupements électro-donneurs est une perspective intéressante.

Dans le but d'alléger la synthèse et puisque les accepteurs ont donné des résultats concordants, l'étude des différentes tensions de cycle sur le pont méthylène du fluorène n'est pas complétée avec les groupements donneurs.

7. Synthèse des quadrupôles donneurs

L'utilité des couplages croisés présentés pour la synthèse des cœurs **7** et **8** ainsi que pour les blocs **5** et **6** a clairement été démontrée. La même stratégie de synthèse est donc appliquée à la préparation des quadrupôles donneurs.

7.1 Synthèse du donneur **17**

Le cœur **5** est bromé sur les positions 5 des thiophènes à l'aide de *N*-bromosuccinimide dans le THF à température ambiante. Après recristallisation, le composé **16** est obtenu avec un bon rendement de 78%.

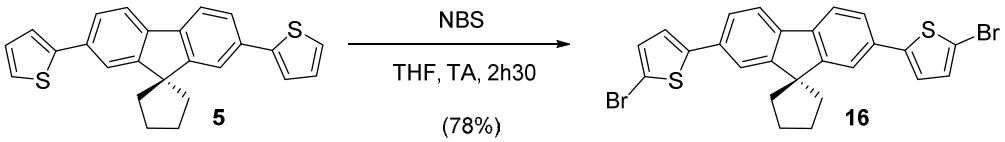


Schéma 15. Dibromation du chromophore **5**.

Le composé bis-bromé **16** est engagé dans des couplages de Suzuki-Miyaura en présence de palladium et d'acide 4-méthoxyphenyl boronique. Après purification sur gel de silice, le composé **17** est obtenu avec un bon rendement de 77%.

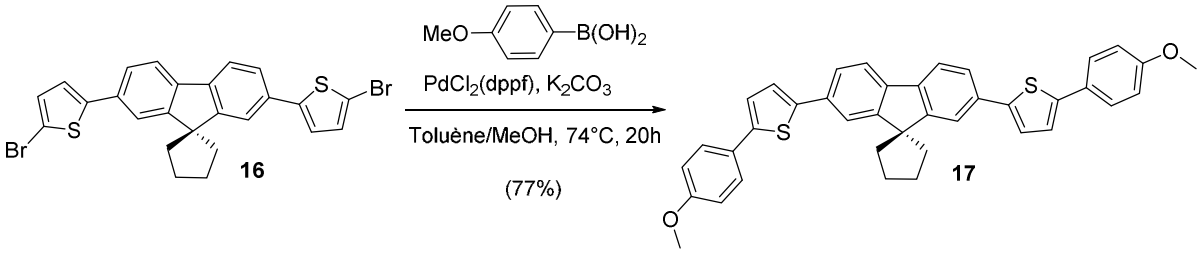


Schéma 16. Synthèse du bisdonneur méthoxy **17**.

7.2 Synthèse des donneurs **19** et **20**

Les amines étant en général de meilleurs groupements donneurs d'électrons que les éthers, un dérivé amino analogue à **17** a été préparé. L'utilisation de chaînes butyles est un bon compromis entre solubilité et caractère donneur de l'amine. L'absence de dérivés commerciaux d'acides boroniques de la *N*,*N*-dibutylaniline a motivé la synthèse de l'ester boronique de la *N*,*N*-dibutylaniline.

La *N*,*N*-dibutylaniline commerciale est iodé via une substitution électrophile aromatique en utilisant du diiode comme électrophile. Le composé b est obtenu avec un rendement de 87% après purification. Ce précurseur est ensuite borylé selon la méthode de Vaultier, puis l'acide boronique obtenu est converti en ester pinacolique conduisant au composé c quantitativement.

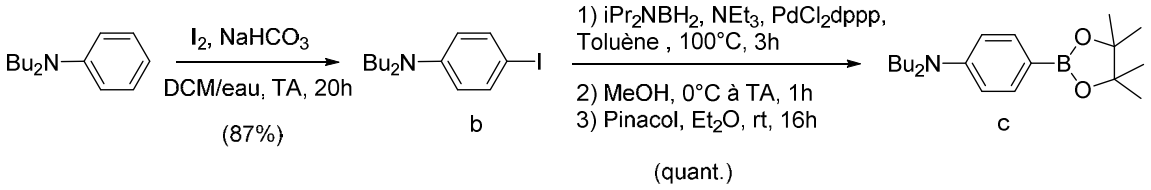


Schéma 17. Synthèse de l'ester pinacolique c.

Le motif **16** est engagé dans un couplage croisé avec c en présence de palladium ($PdCl_2$dppf) dans un mélange méthanol/toluène. Le composé **18** n'est pas obtenu ; suspectant un problème de réactivité de l'ester boronique, le choix de remplacer l'ester par un acide boronique commercial est fait.

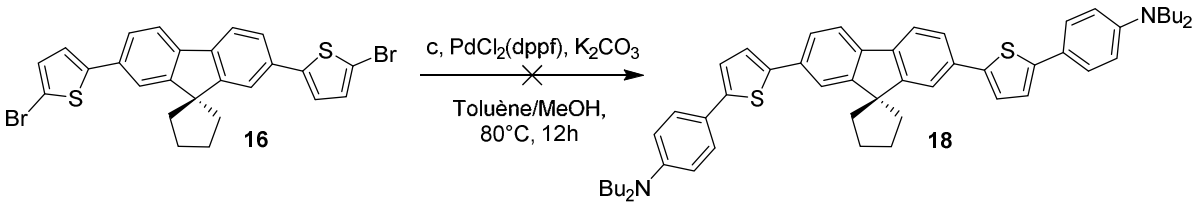


Schéma 18. Synthèse du chromophore bisdonneur dibutyl-amino **18**.

Une première tentative d'obtention de **19** en utilisant le catalyseur $PdCl_2$(dppf) n'a pas fonctionné. Suspectant une désactivation du catalyseur par le motif diméthylaniline, l'utilisation d'un catalyseur plus classique ($PdCl_2(PPh_3)_2$) en présence de triphénylphosphine a permis d'obtenir le composé souhaité avec un rendement moyen de 58%.

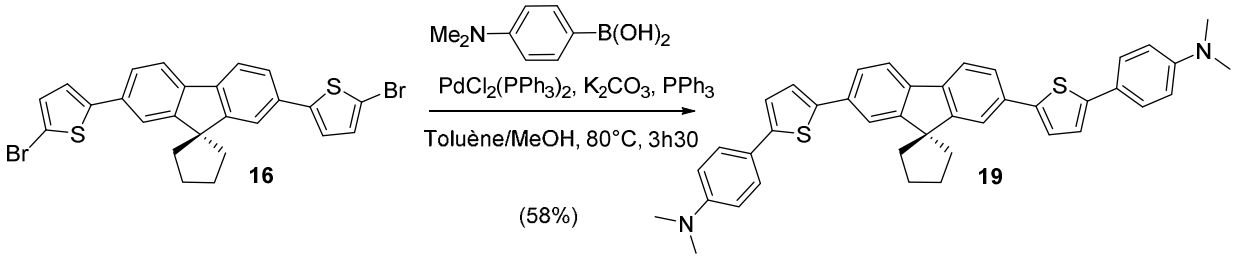


Schéma 19. Synthèse du chromophore bisdonneurs diméthyl-amino **19**.

Afin d'étudier l'influence de l'encombrement sur les extrémités des chromophores, une variante du quadrupôle **19** est synthétisée. Ce chromophore est distinct de **19** par un encombrement très important au niveau du motif aniline apporté par la présence de deux cycles phényls. Outre l'impact de l'encombrement sur les propriétés photophysiques des nanoparticules, le motif triphénylamine est connu pour être un excellent absorbeur à deux photons, mais est aussi un moins bon donneur.

Une variante très encombrée du composé **19** est synthétisée par un couplage de Suzuki-Miyaura entre le composé **9** et l'acide triphénylamine boronique dans les conditions décrites précédemment. Après recristallisation, le composé **20** est obtenu avec un rendement de 61%.

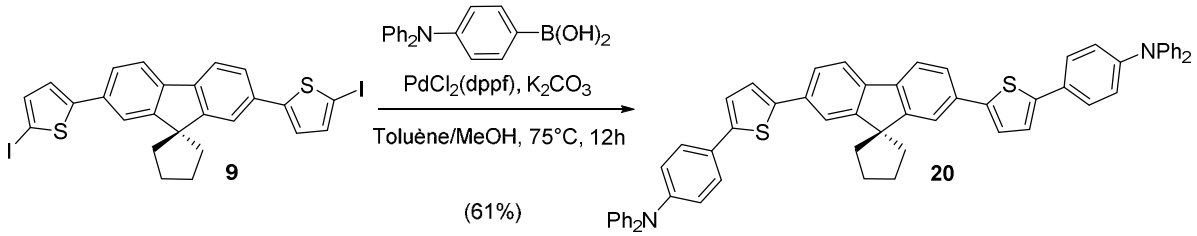


Schéma 20.Synthèse du chromophore bisdonneur diphénylamine **20**.

7.3 Synthèse des donneurs **21** et **22**

Tirant parti de la stratégie employée pour les quadrupôles accepteurs, une élongation du système π est effectuée *via* une réaction de Wittig sur le cœur **7** avec le sel de phosphonium correspondant. Après purification, les composés **21** et **22** sont obtenus avec des rendements de 64% et 10% respectivement.

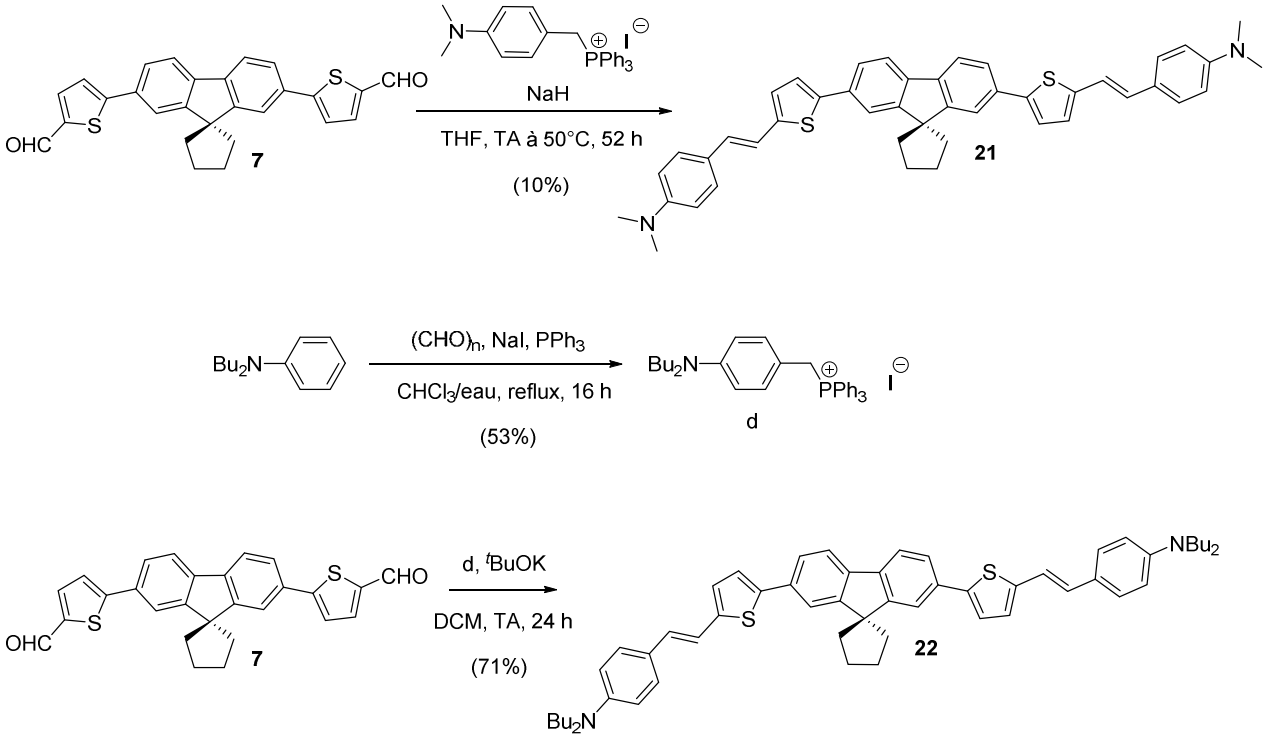


Schéma 21. Synthèse des chromophores bisdonneurs vinyliques **21** et **22**.

7.4 Tentatives d'élongation du système π des quadrupôles donneurs

Des tentatives d'allongement du système π par l'utilisation de système bithienyl ont été faites, cependant la très mauvaise solubilité de ces molécules n'a pas permis d'obtenir les composés souhaités (**24** et **25**).

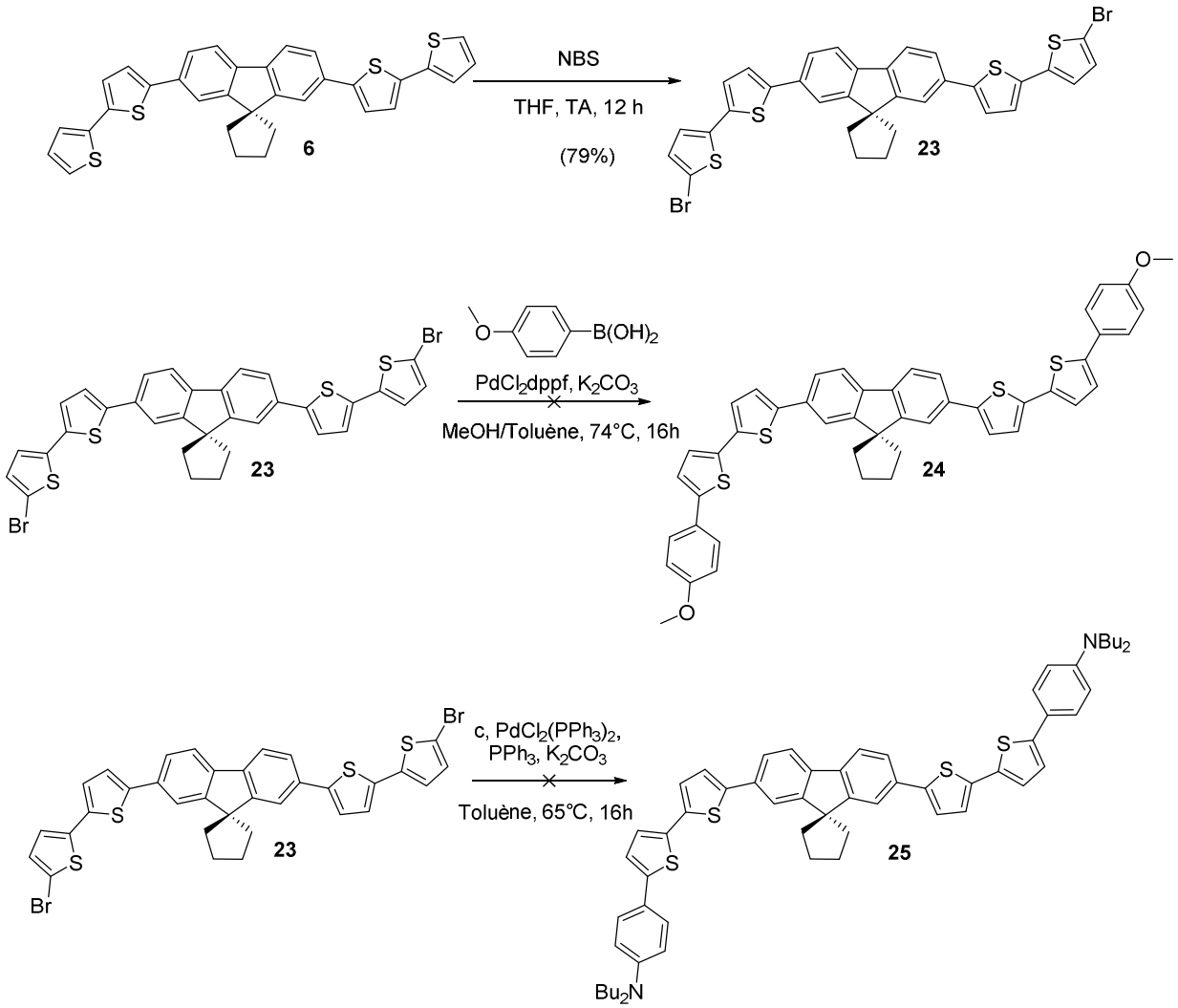


Schéma 22. Tentative de synthèse des bisdonneurs bithienyl **23** et **25**.

8. Propriétés photophysiques des quadrupôles donneurs en solution

8.1 Solvatochromie des donneurs **17**, **19**-**22**

Afin d'étudier le comportement des chromophores donneurs nouvellement synthétisés, une étude de leurs propriétés photophysiques en solution a été menée. De même que les quadrupôles accepteurs, l'influence de solvants de polarités différentes ont été évalués.

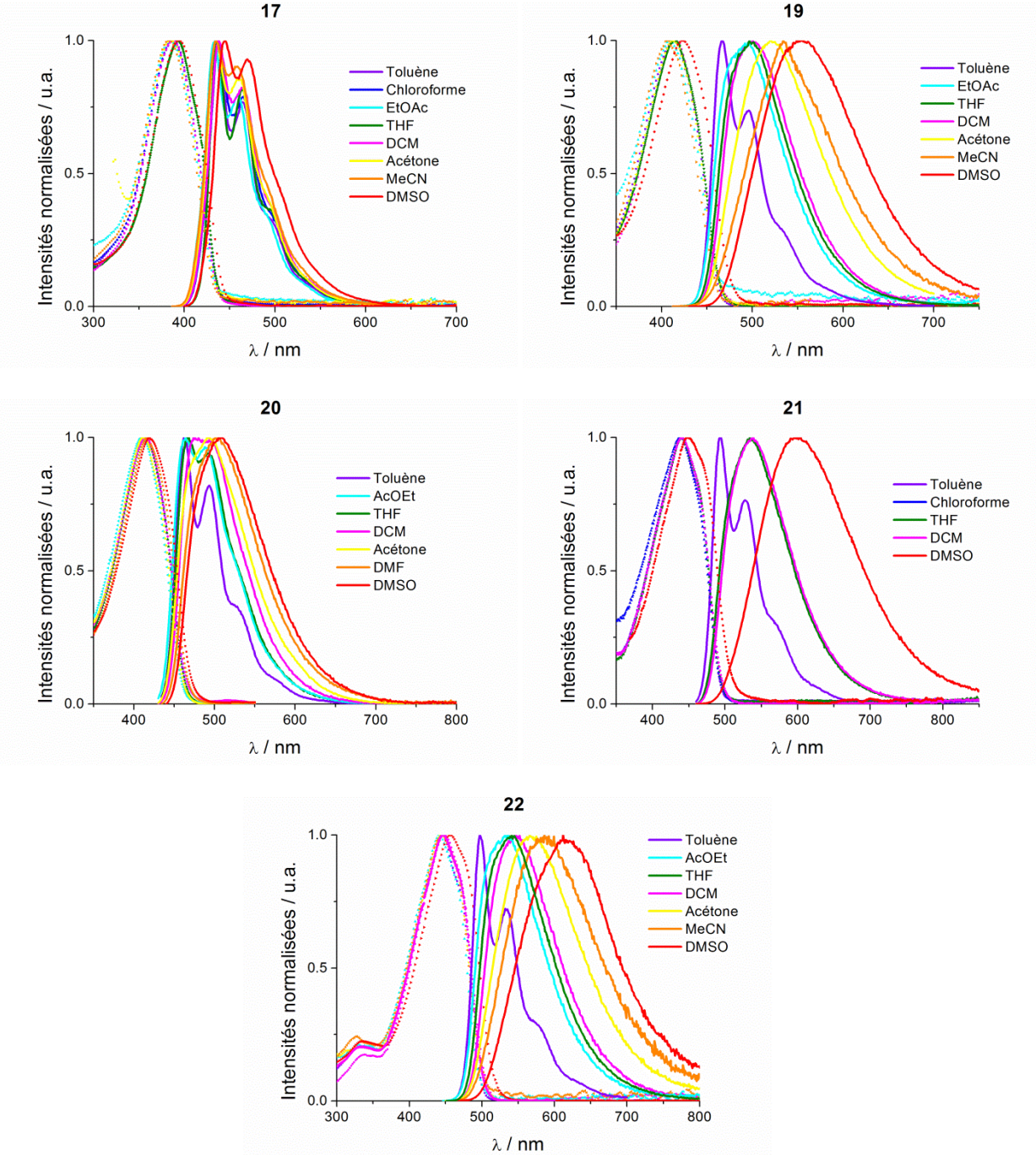


Figure 7. Absorption et émission des quadrupôles **17**, **19**-**22** dans différents solvants organiques.

Les mesures de solvatochromie montrent que l'influence de la polarité des solvants sur les propriétés d'absorption et d'émission des fluorophores donneurs est plus ou moins marquée selon le type de groupement. L'utilisation de groupement méthoxy (**17**) comme groupe donneur entraîne une structuration importante de l'émission, indépendamment du type de solvant utilisé (figure 7). L'apparition de la structure fine en émission couplée à l'absence de déplacement des bandes lorsque l'on modifie la polarisabilité du solvant montre que l'état

excité est un état où la molécule est plus « rigide » qu'à l'état fondamental (apparition de sous-structure vibrationnelle en absorption).

À l'inverse les composés **19-22** présentent des déplacements de Stokes qui augmentent avec la polarité des solvants (figure 3). Cet effet est très marqué pour les molécules **19**, **21** et **22** qui possèdent des groupements auxochromes dialkyl-amine, qui sont de bien meilleurs donneurs que le groupement méthoxy.[12]

Le fait que le doublet non liant de l'azote participe au transfert de charge lors de l'excitation explique l'influence de la polarité des solvants sur les spectres d'émission. En effet, ce doublet est fortement polarisable et de ce fait, les interactions entre le solvant et le chromophore sont fortes. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le composé **20** présente une plus faible sensibilité à l'environnement local que son homologue **19**.

Il est possible d'envisager que le caractère solvatochromie du composé **19** provienne d'un état TICT (Twisted Internal Charge Transfer). Ce phénomène consistant à une rotation de l'amine autour de la liaison N-$C_{(Ph)}$ pendant l'état excité est commun aux dérivés diméthylaniline.[44-46] Cependant l'émission de fluorescence par TICT s'ajoute à l'émission normale (LE), ce qui se traduit par l'apparition d'une seconde bande de fluorescence décalée vers le rouge.

Dans le cas des quadrupôles **19- 22**, une seule bande d'émission de fluorescence est visible. De plus, l'émission des composés possédant un état TICT émissif est fortement dépendante de la polarité et de la viscosité du solvant (donc de la température).[47]
Dans le cas de **19**, des expériences d'émission de fluorescence et temps de vie de fluorescence à différentes températures dans le DMSO (figure 8) n'ont pas montré de dépendance de l'émission de fluorescence à la température.

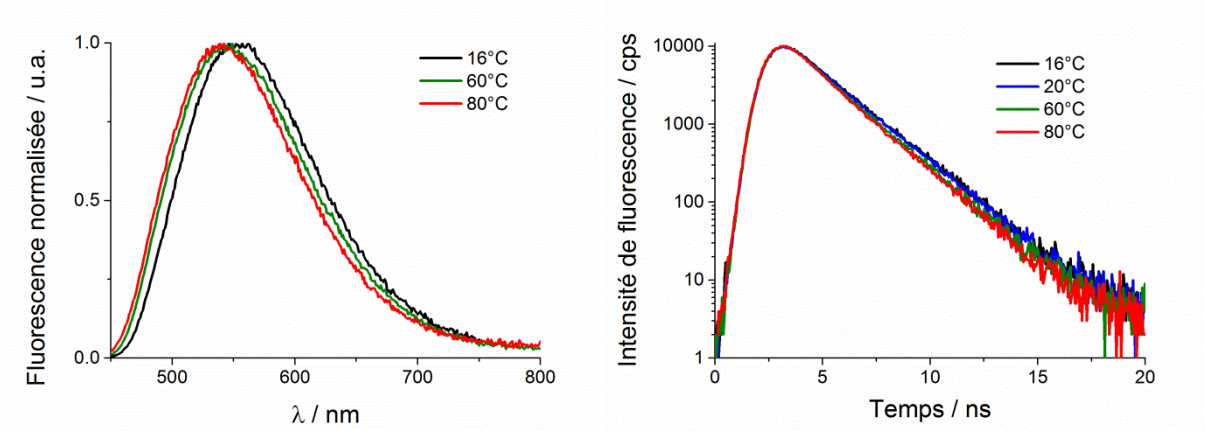


Figure 8. Émission de fluorescence (gauche) et de temps de vie de fluorescence (droite) de **19** dans le DMSO à différentes températures.

Il est donc plus probable que le solvatochromisme positif dans l'état excité des quadrupôles donneurs **19- 22** soit dû à une rupture de symétrie comme dans le cas des quadrupôles accepteurs.

Tableau 5. Propriétés d'absorption et d'émission des chromophores **17** et **19-22** en solution dans le THF.

	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* mol.L^{-1}.cm^{-1}	λ_{em}^{max} nm	Stokes' shift cm^{-1}	Φ_F *b)*	τ *c)* ns	k_r *d)* ns^{-1}	k_{nr} *e)* ns^{-1}
17	393	7.3 10^4	437	2 900	0.69	0.9	0.8	0.3
19	414	6.9 10^4	500	4 100	0.68	-	-	-
20	415	9.0 10^4	466	2 600	0.78	1.0	0.8	0.2
21	441	-	534	3 900	0.63	-	-	-
22	446	12.6 10^4	541	3 800	0.59	1.3	0.4	0.3

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 1N. *c)* Temps de vie de fluorescence. *d)* Constante de temps radiative. *e)* Constante de temps non radiative.

Le faible caractère donneur de **17**[12] entraîne un transfert de charge moins important et donc une émission de fluorescence essentiellement située dans la partie bleue du visible lorsque la molécule est solubilisée dans le THF.

Les propriétés photophysiques de **19** et **21** dans le THF montrent que l'extension du système π conjugué via l'ajout d'une double liaison décale l'absorption et l'émission vers le rouge. Ce constat est aussi valable pour le remplacement des groupements méthyles (**21**) par des groupements butyles (**22**) qui sont de meilleurs donneurs.[12]

L'augmentation du caractère donneur (**17**, **19**, **20** et **21**, **22**) ainsi que l'utilisation de doubles liaisons est susceptible d'augmenter fortement l'hyperpolarisabilité des quadrupôles donneurs et donc leur réponse en ADP. Des mesures d'absorption à deux photons sont donc effectuées sur les quadrupôles donneurs.

8.2 Absorption à deux photons des donneurs **17**, **19-22**

L'absorption à deux photons des chromophores **17**, **19-22** a été mesurée en solution dans le THF (figure 9).

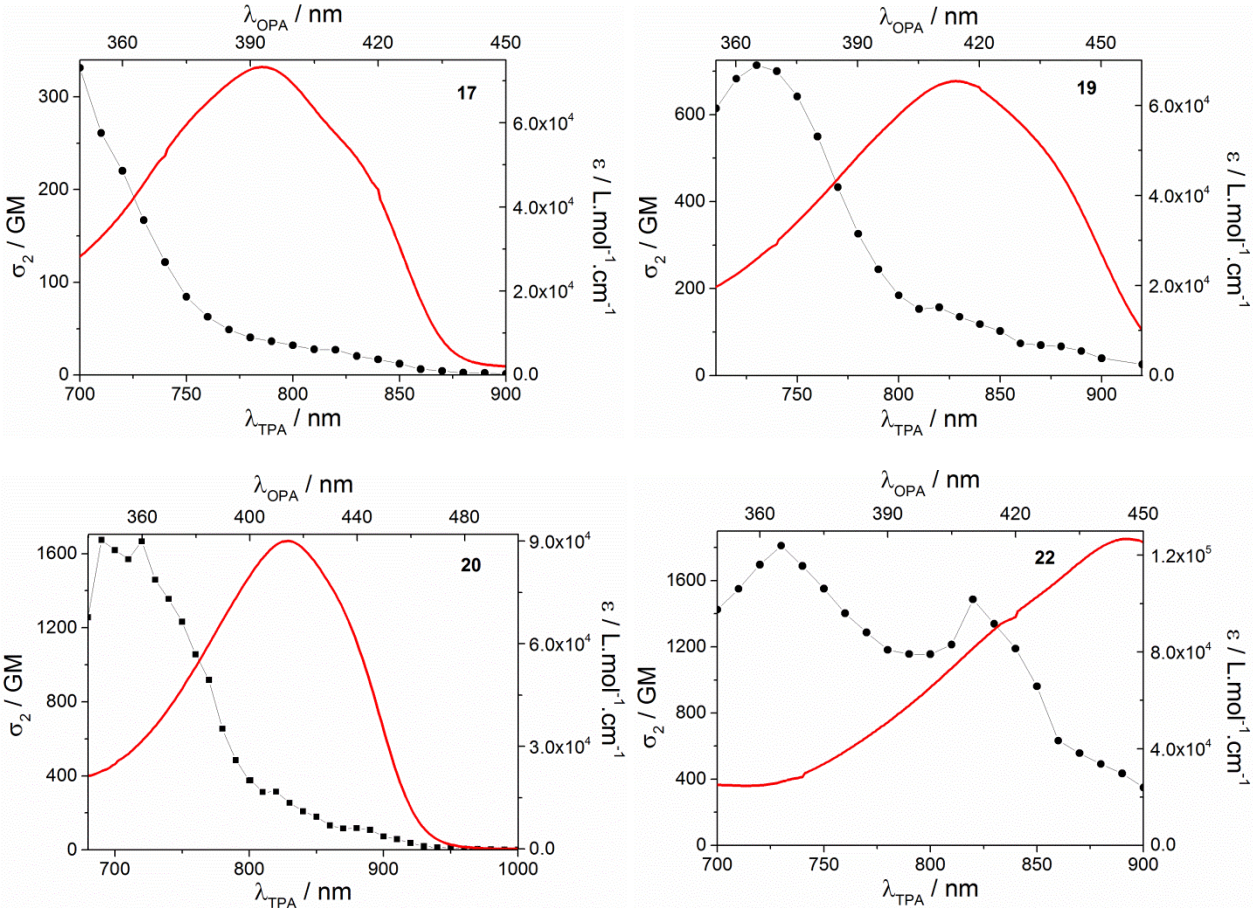


Figure 9. Spectres d'absorption à un photon normalisés en ε (trait rouge) et d'absorption à deux photons normalisés en σ_2 (points noirs) des quadrupôles **17**, **19-20**, **22** en solution dans le THF.

Les spectres d'ADP (figure 9) montrent que les quadrupôles donneurs absorbent tous à deux photons dans la gamme 700-900 nm. Comme observée en absorption à un photon, la section efficace d'absorption à deux photons du composé **17** est largement inférieure à celle du chromophore **19,** indiquant une faible délocalisation électronique lors de l'excitation. Les valeurs de σ_2 dans le THF des quadrupôles **19** et **20** montrent que l'utilisation d'un motif

diphénylamine en tant que groupement donneur à la place de diméthylamine est bien plus contrastée en ADP qu'en absorption à un photon.

Similairement à l'absorption classique, le maximum de la bande d'ADP autorisée pour **20** est décalé vers le bleu par rapport à celui de **19**. Cependant la valeur de σ_2^{max} est plus de deux fois supérieure pour **20**, ce qui valide l'intérêt de l'utilisation de ce groupement donneur dans le but de préparer des quadrupôles absorbeurs à deux photons.

Il est intéressant de remarquer que l'extension du système π conjugué par l'ajout d'un groupement vinylique conduit à une augmentation du σ_2 très importante pour la bande faiblement autorisée à deux photons (820 nm). Cet effet peut être attribué à la flexibilité du chromophore apportée par les vinyles, qui diminue la symétrie de la molécule et donc affecte les règles de sélection des transitions électroniques.

Tableau 6. Propriétés d'absorption à deux photons des chromophores **17**, **19-20**, **22** en solution dans le THF.

	$2\lambda_{abs}^{max}$	λ_{2PA}^{max}	σ_2^{max} *a)*	λ_{2PA}^{max2}	σ_2^{max2} *b)*	Φ_F *c)*
	nm	nm	GM	nm	GM	
17	786	<700	>331	800	32	0.69
19	828	730	713	820	157	0.68
20	830	690	1670	820	315	0.78
22	892	730	1810	820	1490	0.59

a) Section efficace d'absorption à deux photons mesurée à λ_{2PA}^{max}. *b)* Section efficace d'absorption à deux photons mesurée à λ_{2PA}^{max2} (1 GM = 10^{-50} cm^4.s.$photon^{-1}$). *c)* Rendement quantique de fluorescence.

Curieusement, la bande autorisée à deux photons est très similaire (λ_{TPA}^{max} = 730 nm) pour les quadrupôles **19** et **22** (figure 10), ce qui indique que la transition S_0-S_2 est très proche en énergie pour ces deux chromophores bien que l'intensité du σ_2 soit très différente.

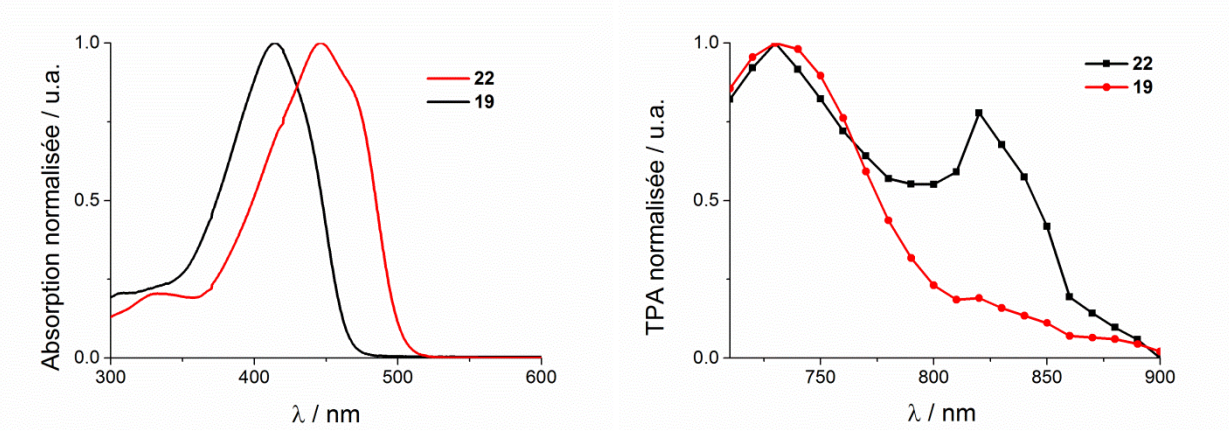


Figure 10. Spectres d'absorption à un (gauche) et deux photons (droite) de **19** et **22** dans le THF.

Ces chromophores quadripolaires donneurs et accepteurs ont des propriétés optiques linéaires et non linéaires très intéressantes. Les valeurs de σ_2 de certains composés sont très élevées au regard de la taille des quadrupôles, ce qui laisse espérer de fortes réponses en ADP pour les nanoparticules préparées à partir de ces chromophores.

Ces fluorophores (accepteurs et donneurs) sont destinés à être condensés à l'état de nanoagrégats ; procéder à l'étude de leur comportement dans l'état solide peut donc donner certaines informations pouvant aider à comprendre leur comportement dans les nanoparticules. Par exemple, une absence de luminescence dans l'état solide peut indiquer que le chromophore n'est pas adapté pour la préparation de nanoparticules luminescentes. À l'inverse, une luminescence dans l'état solide peut donner des indications sur le type d'interactions intermoléculaires, selon la forme et le positionnement des bandes d'émissions.

Afin de préjuger de la capacité de ces quadrupôles à générer des nanoparticules luminescentes dans l'eau, une étude de leur luminescence dans l'état solide a été effectuée.

9. Étude de la luminescence des quadrupôles dans l'état solide

L'étude de la luminescence des quadrupôles accepteurs et donneurs dans un milieu confiné amorphe est une base relativement bonne pour estimer le comportement des chromophores sous forme de nanoagrégats. En effet, la méthode de préparation des nanoparticules que nous avons choisie (reprécipitation) permet d'obtenir des nanoparticules par un processus plutôt cinétique que thermodynamique.[48]

L'obtention d'un état hors d'équilibre au moment de la nucléation des nanoparticules est une hypothèse raisonnable permettant d'espérer un agencement moléculaire amorphe au cœur des nanoparticules. Cet état amorphe est d'autant plus attendu que les quadrupôles n'ont pas de moment dipolaire pouvant structurer l'agencement moléculaire. Ainsi l'émission des chromophores dans le solide devrait être proche de celui des nanoparticules, préparées à partir de ces derniers.

Avant de discuter les spectres d'émission des fluorophores, il est important de noter que quatre spectres sont présentés en plus des spectres des chromophores : il s'agit des molécules **5**, **6**, **16** et **23**.

9.1 Fluorescence dans le solide des pseudo quadrupôles **5**, **6**, **16** et **23**

De façon inattendue, les intermédiaires réactionnels **5**, **6**, **16** et **23** présentent des propriétés photoluminescentes à l'état solide. Cette luminescence qui tire vers le bleu pour les dérivés monothienyls (**5**, **16**) et vers le vert pour les composés bithienyls (**6**, **23**) est d'autant plus surprenante que les molécules **16** et **23** possèdent toutes les deux des atomes de brome. Or les atomes de brome, par effet d'atome lourd favorisent le croisement intersystème permettant de peupler l'état triplet. Ce dernier est souvent dépeuplé à température ambiante par des processus de transfert d'énergie, diminuant ainsi la fluorescence du fluorophore.

Il est intéressant de noter que deux bandes de fluorescence distinctes apparaissent pour **16,** pouvant être interprétées, au vu de la structure cristalline[49] par la formation d'excimères, par la présence de couplage excitonique fort ou bien par émission de phosphorescence. Une mesure de la fluorescence du solide résolue en temps pourrait donner des informations sur la présence ou non d'excimères, mais ce type d'expérience requiert un appareillage spécifique, non disponible au laboratoire.

Des mesures d'émission des chromophores en solution dans l'éthanol vitreux n'ont pas permis de mettre en avant la présence de phosphorescence. Cependant, des expériences de production d'oxygène singulet des chromophores en solution démontrent un peuplement évident de l'état triplet.

Tableau 7. Émission des chromophores **5**, **6**, **16**, **23** dans l'état solide et dans le THF.

	Environnement	**5**	**6**	**16**	**23**
$\lambda_{ém}^{max}$	THF	383	441	393	448
(nm)	Solide	495	544	480	539

La présence de couplage excitonique au sein du solide est envisageable au regard de la forme du spectre d'émission (figure 11). L'apparition d'une bande large décalée vers le rouge peut être induite par la formation d'agrégats *J*. Ces agrégats sont obtenus par un agencement en tête-à-queue des molécules, entraînant des interactions moléculaires importantes, dont un décalage vers le rouge.[50]

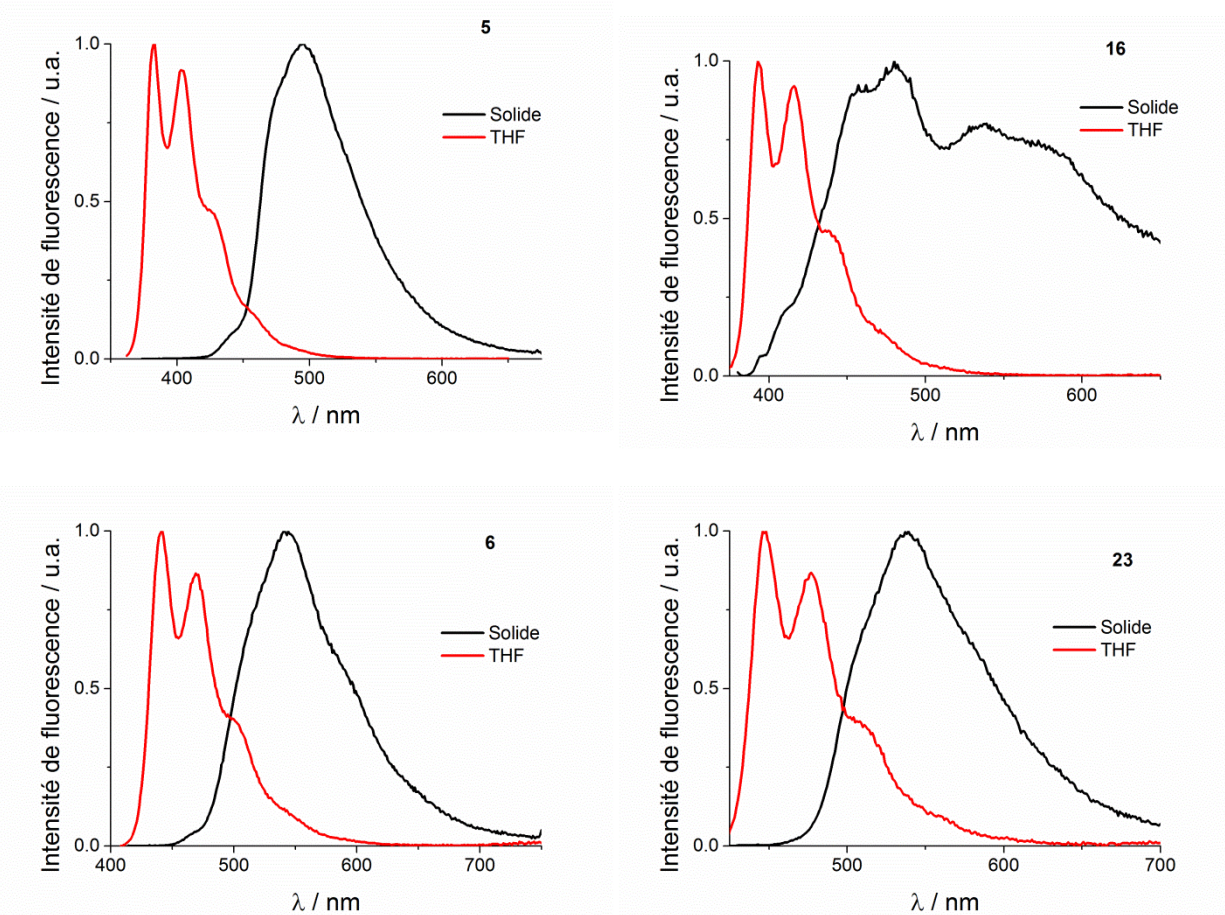


Figure 11. Émission de luminescence des chromophores **5**, **6**, **16** et **23** dans l'état solide et en solution dans le THF.

9.2 Fluorescence dans le solide des quadrupôles accepteurs

Les mesures de fluorescence dans l'état solide des quadripôles accepteurs sont très intéressantes, puisque comme le montre les figures 12 et 13, les émissions dans l'état

microcristallin des accepteurs aldéhydes **7** et **8** ainsi que des accepteurs forts **12** et **14** sont très décalés vers le rouge en comparaison avec les solutions moléculaires correspondantes.

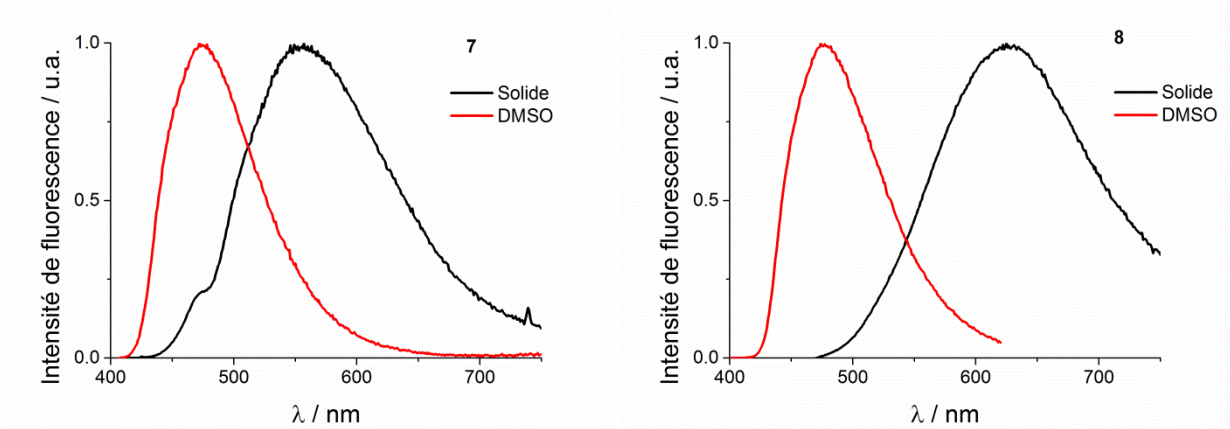


Figure 12. Spectres d'émission des quadripôles **7** (gauche) et **8** (droite) dans l'état solide et en solution dans le DMSO.

Ce déplacement bathochrome des bandes d'émissions n'est pas dû à des effets d'environnement, puisque les émissions sont bien plus décalées vers le rouge que lorsque les chromophores sont dissous dans des solvants polaires (tableau 8). Ce déplacement bathochrome des bandes d'émissions semble plutôt indiquer la présence d'interactions intermoléculaires fortes, comme le couplage excitonique.

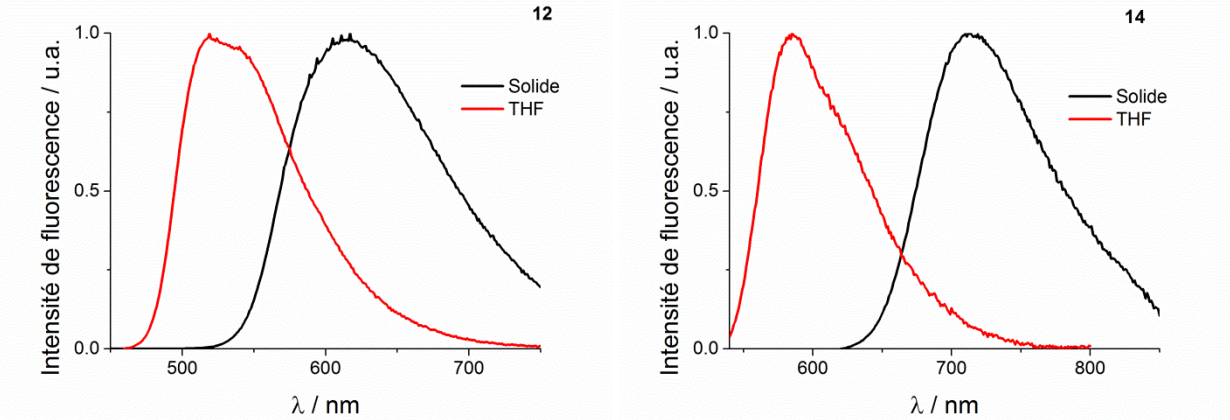


Figure 13. Spectres d'excitation/absorption et d'émission des quadripôles **12** (gauche) et **14** (droite) dans l'état solide et en solution dans le toluène.

Il est tout à fait surprenant de remarquer que les fluorophores **7** et **8** ainsi que les fluorophores **12** et **13** présentent des émissions de fluorescence différentes dans l'état solide. En effet, les études de ces chromophores en solution ont montré que la présence du cycle propyle ou pentyl sur le pont méthylène n'affectait pas les propriétés d'absorption et d'émission. Or dans l'état solide microcristallin, on remarque que l'émission de fluorescence

des chromophores **7** et **12** (qui possèdent un motif pentyl) est plus décalée vers le bleu que les équivalents propyle (**8** et **13** respectivement).

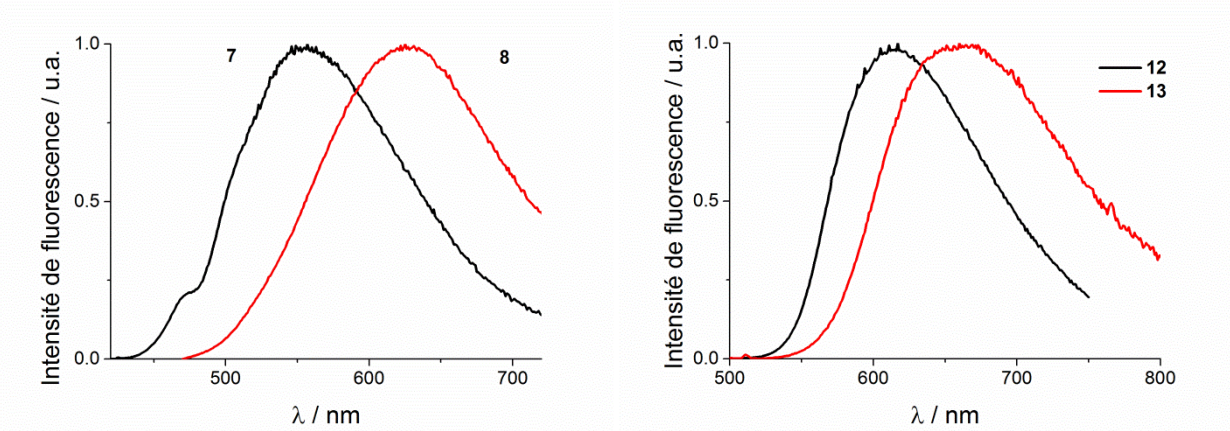


Figure 14. Émission de luminescence des chromophores **7**-**8** et **12**-**13** à l'état solide.

Cette différence importante de l'émission dans l'état microcristallin indique que les interactions intermoléculaires au sein du solide sont fortement impactées par l'encombrement stérique au niveau du fluorène ; et donc il semblerait que le cycle propyle favorise la formation d'interactions intermoléculaires de type *J* (Figure 14).

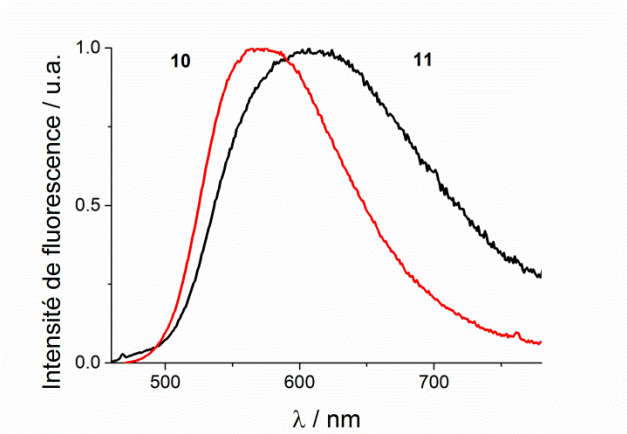


Figure 15. Émission de luminescence des chromophores **10** et **11** à l'état solide.

Le quadrupôle accepteur **10** comportant un cycle phényle présente un déplacement hypsochrome de l'émission à l'état solide en comparaison avec l'accepteur bithienyl **11**. Ce comportement similaire à celui observé en solution (tableau 1) semble indiquer que le thiophène permet une meilleure communication électronique que le phényle dans l'état solide.

Tableau 8. Émission des chromophores **7**, **8**, **10**-**14** dans l'état solide et dans le THF.

	Environnement	**7**	**8**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
$\lambda_{ém}^{max}$	THF	433	434	467	491	519	525	585
(nm)	Solide	557	625	564	607	617	660	712

Ces observations montrent à quel point l'ingénierie moléculaire est importante lorsque l'on travaille en milieu condensé et qu'un changement aussi faible soit-il de la structure de la molécule, peut profondément modifier les propriétés optiques de cette dernière (figure 14).

9.3 Fluorescence dans le solide des quadrupôles donneurs

Les interactions intermoléculaires dans l'état solide des fluorophores **17** et **20** sont aussi très marquées et semblent indiquer la présence d'agrégats *J* (figure 16).

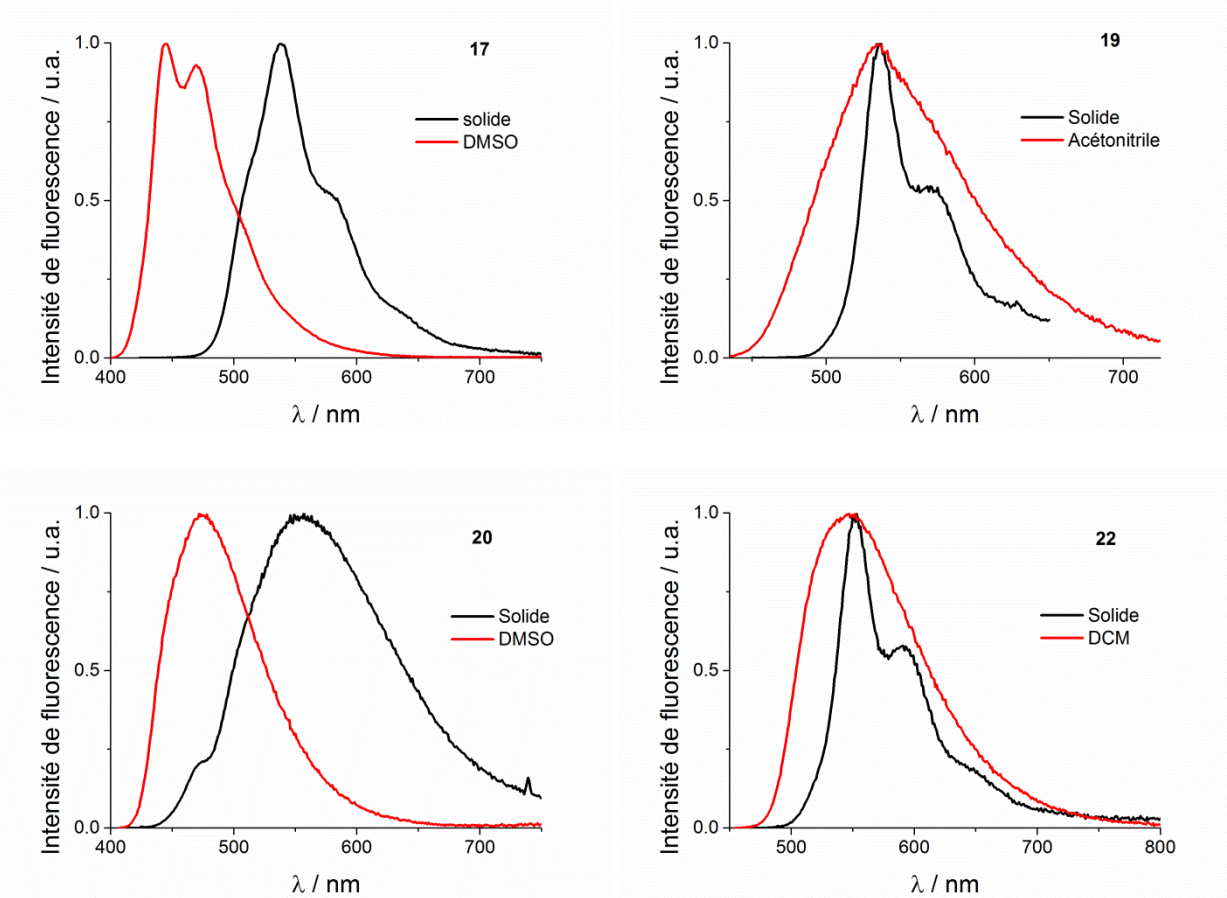


Figure 16. Émission de luminescence des chromophores **17**, **19**-**22** à l'état solide et en solution dans le DMSO (**17** et **20**), l'acétonitrile (**19**) ou le dichlorométhane (**22**).

À l'inverse, les chromophores donneurs dont le transfert de charge à l'état excité est important (**19**, **21** et **22**) ont une émission dans le solide correspondant à l'émission dans un solvant très polaire (**19**) ou moyennement polaire (**22**).

Ce comportement pourrait indiquer que plus le transfert de charge est important au sein du chromophore, moins l'émission dans l'état solide est décalée vers le rouge, conséquence d'interactions intermoléculaires différentes dues à une augmentation de la polarisabilité du chromophore.

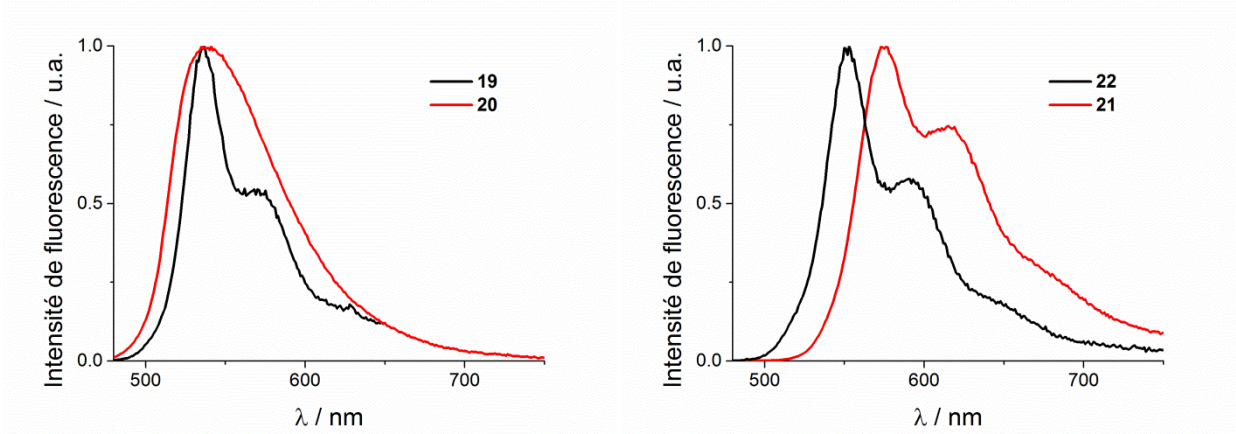


Figure 17. Émission des fluorophores **19-20** (gauche) et **21-22** (droite) dans l'état solide.

Étonnamment, l'émission de luminescence dans l'état solide de **19** et **20** est identique, à la différence d'une structuration de l'émission plus importante pour **19**. Cette structuration peut provenir des interactions interbranches entre plusieurs quadrupôles dans le solide empêchant la rotation du motif diméthylamine et réduisant ainsi certains vibrationnels.

Curieusement, alors que le groupement butyle est un groupement donneur plus efficace que les groupements méthyles, les spectres d'émission de fluorescence dans le solide de **21** et **22** montrent que **21** est plus décalé vers le rouge que son homologue **22**. Ceci semble indiquer que la présence de chaînes longues en fin de chromophore diminue les interactions interbranches, défavorisant ainsi les empilements de type *J*.

Tableau 9. Émission des chromophores 19-22 dans l'état solide dans le THF.

	Environnement	**17**	**19**	**20**	**21**	**22**
$\lambda_{ém}^{max}$	THF	437	500	466	534	541
(nm)	Solide	538	536	541	573	553

L’étude de la luminescence des quadrupôles donneurs et accepteurs dans l’état solide démontre que la stratégie d’encombrement du cœur fluorène par des espaceurs de type cycloalkyles permet de maintenir la fluorescence de ces composés. Les spectres de fluorescence dans l’état solide font apparaître des comportements singuliers entre les différents chromophores. Ces comportements particuliers indiquent une forte dépendance de la luminescence à l’arrangement moléculaire, des propriétés similaires sont donc attendues pour les nanoparticules.

Afin de mieux comprendre la dépendance de la fluorescence dans l’état solide en fonction de l’arrangement moléculaire, l’étude des structures cristallines de plusieurs quadrupôles est menée.

10. Étude des interactions intermoléculaires des quadrupôles dans l’état cristallin

L’étude du milieu cristallin donne accès à de précieuses informations concernant l’agencement moléculaire. La manière dont les chromophores s’organisent dans l’état solide (cristallin ou amorphe) modifie profondément les propriétés de luminescence des composés. Cet agencement peut aussi donner des indications sur l’évolution des nanoparticules dans le temps.

En effet, selon l’hypothèse où les nanoparticules sont proches d’un système amorphe au moment de leur formation, il est envisageable de penser que cet état hors équilibre (thermodynamique) ne perdurera pas. Les nanoparticules étant « solvatées » par l’eau, des domaines cristallins peuvent apparaître par migration de chromophores à la surface ou bien lors de processus de maturation.

L’occurrence de domaines cristallins est difficile à démontrer. Cependant dans certains cas, une modification radicale de la morphologie des nanoparticules laisse deviner que celles-ci ont atteint un état cristallin ou quasi cristallin. Pour cette raison, l’arrangement moléculaire au sein du cristal donne accès à des paramètres cruciaux (densité, types d’interactions mises en jeu, distances intermoléculaires et géométrie de la molécule) pouvant aider à comprendre comment, dans une certaine limite, les chromophores s’agencent dans la nanoparticule et donc expliquer les propriétés photophysiques de cette famille de quadrupôles à l’état de nanoagrégats.

Selon différents protocoles inhérents à chaque chromophore, des monocristaux de certains fluorophores ont été obtenus puis analysés par diffraction des rayons X, permettant ainsi d'accéder à leur structure cristalline. Dans un souci de clarté, seule une partie des données jugées pertinentes est présentée.

Tableau 10. Propriété des cristaux de **7**, **8**, **10**, **13**, **14**, **16**, **17**, **20**, **21**, **23**.

	7	**8**	**10**	**13**	**14**	**16**	**17**	**20**	**21**	**23**
Groupe d'espace	$Pna2_1$	Pnma	C2/c	P_{-1}	P_{-1}	Pnma	$P2_1$	$P2_1/c$	$Pmn2_1$	$P2_1$
Densité	1.386	1.385	1.188	1.404	1.271	1.689	1.321	-	-	1.638
θ_{FF} *a)*	7.5°	11.5°	9.9°	4.7°	0.2°	7.5°	7.2° 10.0°	3.4°	6.5°	6.9° 11.8°
θ_{TF} *b)*	24.8°	19.4°	15.5° 16.0°	8.1° 17.6°	3.9°	22.7°	24.6° 28.2°	3.7° 29.7°	26.0°	5.6° 21.2°

a) Angle formé par les plans des phényles du fluorène. b) Angle entre le thiophène et le phényle du fluorène attenant.

Les quadrupôles cristallisent dans le groupe d'espace P ou C, dans des systèmes orthorhombiques (**7**, **8**, **16**) ou bien monocliniques (**10**, **17**, **23**). Comme le montrent les données présentes dans le tableau 10, la planéité du fluorène est plus ou moins conservée au sein des chromophores avec une torsion du fluorène variant de 3.4° à 11.8°. Les molécules **17** et **23** possèdent deux torsions différentes, car celles-ci cristallisent sous forme de dimères.

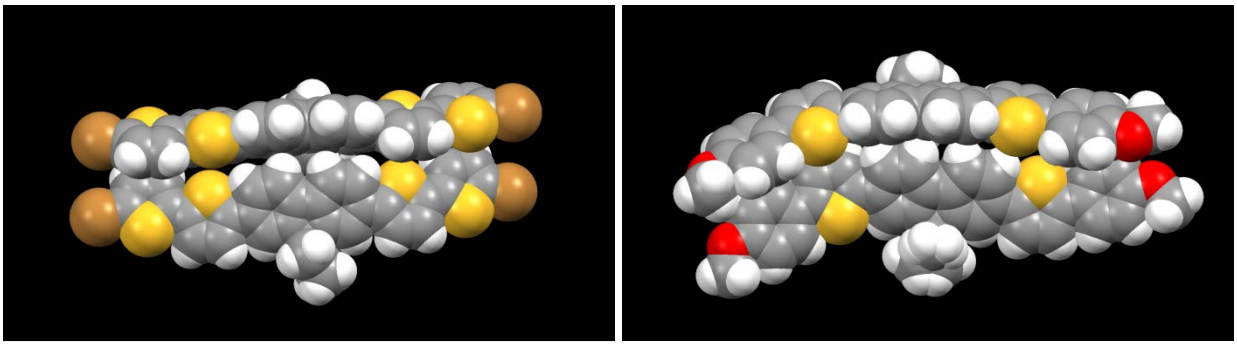


Figure 18. Unité asymétrique des molécules **23** (gauche) et **17** (droite).

À l'exception de trois composés (**17**, **20** et **23**), les thiophènes sont orientés de façon à ce que l'atome de soufre pointe à l'opposé du pont méthylène du fluorène. De plus, le système π conjugué se courbe du même côté, préservant ainsi une forte symétrie du quadrupôle ; la conservation de la symétrie du quadrupôle à l'état cristallin est importante.

En effet, ces fluorophores sont, de par leur symétrie, de bons absorbeurs à deux photons. La perte de symétrie pourrait profondément affecter les propriétés ONL de ces composés. La très forte planéité des systèmes π conjugués (θ_{TF}), comme le montre la figure 19, montre que dans l'état cristallin aucune distorsion majeure du chromophore n'est observée (mis à part pour le composé **17** qui possède un de ces dimères très tordus), ce qui assure de bonnes propriétés d'absorption et peut-être d'émission dans le cristal.

Il est intéressant de noter que le chromophore **14** est quasiment parfaitement plat dans l'état cristallin (figure 19).

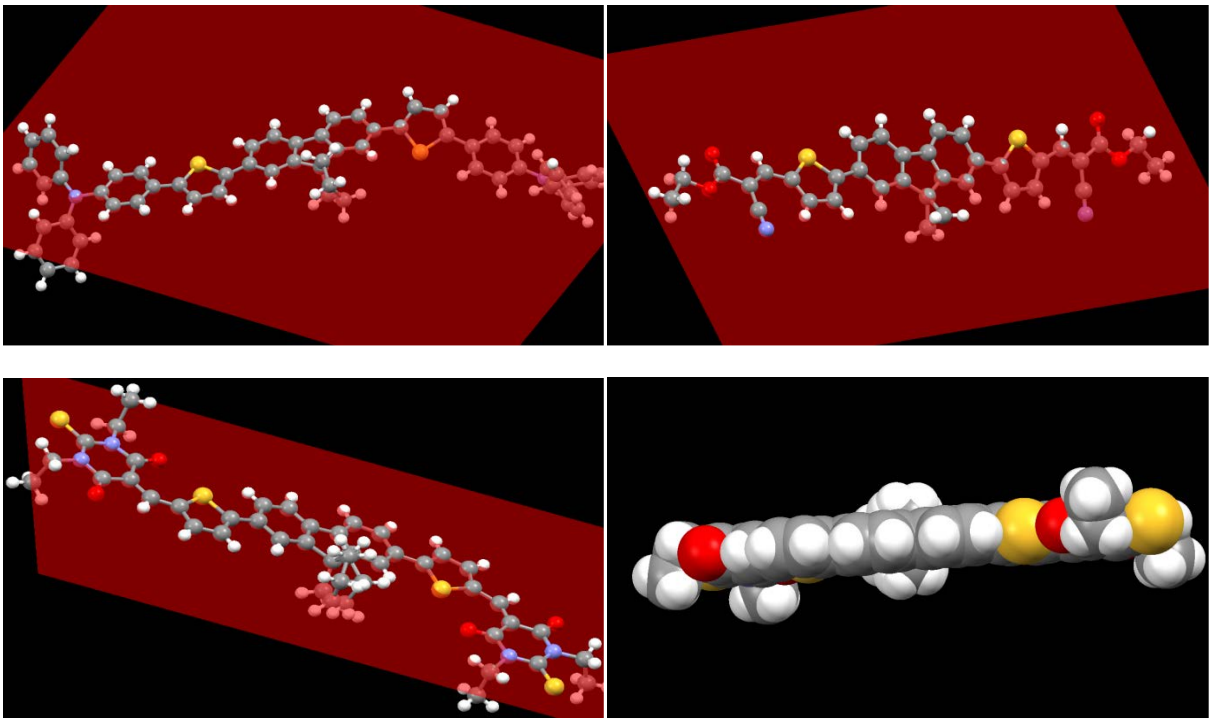


Figure 19. Haut : Plan formé par le système π conjugué d'un bras des quadrupôles **20** (gauche) et **13** (droite). Bas : Plan formé par le système π conjugué du quadrupôle **14** (gauche) et vue de **14** dans ce plan (droite).

L'agencement moléculaire montre que pour certains chromophores, notamment ceux présentant un système π étendu, de fortes interactions de type π-π ont lieu entre les bras des chromophores. Le composé **10** présente la plus forte interaction intermoléculaire ; cette interaction est de courte portée puisque les bras des deux chromophores sont distants de seulement 3.6Å, ce qui peut laisser présager un fort couplage (favorable ou non à l'émission) entre les deux molécules dans le cristal.

Prévoir l'influence de cet agencement moléculaire sur les propriétés photophysiques du cristal est assez hasardeux. Considérant uniquement le dimère présenté sur la figure 20 (à droite), il apparaît un chevauchement antiparallèle d'une partie des chromophores, conduisant à une extinction plus ou moins prononcée des moments dipolaires de ces deux fragments moléculaires. Une baisse du rendement quantique de luminescence peut apparaître via une augmentation du k_{nr}.

Cependant, la présence de cette espèce dimérique peut engendrer des excimères générant ainsi de nouvelles bandes d'émission plus décalées vers le rouge. Considérant le dimère, il est très intéressant de remarquer que malgré une forte interaction entre les molécules, la centrosymétrie du système est conservée, ce qui laisse présager que les propriétés d'optiques non linéaires du chromophore sont potentiellement conservées à l'état cristallin.

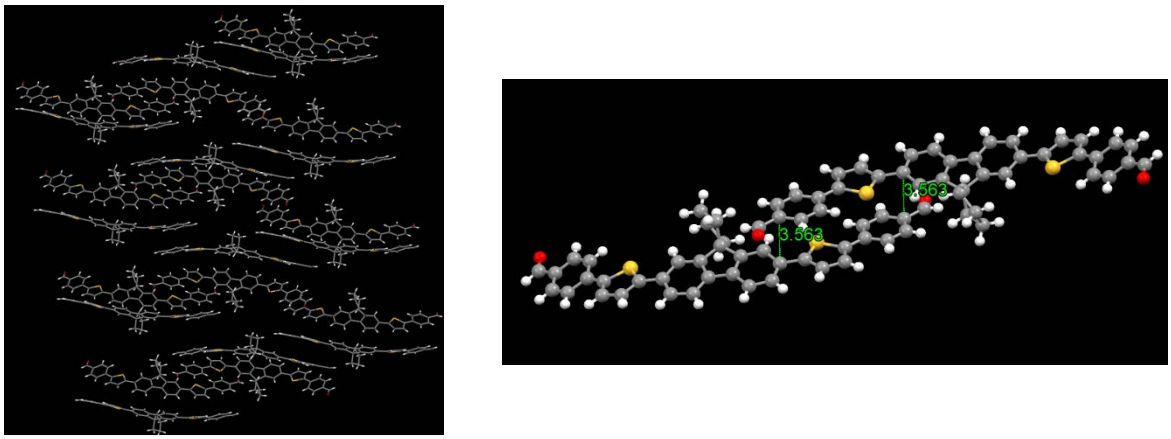


Figure 20. Interactions intermoléculaires dans le cristal de **10** : π-π stacking (Distance intermoléculaire = 0.356 nm).

L'étude de l'agencement moléculaire des composés **7** et **8** est aussi très intéressante puisque ces deux chromophores sont chimiquement quasi identiques, à l'exception du pont méthylène du fluorène, qui dans un cas porte un cycle à cinq carbones (**7**) et dans le second cas un cycle à trois carbones (**8**). La spectroscopie d'absorption UV-visible ainsi que d'émission a clairement démontré que cette différence n'interfère pas dans les propriétés optiques des fluorophores en solution. Cependant, l'émission dans le solide montre une différence notoire entre les deux molécules, avec un déplacement hypsochrome de l'émission de **8**.

Ce décalage de presque 100 nm montre qu'à l'état solide les chromophores ne sont pas soumis aux mêmes interactions. Nonobstant, dans le cristal, les molécules **7** et **8** adoptent la même conformation alors que leur groupe de symétrie n'est pas le même (C_{2v} pour **7** et D_{3h} pour **8**) ; mise à part une légère distorsion du fluorène plus marquée dans le cas de **8** (Figure 21).

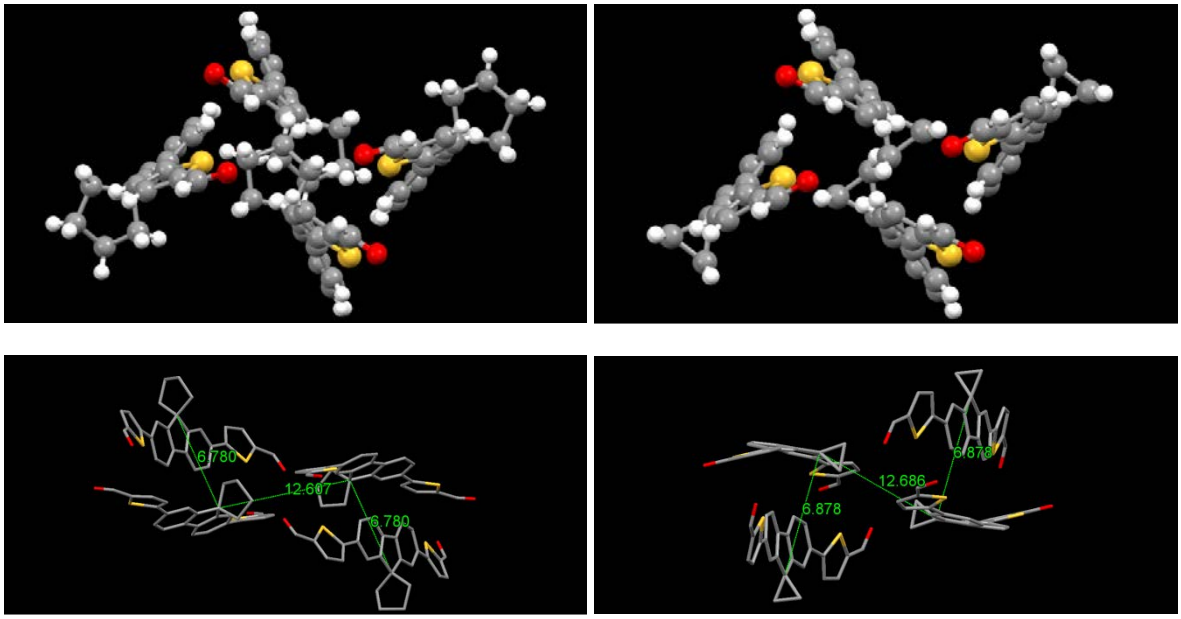


Figure 21. Interaction intermoléculaire dans les cristaux de **7** (gauche) et **8** (droite).

Toutes les structures cristallines des quadrupôles montrent que ceux-ci cristallisent en chevron, ce mode d'agencement est souvent observé pour ce genre de molécules.[27, 49]

Une nouvelle famille de quadrupôles à base de fluorène a été synthétisée et leurs propriétés photophysiques ont été étudiées en solution. Certains de ces fluorophores présentent un solvatochromisme positif en émission, indiquant une rupture de symétrie dans l'état excité. Ces nouveaux quadrupôles possèdent d'excellentes propriétés d'absorption à deux photons, avec des sections efficaces d'ADP atteignant plusieurs milliers de GM pour les accepteurs forts.

L'étude en solution des fluorophores a montré qu'une fonctionnalisation au niveau du pont méthylène du fluorène ne modifie pas les propriétés optiques de ceux-ci. L'étude de la fluorescence des quadrupôles dans l'état solide a montré que cette fonctionnalisation modifie profondément les propriétés photophysiques des chromophores dans le solide. Cette différence de comportement entre l'état solide et la solution moléculaire démontre qu'une

fonctionnalisation appropriée du chromophore permet de contrôler les interactions intermoléculaires dans le solide.

L'étude de l'agencement moléculaire dans le cristal a permis de confirmer l'existence d'agrégats de type *J* dont la présence dans l'état solide a été suggérée à la vue des propriétés optiques des chromophores dans cet état confiné. Cette analyse dans l'état solide et cristallin permet d'espérer la formation de nanoparticules fluorescentes pouvant présenter des caractéristiques d'agrégats *J* comme dans le solide.

Références bibliographiques

[1] Lee, W.-H.; Cho, M.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Two-Photon Absorption and Second Hyperpolarizability of the Linear Quadrupolar Molecule. *J. Phys. Chem. A* **2000,** *104*, 11033-11040.

[2] Mongin, O.; Porres, L.; Chariot, M.; Katan, C.; Blanchard-Desce, M., Synthesis, fluorescence, and two-photon absorption of a series of elongated rodlike and banana-shaped quadrupolar fluorophores: a comprehensive study of structure-property relationships. *Chem. - Eur. J.* **2007,** *13*, 1481-1498.

[3] Ventelon, L.; Blanchard-Desce, M.; Moreaux, L.; Mertz, J., New quadrupolar fluorophores with high two-photon excited fluorescence. *Chem. Commun. (Cambridge)* **1999**, 2055-2056.

[4] Ventelon, L.; Moreaux, L.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M., Optimization of quadrupolar chromophores for molecular two-photon absorption. *Synth. Met.* **2002,** *127*, 17-21.

[5] Albota, M.; Beljonne, D.; Bredas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Rockel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C., Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science* **1998,** *281*, 1653-6.

[6] Ciuciu, A. I.; Firmansyah, D.; Hugues, V.; Blanchard-Desce, M.; Gryko, D. T.; Flamigni, L., Non-classical donor-acceptor-donor chromophores. A strategy for high two-photon brightness. *J. Mater. Chem. C* **2014,** *2*, 4552-4565.

[7] Rouxel, C.; Charlot, M.; Mir, Y.; Frochot, C.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M., Banana-shaped biphotonic quadrupolar chromophores: from fluorophores to biphotonic photosensitizers. *New J. Chem.* **2011,** *35*, 1771-1780.

[8] Mongin, O.; Pla-Quintana, A.; Terenziani, F.; Drouin, D.; Le, D. C.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., Organic nanodots for multiphotonics: synthesis and photophysical studies. *New J. Chem.* **2007,** *31*, 1354-1367.

[9] Terenziani, F.; Painelli, A.; Katan, C.; Charlot, M.; Blanchard-Desce, M., Charge Instability in Quadrupolar Chromophores: Symmetry Breaking and Solvatochromism. *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 15742-15755.

[10] Barzoukas, M.; Blanchard-Desce, M., Molecular engineering of push–pull dipolar and quadrupolar molecules for two-photon absorption: A multivalence-bond states approach. *The Journal of Chemical Physics* **2000,** *113*, 3951-3959.

[11] Mongin, O.; Krishna, T. R.; Werts, M. H. V.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., A modular approach to two-photon absorbing organic nanodots: brilliant dendrimers as an alternative to semiconductor quantum dots? *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2006**, 915-917.

[12] Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W., A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chemical Reviews* **1991,** *91*, 165-195.

[13] Woon, K. L.; Aldred, M. P.; Vlachos, P.; Mehl, G. H.; Stirner, T.; Kelly, S. M.; O'Neill, M., Electronic Charge Transport in Extended Nematic Liquid Crystals. *Chemistry of Materials* **2006,** *18*, 2311-2317.

[14] Mazzeo, M.; Vitale, V.; Della, S. F.; Anni, M.; Barbarella, G.; Favaretto, L.; Sotgiu, G.; Cingolani, R.; Gigli, G., Bright white organic light-emitting devices from a single active molecular material. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2005,** *17*, 34-39.

[15] Ramakrishna, G.; Bhaskar, A.; Bauerle, P.; Goodson, T., Oligothiophene Dendrimers as New Building Blocks for Optical Applications†. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008,** *112*, 2018-2026.

[16] Mazzeo, M.; Vitale, V.; Della, S. F.; Pisignano, D.; Anni, M.; Barbarella, G.; Favaretto, L.; Zanelli, A.; Cingolani, R.; Gigli, G., New branched thiophene-based oligomers for bright organic light-emitting devices. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2003,** *15*, 2060-2063.

[17] Genin, E.; Gao, Z.; Varela, J. A.; Daniel, J.; Bsaibess, T.; Gosse, I.; Groc, L.; Cognet, L.; Blanchard-Desce, M., "Hyper-bright" Near-Infrared Emitting Fluorescent Organic Nanoparticles for Single Particle Tracking. *Adv. Mater.* **2014,** *26*, 2258-2261.

[18] Barbarella, G.; Melucci, M.; Sotgiu, G., The versatile thiophene: An overview of recent research on thiophene-based materials. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2005,** *17*, 1581-1593.

[19] Amro, K.; Daniel, J.; Clermont, G.; Bsaibess, T.; Pucheault, M.; Genin, E.; Vaultier, M.; Blanchard-Desce, M., New route towards fluorescent organic nanoparticles with red-shifted emission and increased colloidal stability. *Tetrahedron* **2014,** *70*, 1903-1909.

[20] Gierschner, J.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D., Absorption, fluorescence and light scattering of oligothiophene and oligophenylenevinylene nanoaggregates. *Synthetic Metals* **1997,** *84*, 529-530.

[21] McCulloch, I.; Heeney, M.; Bailey, C.; Genevicius, K.; MacDonald, I.; Shkunov, M.; Sparrowe, D.; Tierney, S.; Wagner, R.; Zhang, W.; Chabinyc, M. L.; Kline, R. J.; McGehee, M. D.; Toney, M. F., Liquid-crystalline semiconducting polymers with high charge-carrier mobility. *Nat Mater* **2006,** *5*, 328-333.

[22] Murphy, A. R.; Frechet, J. M. J., Organic Semiconducting Oligomers for Use in Thin Film Transistors. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007,** *107*, 1066-1096.

[23] Garnier, F.; Yassar, A.; Hajlaoui, R.; Horowitz, G.; Deloffre, F.; Servet, B.; Ries, S.; Alnot, P., Molecular engineering of organic semiconductors: design of self-assembly properties in conjugated thiophene oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993,** *115*, 8716-21.

[24] Zhou, H.; Zhou, F.; Tang, S.; Wu, P.; Chen, Y.; Tu, Y.; Wu, J.; Tian, Y., Two-photon absorption dyes with thiophene as π electron bridge: Synthesis, photophysical properties and optical data storage. *Dyes and Pigments* **2012,** *92*, 633-641.

[25] Egelhaaf, H. J.; Gierschner, J.; Oelkrug, D., Characterization of oriented oligo(phenylenevinylene) films and nano-aggregates by UV/Vis-absorption and fluorescence spectroscopy. *Synthetic Metals* **1996,** *83*, 221-226.

[26] Fushan, L.; Zhijian, C.; Bo, Q.; Wei, W.; Qihuang, G., Electroluminescence property of a novel dendritic polyfluorene derivative containing a triphenylamine group. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2005,** *38*, 847.

[27] Wang, Z.; Shao, H.; Ye, J.; Zhang, L.; Lu, P., Substituent effects on crosslike packing of 2',7'-diarylspiro(cyclopropane-1,9'-fluorene) derivatives: synthesis and crystallographic, optical, and thermal properties. *Adv. Funct. Mater.* **2007,** *17*, 253-263.

[28] Woo, H. Y.; Liu, B.; Kohler, B.; Korystov, D.; Mikhailovsky, A.; Bazan, G. C., Solvent Effects on the Two-Photon Absorption of Distyrylbenzene Chromophores. *Journal of the American Chemical Society* **2005,** *127*, 14721-14729.

[29] Strehmel, B.; Sarker, A. M.; Detert, H., The Influence of σ and π Acceptors on Two-Photon Absorption and Solvatochromism of Dipolar and Quadrupolar Unsaturated Organic Compounds. *ChemPhysChem* **2003,** *4*, 249-259.

[30] Amthor, S.; Lambert, C.; Dümmler, S.; Fischer, I.; Schelter, J., Excited Mixed-Valence States of Symmetrical Donor−Acceptor−Donor π Systems. *The Journal of Physical Chemistry A* **2006,** *110*, 5204-5214.

[31] Do, J.; Huh, J.; Kim, E., Solvatochromic Fluorescence of Piperazine-Modified Bipyridazines for an Organic Solvent-Sensitive Film. *Langmuir* **2009,** *25*, 9405-9412.

[32] Zhao, C.-H.; Wakamiya, A.; Inukai, Y.; Yamaguchi, S., Highly Emissive Organic Solids Containing 2,5-Diboryl-1,4-phenylene Unit. *Journal of the American Chemical Society* **2006,** *128*, 15934-15935.

[33] Monçalves, M.; Rampon, D. d. S.; Schneider, P. H.; Rodembusch, F. S.; Silveira, C. d. C., Divinyl sulfides/sulfones-based D–π–A–π–D dyes as efficient non-aromatic bridges for π-conjugated compounds. *Dyes and Pigments* **2014,** *102*, 71-78.

[34] Silly, M. G.; Porres, L.; Mongin, O.; Chollet, P.-A.; Blanchard-Desce, M., Optical limiting in the red-NIR range with soluble two-photon absorbing molecules. *Chem. Phys. Lett.* **2003,** *379*, 74-80.

[35] Lee, W.-H.; Lee, H.; Kim, J.-A.; Choi, J.-H.; Cho, M.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Two-Photon Absorption and Nonlinear Optical Properties of Octupolar Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123*, 10658-10667.

[36] Yang, W. J.; Kim, D. Y.; Jeong, M.-Y.; Kim, H. M.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., 2,6-Bis(styryl)anthracene derivatives with large two-photon cross-sections. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2003**, 2618-2619.

[37] Yang, W. J.; Kim, D. Y.; Jeong, M.-Y.; Kim, H. M.; Lee, Y. K.; Fang, X.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Two-photon absorption properties of 2,6-bis(styryl)anthracene derivatives: Effects of donor-acceptor substituents and the π center. *Chem. - Eur. J.* **2005,** *11*, 4191-4198.

[38] Yang, W. J.; Seo, M. S.; Wang, X. Q.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Two-photon Absorption Properties of 9,10-Disubstituted 2,6-Bis(p-dihexylaminostyryl)Anthracene Derivatives. Effect of 9,10-Substituents. *J. Fluoresc.* **2008,** *18*, 403-411.

[39] Kim, H. M.; Cho, B. R., Two-photon materials with large two-photon cross sections. Structure-property relationship. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 153-164.

[40] Tasior, M.; Hugues, V.; Blanchard-Desce, M.; Gryko, D. T., V-shaped, strongly-emitting, π-expanded hydrophilic azacyanines: Synthesis, linear and nonlinear optical properties. *Asian J. Org. Chem.* **2013,** *2*, 669-673.

[41] Yoo, J.; Yang, S. K.; Jeong, M.-Y.; Ahn, H. C.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., Bis-1,4-(p-diarylaminostyryl)-2,5-dicyanobenzene Derivatives with Large Two-Photon Absorption Cross-Sections. *Org. Lett.* **2003,** *5*, 645-648.

[42] Lee, S. K.; Yang, W. J.; Choi, J. J.; Kim, C. H.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R., 2,6-Bis[4-(p-dihexylaminostyryl)styryl]anthracene Derivatives with Large Two-Photon Cross Sections. *Org. Lett.* **2005,** *7*, 323-326.

[43] He, T.; Lim, Z. B.; Ma, L.; Li, H.; Rajwar, D.; Ying, Y.; Di, Z.; Grimsdale, A. C.; Sun, H., Large two-photon absorption of terpyridine-based quadrupolar derivatives: towards their applications in optical limiting and biological imaging. *Chem Asian J* **2013,** *8*, 564-71.

[44] Wang, Y.; Eisenthal, K. B., Picosecond dynamics of twisted internal charge transfer phenomena. The role of the solvent. *J. Chem. Phys.* **1982,** *77*, 6076-82.

[45] Ephardt, H.; Fromherz, P., Anilinopyridinium: solvent-dependent fluorescence by intramolecular charge transfer. *J. Phys. Chem.* **1991,** *95*, 6792-7.

[46] Gorse, A.-D.; Pesquer, M., Intramolecular Charge Transfer Excited State Relaxation Processes in Para-Substituted N,N-Dimethylaniline: A Theoretical Study Including Solvent Effects. *J. Phys. Chem.* **1995,** *99*, 4039-49.

[47] Kawski, A.; Kukliński, B.; Bojarski, P., Temperature influence on dual fluorescence of 4-(dimethylamino)benzaldehyde in 1,2-dichloroethane and ethyl acetate. *Chemical Physics Letters* **2008,** *455*, 52-54.

[48] Horn, D.; Rieger, J., Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. *Angewandte Chemie International Edition* **2001,** *40*, 4330-4361.

[49] Destri, S.; Pasini, M.; Botta, C.; Porzio, W.; Bertini, F.; Marchio, L., Synthesis and crystal structure and optical properties of fluorenic-core oligomers. *Journal of Materials Chemistry* **2002,** *12*, 924-933.

[50] Kasha, M.; Rawls, H. R.; El-Bayoumi, M. A., Exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **1965,** *11*, 371-92.

Chapitre VI – Préparation de nanoparticules organiques à base de chromophores quadripolaires

Chapitre VI – Préparation de nanoparticules organiques à base de chromophores quadripolaires

1. Préparation des FONs

La préparation des nanoparticules à base de quadrupôles est similaire à celle employée dans la préparation de FONs issue de chromophores dipolaires présentés précédemment.

Une solution concentrée du chromophore dans un solvant miscible à l'eau est ajoutée dans de l'eau osmose. Sauf indication contraire, les nanoparticules sont préparées à partir d'une solution de concentration 1 mM dans le THF, le volume d'ajout est de 200 µL pour un volume total de NPs de 20 mL. Le mode d'agitation diffère des FONs présentées précédemment puisqu'une agitation par sonotrode est utilisée. Les paramètres de l'agitation sont fixés ; la puissance de la sonotrode est de 10W, et le temps d'agitation est de 3 minutes. Pour des raisons de solubilité, les chromophores **13**-**15** sont précipités à partir d'une solution de concentration 0.5 mM dans le THF et les FONs **19** sont préparées à partir d'une solution dans le DMF.

Les FONs à base des chromophores Spiro présentées dans cette section sont préparées selon la procédure décrite ci-dessus ; une fois l'addition terminée, la solution aqueuse se colore immédiatement, variant du vert au bleu selon les chromophores utilisés.

Cette coloration plus ou moins intense démontre que le chromophore est solvaté dans l'eau. Puisque ces chromophores sont insolubles dans l'eau, et que dans tous les cas la solution obtenue est limpide, la formation d'agrégats de taille nanométrique est fortement suggérée. Les mesures d'absorption et de diffusion de la lumière (DLS) attestent systématiquement de la formation de nanoparticules absorbantes dans le visible. Enfin, la spectrofluorimétrie atteste la présence de nanoparticules luminescentes, justifiant l'appellation de FONS pour ces nanoagrégats.

L’étude de la luminescence à l’état solide a montré que les intermédiaires réactionnels **5**, **6**, **16** et **23** fluorescent dans l’état solide. Pour cette raison, ces chromophores ont aussi été étudiés à l’état de nanoagrégats.

2. Propriétés photophysiques des FONs à base de quadrupôles

2.1 Influence de la nature du système π sur les FONs

1. Ajout d’un phényle ou d’un thiophène

Les nanoparticules issues de la précipitation des chromophores **5**-**7**, **10**-**11**, **16** et **23** absorbent toutes dans le proche UV et le visible. Les FONs issues des chromophores possédant comme groupe terminal un hydrogène (**5**, **6**) ou un brome (**16**, **23**) présentent une luminescence marquée à l’état de nanoagrégats. Bien que cette observation concorde avec les mesures de luminescence dans l’état solide (figure 1), la comparaison entre les propriétés photophysiques des FONs et des chromophores en solution montre un comportement spectral singulier des nanoparticules.

Les spectres d’absorption des chromophores (**5**, **6**, **16** et **23**) dans l’eau sous forme de nanoparticules présentent un déplacement hypsochrome par rapport à ceux enregistrés en solution dans le THF (figure 1). À l’inverse, les spectres d’émission de fluorescence des nanoparticules montrent un déplacement bathochrome. Il est intéressant de remarquer que les quatre spectres d’absorption dans les nanoparticules, possèdent tous une nouvelle bande d’absorption faible dans le visible. Ces déplacements de bandes ainsi que l’apparition de cette nouvelle bande d’absorption sont discutés dans la section 4.

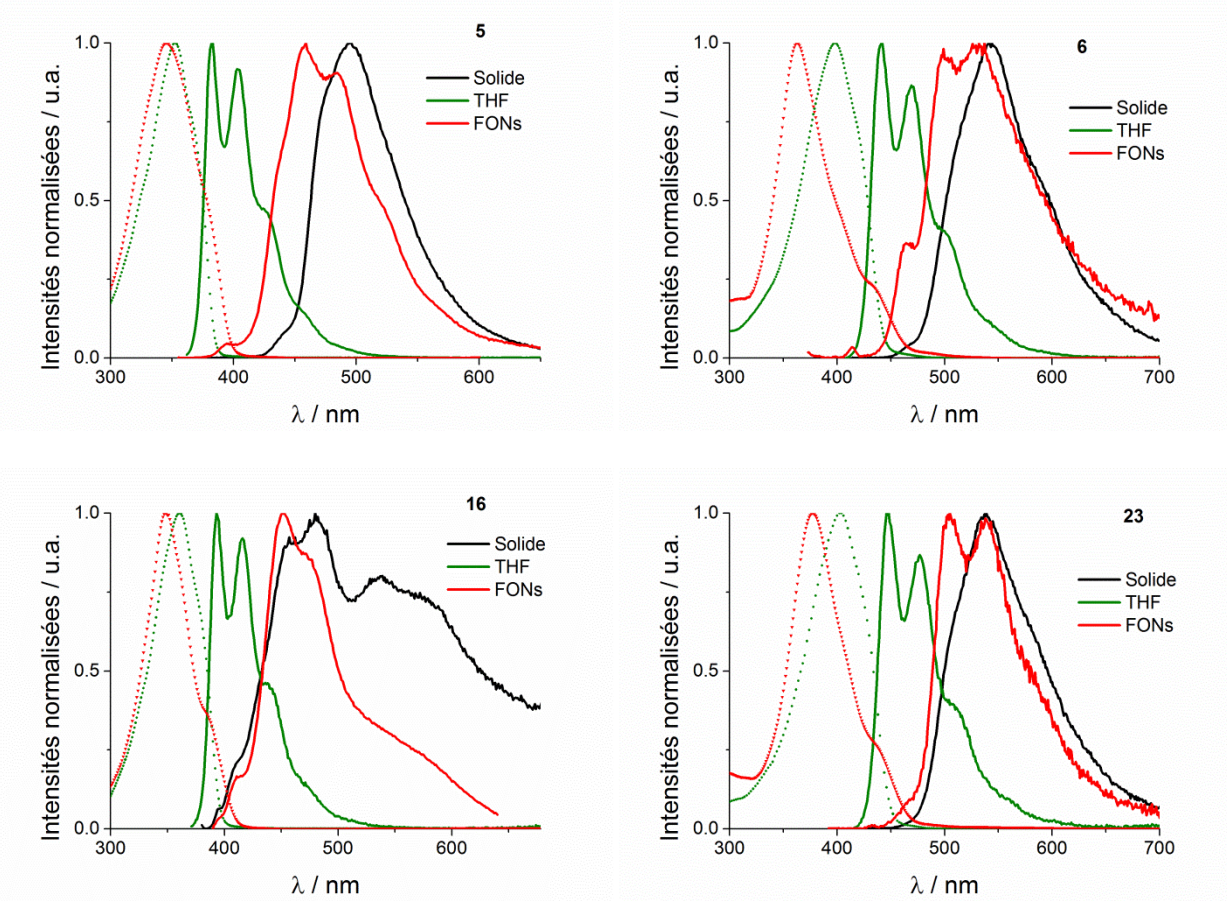


Figure 1. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores **5**, **6** et **16**, **23** dans l'état solide (vert), en solution dans le THF (noir) et dans l'eau sous forme de nanoagrégats (rouge).

L'étude des propriétés photophysiques des FONs montre que l'élongation du système π (via l'ajout d'un thiophène), conduit à un décalage bathochrome de l'absorption et de l'émission. Conformément au comportement en solution, dans le cas des composés **5** et **6**, un effet hyperchrome est observé lors de l'ajout d'un thiophène.

Il est frappant de remarquer la forte disparité des rendements quantiques de luminescence des molécules **5** et **6** à l'état de nanoparticules ; alors que les FONs issues de **5** sont très fluorescentes (Φ_F = 0.19), celles issues de **6** ne le sont quasiment pas (Φ_F = 0.01). Pour autant, les FONs obtenues à partir des molécules **16** et **23** présentent des rendements quantiques de luminescence similaires (Φ_F = 0.04).

Tableau 1. Propriétés photophysiques des chromophores **5**-**7**, **16**, **23**, **10** et **11** dans l'eau à l'état de nanoagrégats.

FONs	D/A	π	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{em}^{max} nm	Φ_F *b)*	Stokes' shift cm^{-1}	FWHM *c)* cm^{-1}	τ *d)* ns
5	H	T	344	$3.5\ 10^4$	457	0.19	7 200	$3.9\ 10^3$	0.6 (0.85) 1.7 (0.15)
6	H	TT	363	$4.2\ 10^4$	501	0.01	7 600	$3.9\ 10^3$	0.2 (0.97) 1.5 (0.03)
16	Br	T	355	$5.3\ 10^4$	498	0.07	8 100	$3.0\ 10^3$	0.4 (0.98) 2.2 (0.02)
23	Br	TT	373	$5.3\ 10^4$	505	0.04	6 700	$3.0\ 10^3$	0.3 (0.97) 2.4 (0.03)
7	CHO	T	348	$3.8\ 10^4$	472	0.06	7 500	$4.5\ 10^3$	0.4 (0.92) 2.1 (0.08)
10	CHO	TP	387	$3.9\ 10^4$	525	0.03	6 800	$3.1\ 10^3$	0.7 (0.78) 3.3 (0.22)
11	CHO	TT	398	$1.5\ 10^4$	610	0.02	8 700	$4.2\ 10^3$	0.7 (0.85) 3.0 (0.15)

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la quinine bisulfate dans H_2SO_4 1N, la fluorescéine dans NaOH 1N ou le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Largeur à mi-hauteur de l'émission des FONs. *d)* Temps de vie de fluorescence.

Concernant les composés **5** et **6**, la différence de rendement quantique de fluorescence peut être attribuée à un π stacking très fort pour **6**, ce qui augmente considérablement la valeur de k_{nr}. Si l'on compare **5** et **16**, on remarque que la présence du brome diminue le rendement quantique de fluorescence des FONs. Cet effet est attendu puisque les bromes par effets d'atome lourd augmentent la probabilité de croisement intersystème, et donc augmente la valeur de k_{nr}. Cette hypothèse est renforcée par la présence de deux temps de vie de fluorescence, plus faible pour les FONs **6** que pour les FONs **5**.

La comparaison entre **6** et **23** est très intéressante, puisque contrairement à ce que laisse présager la présence du brome, la valeur du rendement quantique de fluorescence augmente pour **23**. Cet effet inattendu, concorde avec la possibilité d'un π stacking fort au sein des FONs **6.** Alors que la présence du brome augmente le croisement intersystème, sa taille imposante prévient les interactions de courtes portées (telles que le π stacking).

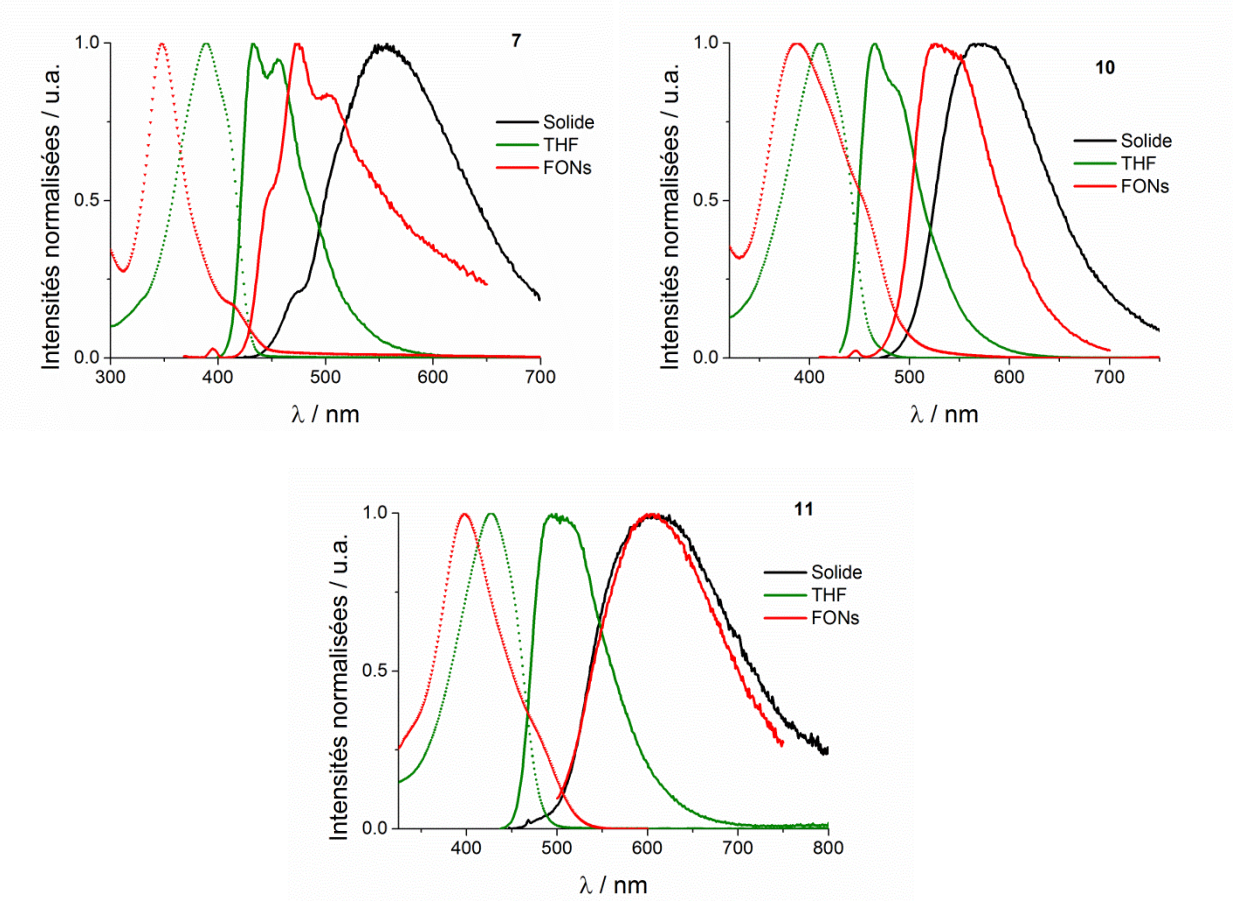


Figure 2. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores **7**, **10** et **11** dans l'état solide (vert), en solution dans le THF (noir) et dans l'eau sous forme de nanoagrégats (rouge).

Les FONs préparées par la précipitation des chromophores **7**, **10** et **11** dans l'eau présentent un comportement similaire. L'absorption est aussi décalée vers le bleu dans les FONs par rapport aux chromophores solubilisés dans le THF, alors que l'émission est fortement décalée vers le rouge. Curieusement, contrairement aux FONs **7** et **10**, l'émission des FONs **11** dans l'eau est identique à l'émission du chromophore dans l'état solide.

Dans l'hypothèse d'une émission provenant du cœur de la nanoparticule, ceci semble indiquer que le cœur des FONs **11** présente une très forte organisation. Cette organisation au sein de la nanoparticule peut, si elle s'étend à la surface des FONs, expliquer le fort effet hypochrome observé pour **11** dans l'eau (tableau 1).

Similairement au comportement en solution, l'ajout d'un thiophène (**7** à **11**) s'accompagne d'un décalage des bandes d'absorption et d'émission vers le rouge.

2. Ajout d'un vinyle

Sous forme de nanoagrégats dans l'eau, les chromophores **19** et **21** présentent le même type d'éclatement des bandes d'absorption et d'émission que les FONs décrites dans la section 1.1. Il est remarquable de noter que similairement aux FONs **11**, l'émission des FONs **19** et **21** est très proche de celle mesurée dans l'état solide (figure 3).

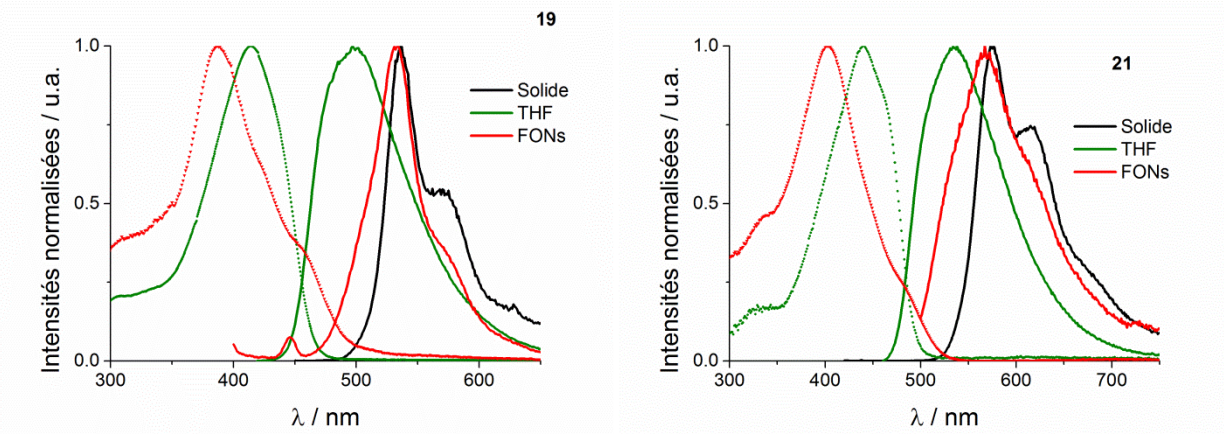


Figure 3. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores **19** et **21** dans l'état solide (vert), en solution dans le THF (noir) et dans l'eau sous forme de nanoagrégats (rouge).

Du point de vue de l'absorption et de l'émission des FONs **19** et **21** dans l'eau, le bénéfice apporté par l'ajout d'un système vinylique est très faible (tableau 2). Cependant, la flexibilité de cette double liaison permet d'augmenter significativement la solubilité du composé dans les solvants organiques.

Tableau 2. Propriétés photophysiques des chromophores **19** et **21** dans l'eau à l'état de nanoagrégats.

FONs	D	π	λ_{abs}^{max} nm	λ_{em}^{max} nm	Φ_F *b)*	Stokes' shift cm^{-1}	FWHM *c)* cm^{-1}	τ *d)* ns
19	NMe_2	TP	387	534	0.01	7 100	$1.6\ 10^3$	0.3 (0.93) 4.3 (0.07)
21	NMe_2	TVP	402	567	0.001	7 200	$3.2\ 10^3$	-

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Largeur à mi-hauteur de l'émission. *d)* Temps de vie de fluorescence.

Alors que pour les quadrupôles accepteurs de types CHO, l'extension du système π conjugué décale significativement l'absorption et l'émission des nanoparticules, cet effet est plus modéré dans le cas des quadrupôles donneurs **19** et **21**. Ce résultat, analogue aux données en solution montre que l'allongement du système π conjugué *via* l'utilisation de groupements

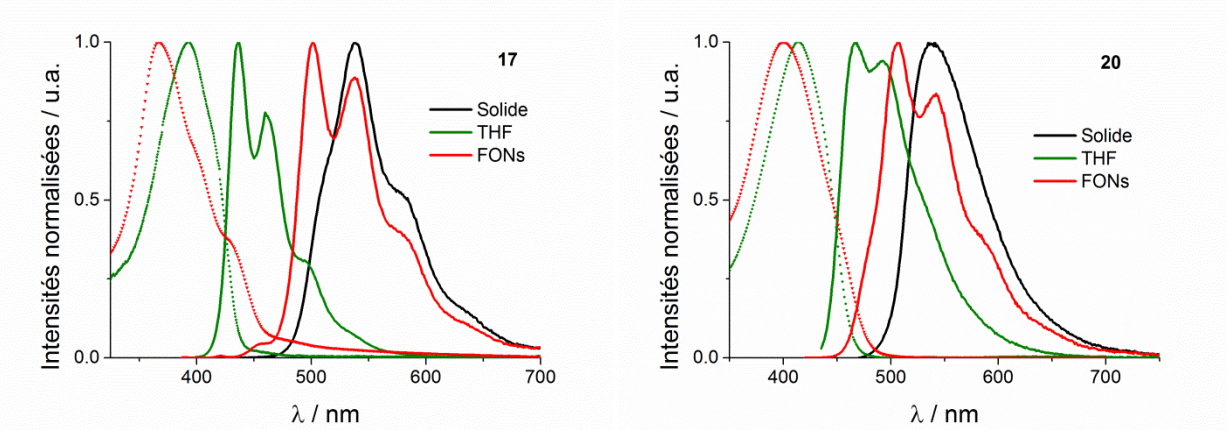
vinyles n'est pas une stratégie viable, à l'inverse l'utilisation d'un thiophène permet un déplacement vers le rouge plus intense, tout en maintenant un rendement quantique de fluorescence correct.

2.2 Influence de la nature des groupements donneurs ou accepteurs sur les FONs

L'étude de l'impact du système π conjugué sur les propriétés photophysiques des FONs a essentiellement montré que le comportement en solution entre différents chromophores est transposable aux FONs issues de la précipitation de ces chromophores. De plus, l'utilisation de groupements flexibles comme les vinyles ne permet pas de maintenir une luminescence correcte.

Afin de compléter cette étude, l'influence des groupements donneurs et attracteurs des quadrupôles sur les propriétés photophysiques des FONs est examinée.

À la vue des propriétés photophysiques des quadrupôles accepteurs dans l'état solide, il n'est pas surprenant d'observer que les FONs **12**, **14**, **17**, **20** et **22** présentent aussi un éclatement des bandes d'absorption et d'émission dans l'eau. D'une façon intéressante, les FONs à base de quadrupôles donneurs (**17**, **20** et **22**) ou accepteurs forts (**12** et **14**) ont une émission similaire à celle dans le solide microcristallin (figure 4).



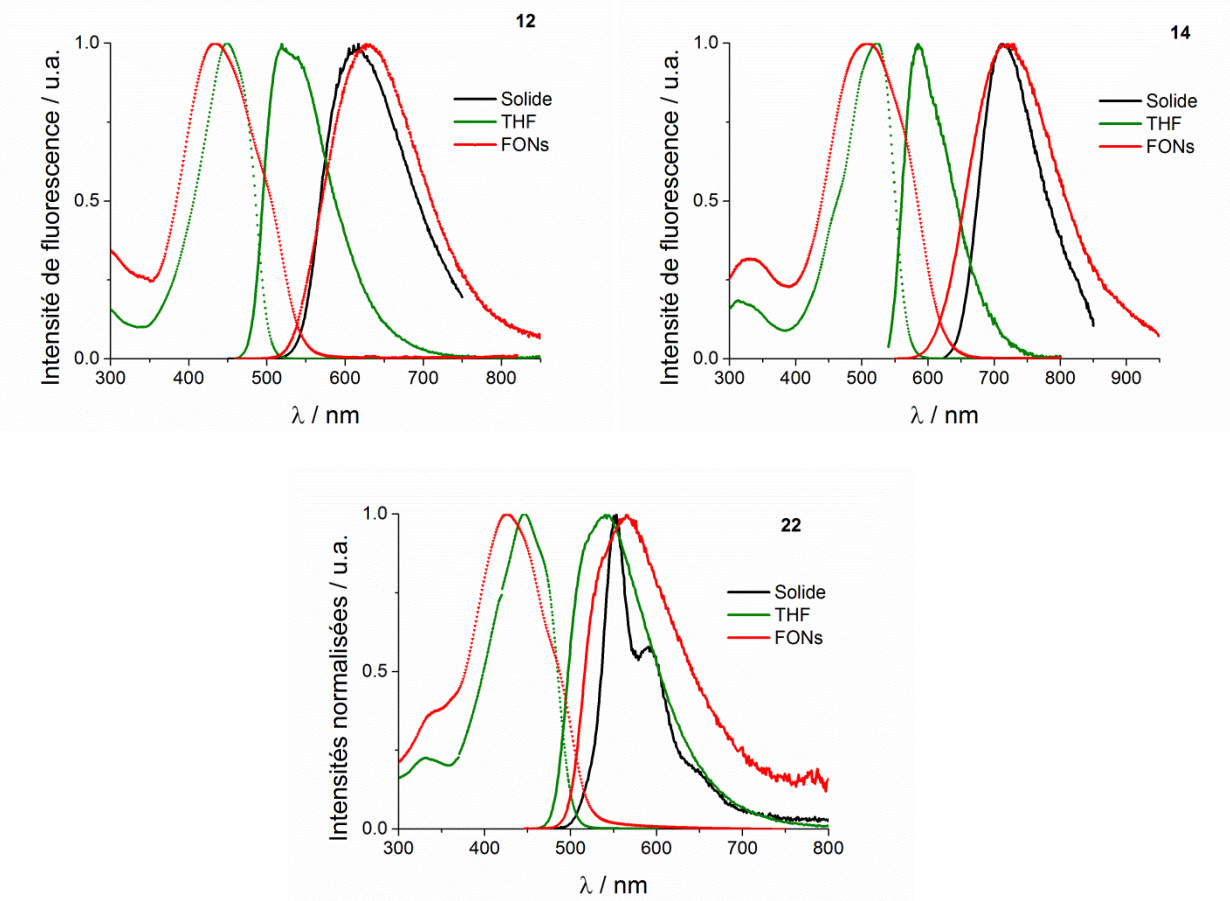


Figure 4. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores **12**, **14**, **17**, **20**, **22** dans l'état solide (vert), en solution dans le THF (noir) et dans l'eau sous forme de nanoagrégats (rouge).

Le comportement des chromophores **17** et **20** dans l'eau est très intéressant. Alors qu'en solution dans le THF le fluorophore **20** possède une émission plus décalée vers le rouge, du fait que son groupement diphénylamine est un meilleur donneur que le groupement méthoxy. On ne retrouve pas ce résultat dans les FONs. Bien que faiblement donneur, l'émission des FONs **17** est remarquablement décalée vers le rouge, égalant l'émission des FONs **20**. De même, le rendement quantique de fluorescence des FONs **17** est supérieur aux FONs **20** dans l'eau (tableau 3). Ces éléments, ainsi que la conservation d'une structure vibrationnelle dans l'émission des FONs **17** (figure 4) indiquent un coupage excitonique très fort certainement dû à une très forte organisation à la surface et dans les nanoparticules **17**.

Tableau 3. Propriétés photophysiques des chromophores **12**, **14**, **17**, **19**, **20** et **22** dans l'eau à l'état de nanoagrégats.

	D/A	π	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{em}^{max} nm	Φ_F *b)*	Stokes' shift cm^{-1}	FWHM *c)* cm^{-1}	τ *d)* ns
17	OMe	TP	367	$3.8\ 10^4$	501	0.18	7 300	$2.6\ 10^3$	0.8 (0.80) 1.6 (0.20)
20	NPh_2	TP	400	$5.5\ 10^4$	507	0.12	5 300	$2.8\ 10^3$	0.6 (0.92) 2.2 (0.08)
12	CN	TV	435	$3.9\ 10^4$	627	0.07	7 000	$3.4\ 10^3$	1.6 (0.70) 4.5 (0.30)
14	Thiob.	TV	503	$5.5\ 10^4$	716	0.01	5 900	$2.9\ 10^3$	1.1 (0.90) 4.6 (0.10)
22	NBu_2	TVP	426	$7.2\ 10^4$	560	0.02	5 600	$3.4\ 10^3$	0.4 (0.89) 3.2 (0.11)

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la fluorescéine dans NaOH 1N ou le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Largeur à mi-hauteur de l'émission. *d)* Temps de vie de fluorescence.

L'utilisation de groupements accepteurs forts (**12** et **14**) décale plus fortement l'émission des FONs vers le rouge, que l'utilisation de donneurs forts (**22**). L'accepteur cyano (**12**) permet de décaler l'émission des nanoparticules dans le rouge avec un bon rendement quantique de fluorescence. L'utilisation d'un accepteur plus fort telle que le dérivé thiobarbiturique (**14**) permet d'atteindre le proche infrarouge, mais au prix d'une fluorescence beaucoup plus faible (tableau 3).

Cette section a mis en avant le rôle joué par les groupements accepteurs et donneurs sur les propriétés d'émission des FONs dans l'eau. Les quadrupôles à base de donneurs et d'accepteurs montrent des tendances différentes ; dans le cas d'un groupement donneur, le paramètre à privilégier semble être l'organisation du chromophore plutôt que l'utilisation de groupements plus forts tels que les amines. L'origine des faibles performances des FONs à base de donneur amino peut provenir de processus tels que des transferts électroniques ou bien l'oxydation de la surface des FONs.

A contrario, pour les groupements accepteurs, l'utilisation d'accepteurs très forts permet d'obtenir des nanoparticules émettrices rouge/proche IR performantes. Bien que les données cristallines des fluorophores **12** et **15** soient manquantes, il est raisonnable à la vue

des résultats de suggérer que la forte luminescence des FONs **12** soit due à des interactions interbranches très orientées (configuration *J*) avec une distance entre les branches importantes.

2.3 Influence de l'encombrement du cœur sur les FONs

L'influence du type de garde sur les propriétés photophysiques des FONs est le dernier paramètre des chromophores étudiés. Alors qu'en solution moléculaire, les chromophores possédant une garde pentyle (**7**, **12**, **14**) ont les mêmes caractéristiques photophysiques que les chromophores à garde propyle (**8**, **13**, **15**), cette caractéristique ceci n'est plus observé dans les nanoparticules (figure 5, tableau 4).

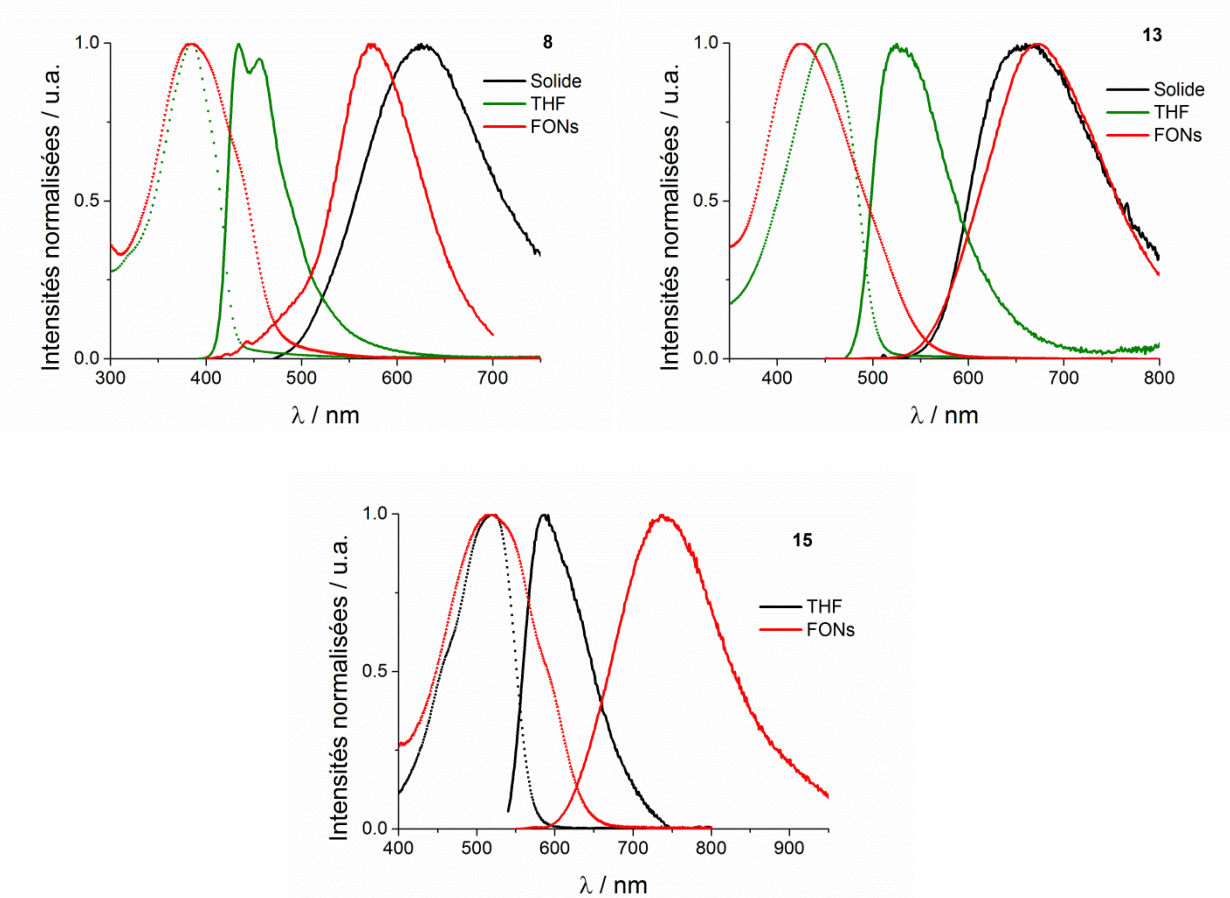


Figure 5. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores **8**, **13**, **15** dans l'état solide (vert), en solution dans le THF (noir) et dans l'eau sous forme de nanoagrégats (rouge).

Les FONs à base de quadrupôles propyle et pentyle ont des émissions de fluorescence similaires à celles dans l'état solide (figure 3 et 4). Ceci pourrait indiquer que les interactions intermoléculaires sont plus prononcées pour ces FONs que pour celles préparées à partir de chromophores dipolaires (chapitre II et IV). Outre les décalages des bandes d'absorption et

d'émission, une tendance très intéressante se dégage de l'étude des FONs **7**, **8**, **12-15** : plus la force de l'accepteur augmente, moins la différence entre l'utilisation d'une garde propyle et pentyle est importante (tableau 4). Cette caractéristique est très importante puisqu'elle prouve que les interactions moléculaires dans les nanoparticules à base de quadrupôles sont très fortes, mais aussi qu'elles sont modulées par l'encombrement stérique autour du fluorène.

Tableau 4. Propriétés photophysiques des chromophores **7**, **8**, **12-15** dans l'eau à l'état de nanoagrégats.

FONs	A	Cœur	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Φ_F *b)*	Stokes' shift cm^{-1}	FWHM *c)* cm^{-1}	τ *d)* ns
7	CHO	Pe.	348	$3.8\ 10^4$	472	0.03	7 500	$4.5\ 10^3$	0.4 (0.92) 2.1 (0.08)
8	CHO	Pr.	397	$3.0\ 10^4$	576	0.02	7 800	$4.7\ 10^3$	1.1 (0.40) 3.6 (0.60)
12	CN	Pe.	435	$3.9\ 10^4$	627	0.07	7 000	$3.4\ 10^3$	1.6 (0.70) 4.5 (0.30)
13	CN	Pr.	418	$3.4\ 10^4$	662	0.01	8 800	$3.3\ 10^3$	1.3 (0.70) 3.7 (0.30)
14	Thiob.	Pe.	503	$5.5\ 10^4$	716	0.01	5 900	$2.9\ 10^3$	1.1 (0.90) 4.6 (0.10)
15	Thiob.	Pr.	514	-	738	0.01	5 900	$2.8\ 10^3$	0.9 (0.78) 2.8 (0.22)

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard la quinine bisulfate dans H_2SO_4 1N ou le crésyl violet dans le méthanol. *c)* Largeur à mi-hauteur de l'émission. *d)* Temps de vie de fluorescence.

Ces mesures de dépendance des propriétés photophysiques des FONs à base de quadrupôles en fonction de la structure moléculaire des chromophores ont permis de dégager certaines tendances.

L'utilisation d'un système oligothiophène est un bon compromis entre flexibilité et performance pour la préparation de nanoparticules luminescentes. L'utilisation de quadrupôles à base de groupements donneurs permet d'obtenir des FONs très fluorescentes (**17**, **20**), mais dont l'émission est majoritairement verte. L'utilisation de quadrupôles à base d'accepteurs permet de décaler l'émission des FONs vers les basses énergies.

Contrairement aux dipôles, les interactions intermoléculaires au sein des FONs à base de quadrupôles doivent être maximisées afin de favoriser certains couplages excitoniques. Cependant, plus la délocalisation électronique au sein du quadrupôle est importante, moins la proximité entre les chromophores dans les FONs est utile.

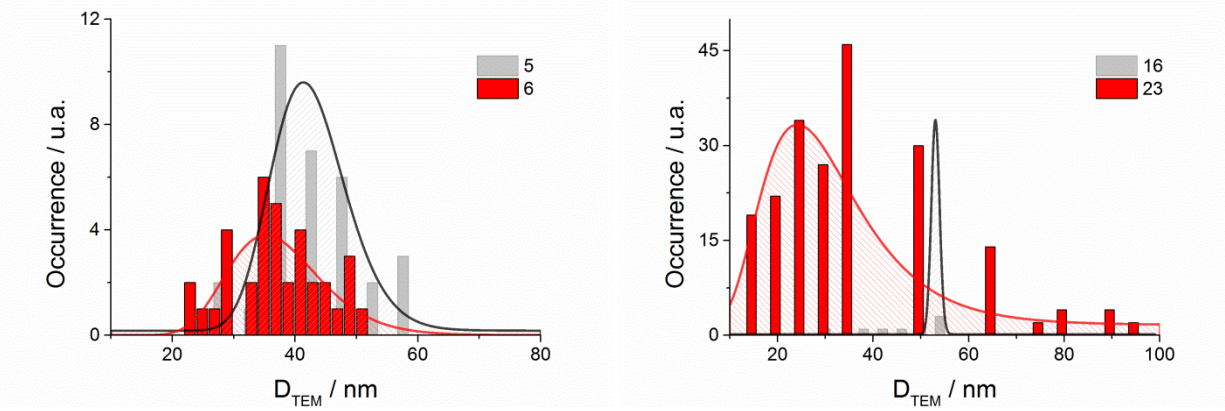
3. Caractéristiques des FONs dans l'eau

3.1 Détermination de la taille des FONs

Les propriétés photophysiques des nanoparticules sont très importantes, mais leurs caractéristiques physiques jouent un rôle essentiel pour leurs possibles applications. Certains paramètres clés, tels que la morphologie des FONs, la nature de leur surface et le nombre d'unités chromophoriques par nanoparticules (N), doivent être déterminés pour compléter afin d'estimer la stabilité et la brillance des FONs à base de quadrupôles.

Dans le but de déterminer la forme des nanoparticules ainsi que leur taille, des mesures de taille par microscopie électronique à transmission (TEM) ont été réalisées sur les FONs. Les résultats des observations de TEM sont répertoriés dans les figures 6a et 6b.

Les FONs ont une forme sphérique avec des diamètres allant de 14 nm (**14**) à 53 nm (**16**), attestant l'utilisation du terme nanoparticule pour décrire ces objets. Curieusement, les FONs **7** n'adoptent pas de conformation sphérique, mais semblent s'assembler en nanorods (figure 7), pour cette raison, la taille des FONs **7** est exprimée en aire.



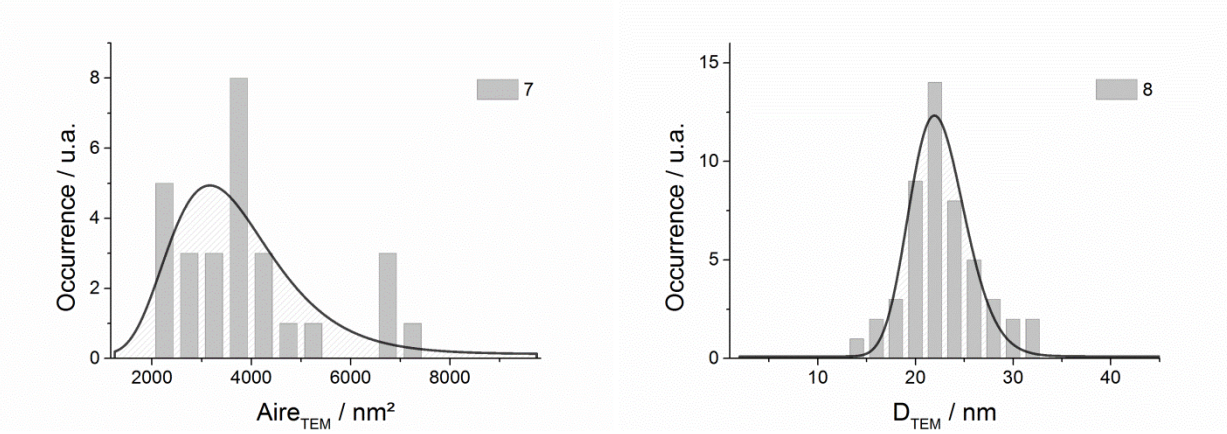
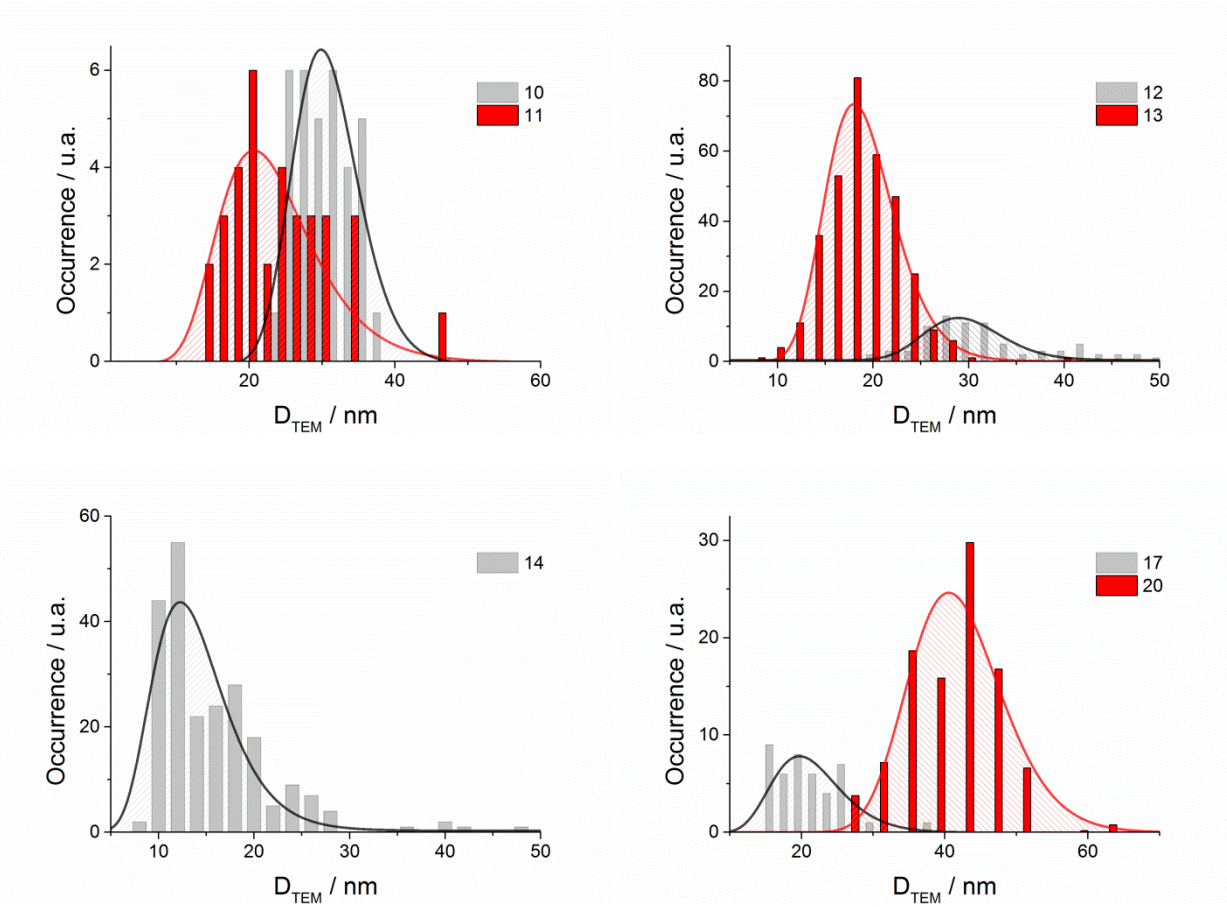


Figure 6a. Histogramme de distribution de taille des FONs obtenu par analyse d'image TEM. La distribution est exprimée par l'utilisation d'une courbe de fit en log normal (ligne).

La distribution de taille des FONs montre une homogénéité de taille différente pour chaque nanoparticule, cependant l'utilisation d'une courbe d'ajustement de type logarithmique permet d'estimer la taille moyenne des FONs avec une bonne précision (tableau 5).



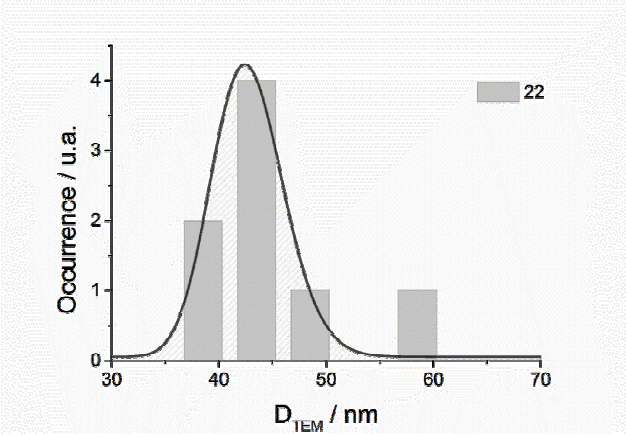


Figure 6b. Histogramme de distribution de taille des FONs obtenu par analyse d'image TEM. La distribution est exprimée par l'utilisation d'une courbe de fit en log normal (ligne).

Cette taille moyenne est utilisée pour déterminer le nombre moyen de chromophores (N) composant une nanoparticule. Pour ce calcul de N, nous avons estimé la densité des nanoparticules comme étant proche de celle de l'eau. Cette estimation est réaliste en tenant compte du fait que les FONs restent en solution dans l'eau, sans signe évident de sédimentation ou de flottement de celles-ci.

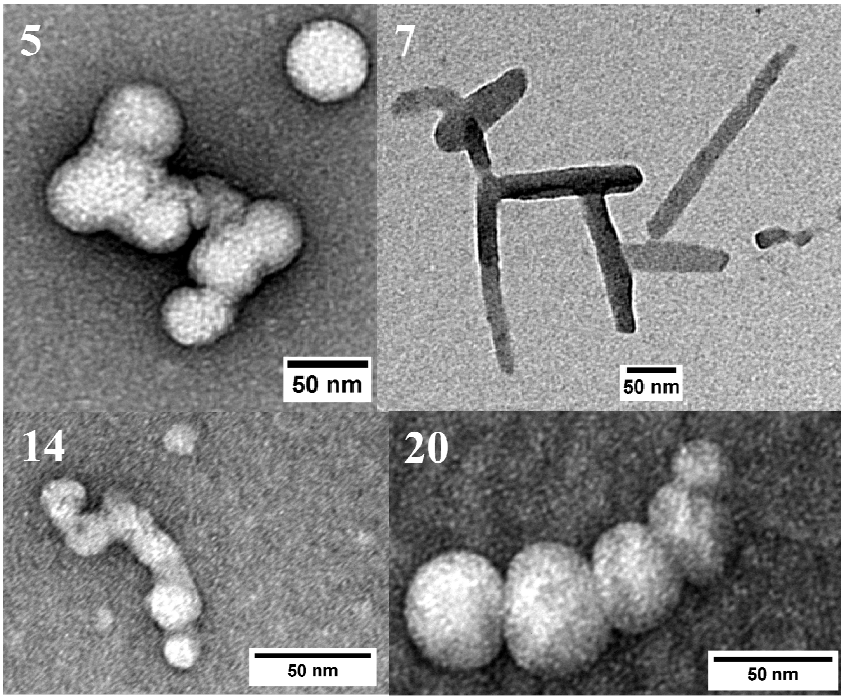


Figure 7. Clichés TEM des FONs **5**, **7**, **14** et **20**.

Les similitudes entre la morphologie des FONs **7** observée en TEM et les cristaux de **7** (figure 8), laissent penser que les FONs **7** adoptent une conformation proche du cristal, pour cette raison, la densité des FONs **7** utilisée dans le calcul de N est celle du cristal (d = 1.386).

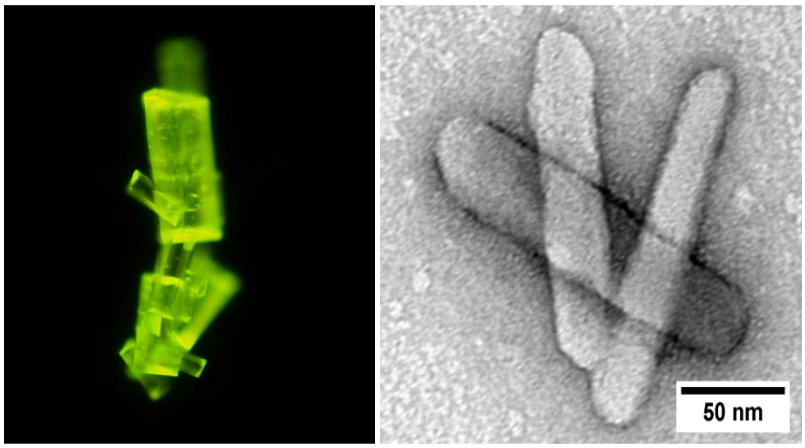


Figure 8. Cristaux de **7** de tailles micrométriques (gauche) observées au microscope optique par fluorescence et TEM des FONs **7** (droite).

Afin de compléter l'étude de taille des FONs, des mesures de dispersion de la lumière par les FONs ont été réalisées. Les FONs **7** n'étant pas sphériques, le modèle mathématique utilisé par l'appareil de mesure DLS pour le calcul du diamètre hydrodynamique (D_h) ne peut s'appliquer. Pour cette raison, les FONs **7** n'ont pas été étudiées par DLS (figure 9a et 9b, tableau 5).

Toutes les nanoparticules exceptées les FONs **5** montrent une population unique. La valeur de D_h de la population la plus petite des FONs **5** est centrée sur 27 nm, ce qui est relativement bas comparé à ce qui a été mesuré en TEM (figure 7). La présence de cette population sur les corrélogrammes des FONs **5** n'est pas expliquée.

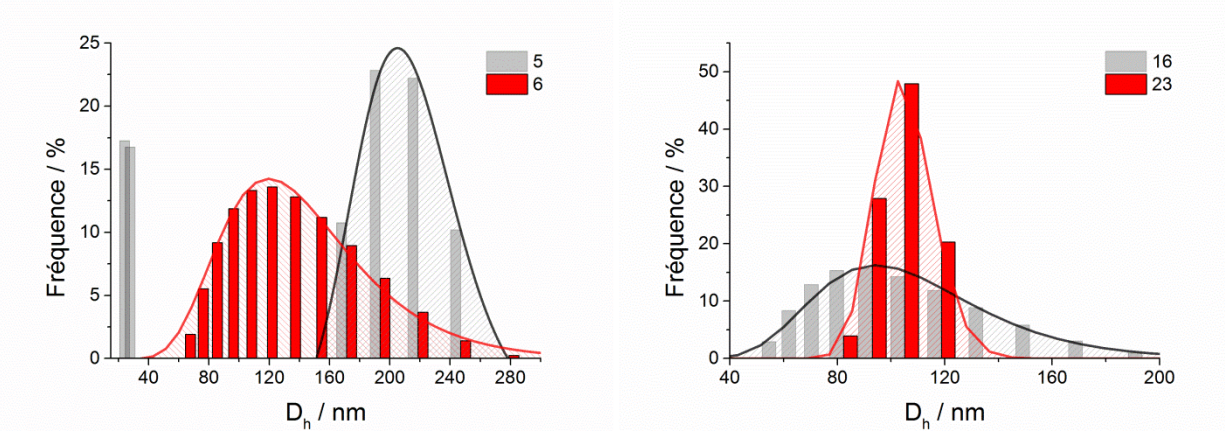


Figure 9a. Distribution de taille hydratée des FONs dans l'eau obtenue par diffusion de la lumière. La distribution est exprimée par l'utilisation d'une courbe de fit en log normal (ligne).

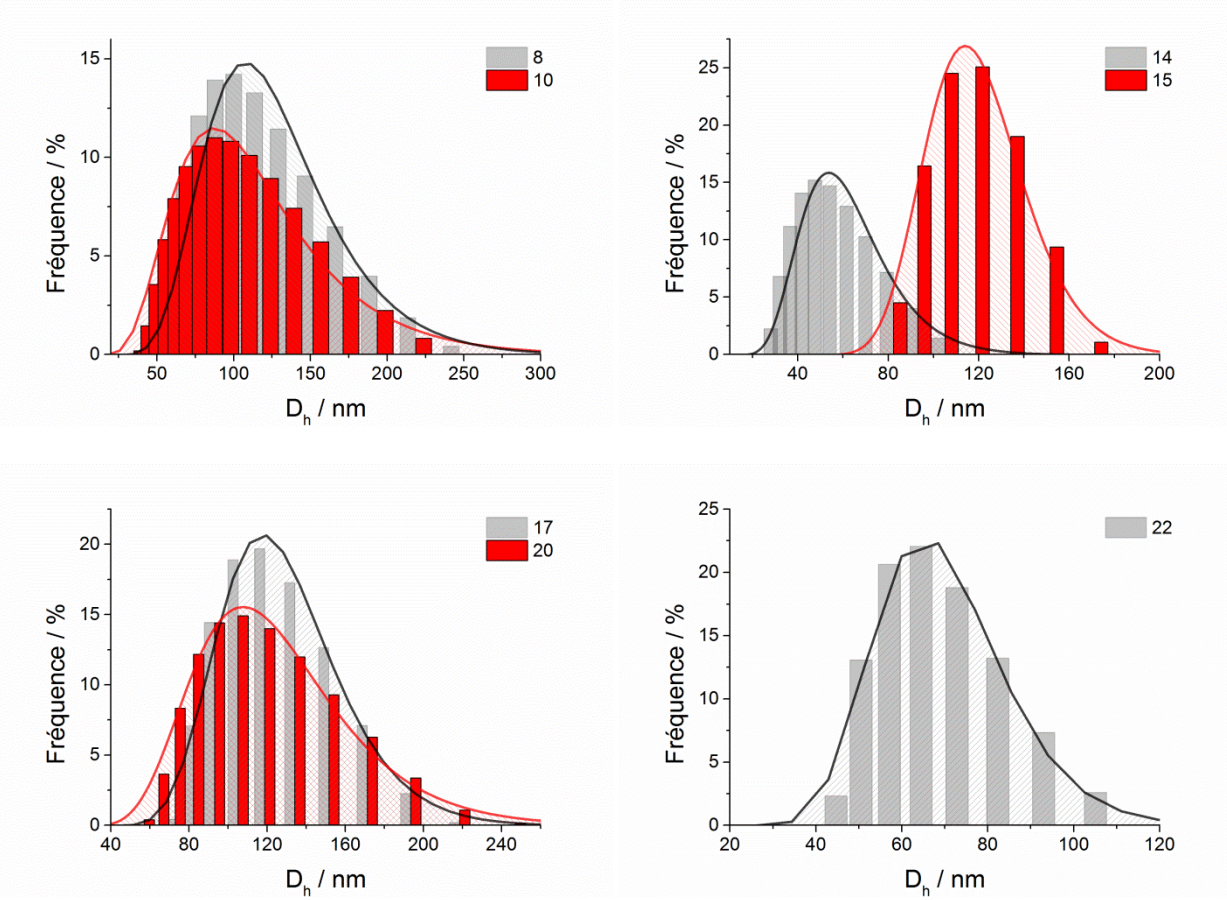


Figure 9b. Distribution de taille hydratée des FONs dans l'eau obtenue par diffusion de la lumière. La distribution est exprimée par l'utilisation d'une courbe de fit en log normal (ligne).

Les mesures de diffusion de la lumière montrent des populations plus larges pour ce qui est de la dispersion et de la taille par rapport aux mesures par TEM. Cette différence entre les diamètres TEM et DLS provient du fait que les nanoparticules dans l'eau se déplacent avec une couche d'eau plus ou moins large, donc les particules diffusant la lumière correspondent aux FONs entourées de cette couche.

La présence de cette couche à la surface des FONs est confirmée par les valeurs de potentiel zêta (ζ) des FONS mesurées dans l'eau (tableau 5). Les valeurs très négatives de ζ des FONs militent en faveur d'une excellente stabilité colloïdale comme le prouve les mesures de stabilité dans le temps des FONs (figure 11).

Tableau 5. Caractéristiques physiques des FONs dans l'eau.

FONs	D_h [a)] nm	D_{TEM} [b)] nm	N_{moyen}	ζ [c)] mV
5	207 [d)]	40	52 400	-60
6	113	36	26 800	-70
16	95	53	86 500	-77
23	105	29	10 900	-60
7	-	-	100 000 [e)]	-55
8	102	22	8 100	-70
10	82	31	15 800	-64
11	-	22	5 500	-60
12	-	29	12 200	-74
13	-	18	3 000	-72
14	52	14	1 100	-88
15	118	-	-	-69
17	112	21	4 900	-60
19	-	-	-	-60
20	103	43	29 000	-70
21	-	-	-	-92
22	68	43	29 700	-50

a) Diamètre hydrodynamique des FONs. *b)* Diamètre « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique. *c)* Potentiel zeta. *d)* Une première population est observée à 27 nm. *e)* Estimation faite à partir de l'aire des nanorods **7** estimées à 3500 nm², avec une épaisseur de 18 nm et la densité du cristal (d = 1.386).

L'obtention de la valeur de N permet de calculer (avec une précision relative à l'homogénéité en taille de la population) la concentration en nanoparticules dans les solutions aqueuses de FONs. Cette concentration permet d'estimer des paramètres très importants pour l'imagerie biologique que sont les brillances à un et deux photons des FONs.

3.2 Absorption à deux photons des FONs

L'absorption à deux photons des solutions aqueuses de FONs **10**, **12**-**14**, **20** et **22** a été mesurée et les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 6.

Tableau 6. Propriétés des FONs dans l'eau.

FONs	N	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *a)* $M^{-1}.cm^{-1}$	$\varepsilon^{max}\Phi$ *b)* $M^{-1}.cm^{-1}$	λ_{TPA}^{max} nm	σ_2^{max} *c)* GM	$\sigma_2^{max}\Phi$ *d)* GM	Φ_F *e)*
5	52 400	344	$1.8\ 10^9$	$348\ 10^6$	-	-	-	0.19
6	26 800	363	$1.1\ 10^9$	$11\ 10^6$	-	-	-	0.01
16	86 500	355	$4.6\ 10^9$	$320\ 10^6$	-	-	-	0.07
23	10 900	373	$0.6\ 10^9$	$23\ 10^6$	-	-	-	0.04
7	$1\ 10^5$	348	$3.8\ 10^9$	$228\ 10^6$	-	-	-	0.06
8	8 100	397	$0.2\ 10^9$	$5\ 10^6$	-	-	-	0.02
10	15 800	387	$0.6\ 10^9$	$18\ 10^6$	750	$20\ 10^5$	$1\ 10^5$	0.03
11	5 500	398	$0.1\ 10^9$	$2\ 10^6$	-	-	-	0.02
12	12 200	435	$0.5\ 10^9$	$33\ 10^6$	770	$160\ 10^5$	$11\ 10^5$	0.07
13	3 000	418	$0.1\ 10^9$	$1\ 10^6$	820	$36\ 10^5$	$0.5\ 10^5$	0.01
14	1 100	503	$0.1\ 10^9$	$1\ 10^6$	820	$9\ 10^5$	$0.09\ 10^5$	0.01
15	-	514	-	-	-	-	-	0.01
17	4 900	367	$0.2\ 10^9$	$34\ 10^6$	-	-	-	0.18
19	-	387	-	-	-	-	-	0.01
20	29 000	400	$1.6\ 10^9$	$190\ 10^6$	740	$230\ 10^5$	$23\ 10^5$	0.12
21	-	402	-	-	-	-	-	0.001
22	29 700	426	$2.1\ 10^9$	$42\ 10^6$	810	$170\ 10^5$	$3.4\ 10^5$	0.02

a) Coefficient d'extinction molaire. *b)* Brillance des FONs. *c)* Section efficace d'absorption à deux photons (1 GM = 10^{-50} $cm^4.s.photon^{-1}$). *d)* Brillance à deux photons des FONs. *e)* Rendement quantique de fluorescence.

Le confinement de milliers de chromophores au sein des nanoparticules permet aux FONs d'atteindre des brillances record avec des ordres de grandeur de 10^6 à 10^8 $mol^{-1}.cm^{-1}$. Ces brillances élevées se retrouvent aussi à deux photons, puisque les FONs **10**, **12-14**, **20** et **22** présentent des brillances à deux photons de l'ordre du million de GM (tableau 6).

Il est frappant de remarquer que contrairement à l'absorption classique, l'ADP des FONs est très similaire à celle des chromophores en solution. De plus, malgré l'extrême dilution des nanoparticules (~nM), il est possible de distinguer plusieurs bandes d'ADP pour la majorité des FONs. Cette « résolution » des spectres d'ADP est un élément très encourageant pour l'utilisation de ces nanoparticules en imagerie, puisqu'elle atteste de la très forte brillance des FONs à deux photons.

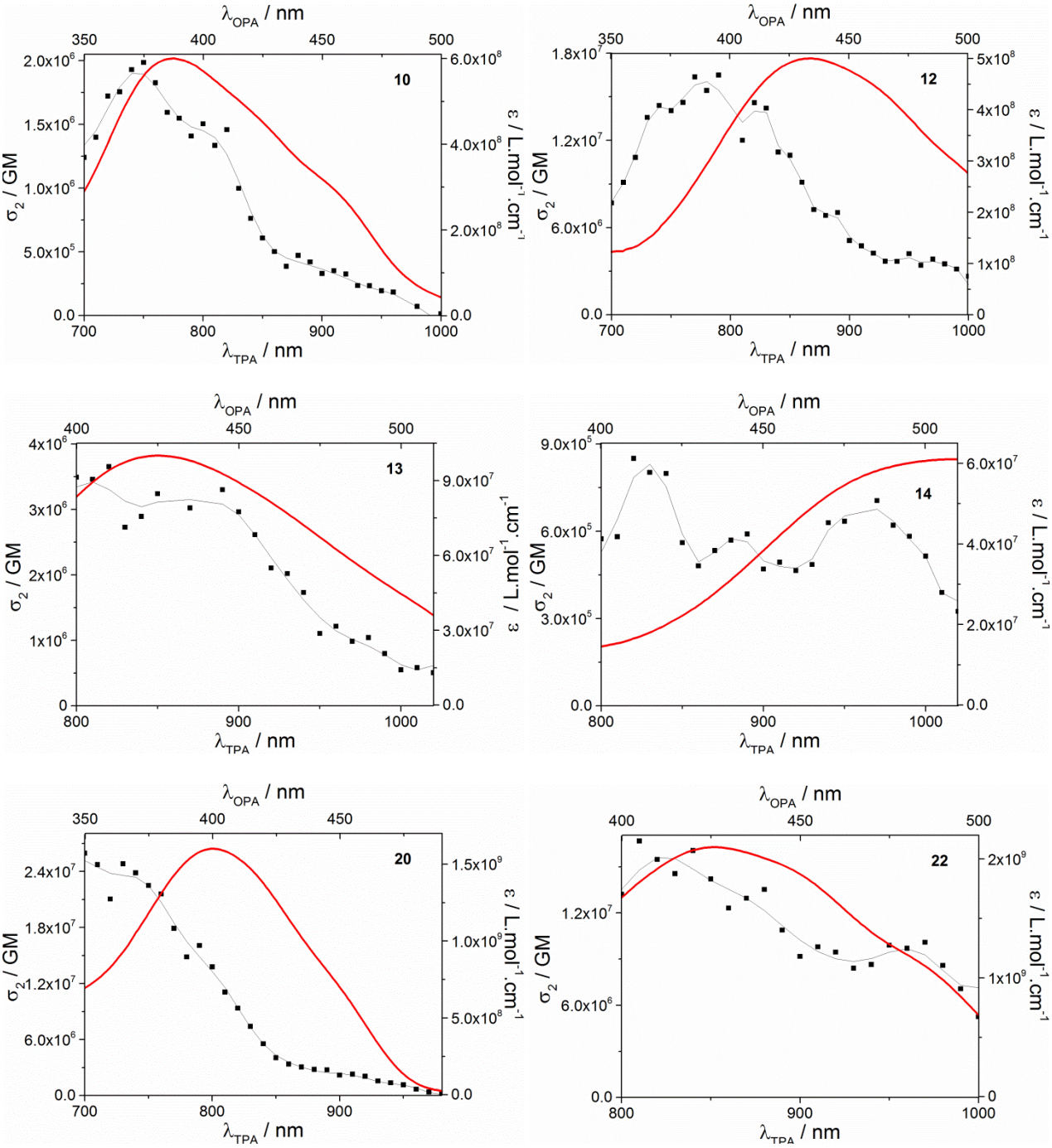


Figure 10. Spectres d'absorption à un (rouge) et deux photons (noir) des FONs **10**, **12**-**14**, **20**, **22** dans l'eau.

Les brillances à un et deux photons des FONs à base de quadrupôles sont très élevées et font potentiellement de ces nanoparticules des outils d'intérêt pour l'imagerie biologique. Cependant, la stabilité chimique et colloïdale des nanoparticules est un aspect important à aborder lorsque la transition vers le vivant est envisagée.

3.3 Stabilité colloïdale et chimique des FONs

La stabilité chimique et colloïdale des FONs est évaluée par absorption UV-visible et le suivi de l'émission de fluorescence donne de bonnes indications sur la stabilité de l'arrangement au sien de la nanoparticule. Ces mesures ont été effectuées sur plusieurs FONs, en utilisant la même solution sans dilution préalable.

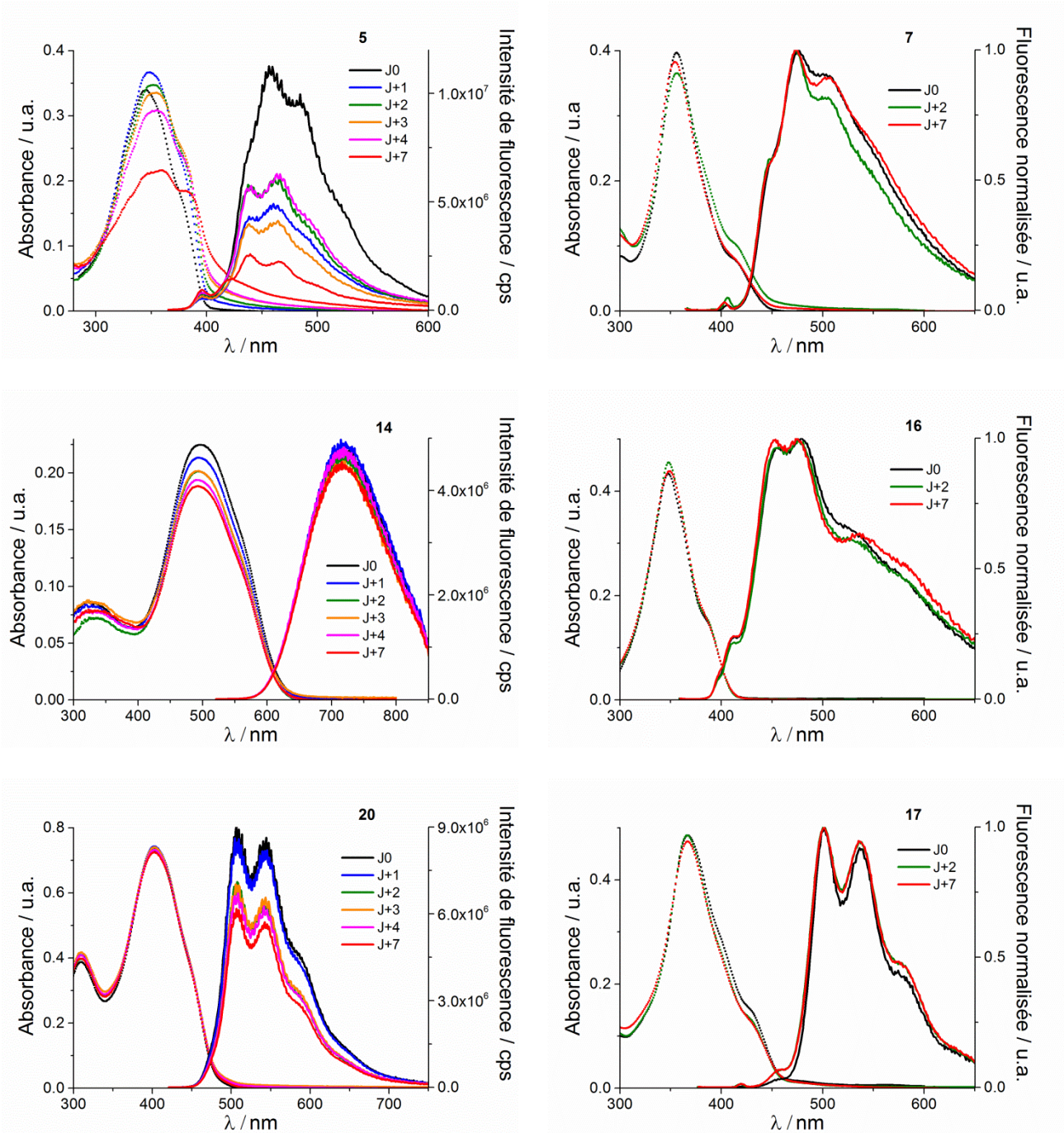


Figure 11. Évolution de l'absorption et de l'émission des solutions aqueuses des FONs **5**, **7**, **14**, **16**, **17** et **20** en fonction du temps. L'émission de fluorescence des FONs à gauche (**5**, **14**, **20**) a été enregistrée dans les mêmes conditions d'ouverture de fentes. À l'inverse, l'émission des FONs de droite (**7**, **16**, **17**) a été enregistrée avec des ouvertures de fentes différentes, interdisant la superposition des spectres en intensité de fluorescence.

Les expériences de suivi de l'évolution des FONs dans le temps (figure 11) indiquent que les FONs présentent une évolution plus ou moins rapide selon le type de chromophore utilisé. Néanmoins à l'échelle de quelques jours, toutes les nanoparticules étudiées présentent une très bonne stabilité colloïdale et chimique. Les meilleurs profils de stabilité sont obtenus avec les FONs préparées à partir de quadrupôles donneurs (**17** et **20**), alors que les quadrupôles accepteurs ont une stabilité plus modérée.

Il est intéressant de noter que les FONs **5** évoluent très rapidement, avec l'apparition d'une forte diffusion dans le visible au bout d'une semaine signe d'une augmentation importante de la taille ou bien d'une agglomération des FONs. Ceci indique que malgré leur très forte brillance, les FONs émettrices bleues (**5**) ne sont pas de bons candidats pour un usage *in vivo* (risque d'occlusion/embolie).

Comme observés pour la version dipôle (D4 chapitre IV), les FONs **14** ne présentent aucun signe évident d'hydrolyse, démontrant ainsi que l'interface eau/nanoparticule est peu favorable à la migration des chromophores de surfaces. Il faut noter que les FONs **7**, **16** et **17** sont toujours observées en solution dans l'eau après 259 jours.

L'excellente brillance et stabilité des FONs **7**, **14**, **16**, **17** et **20** en font de bons candidats pour l'exploration du vivant via la microscopie de fluorescence. Cependant, malgré la forte brillance de ces nanoparticules, pour des raisons de confort d'imagerie, mais aussi de détermination de seuil de toxicité, il est important de pouvoir moduler la concentration des FONs.

Afin de s'assurer que l'augmentation de la concentration des nanoparticules (concentration obtenue par un ajout d'un volume de solution mère plus important) n'impacte pas la taille des FONs, des expériences de dépendance de l'absorption à la concentration en chromophore dans l'eau (et par extension des nanoparticules) ont été effectuées (figure 12).

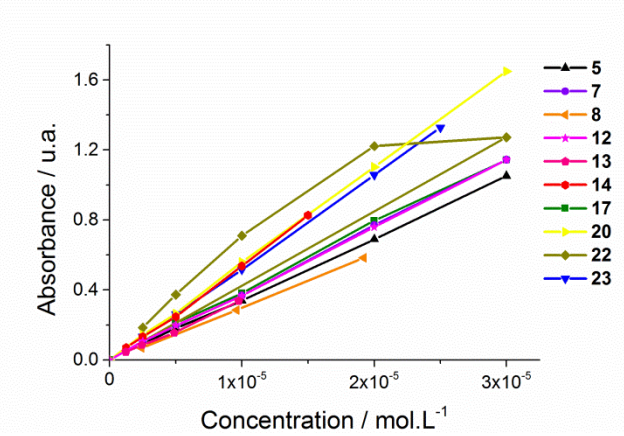


Figure 12. Dépendance de l'absorption des FONs en fonction de la concentration en chromophore dans l'eau.

On remarque que toutes les FONs, excepté **22** suivent une dépendance à la loi de Beer-Lambert. Cette dépendance, ainsi que l'absence d'élargissement inhomogène des bandes d'absorption des nanoparticules traduit une absence d'influence de la concentration en chromophore sur la taille des nanoparticules.

La bonne stabilité des FONs à base de quadrupôles provient d'un agencement particulier des chromophores au sein de la nanoparticule. L'étude de cet agencement peut aussi expliquer le comportement singulier des FONs en absorption et en émission.

4. Application de la théorie de l'exciton moléculaire aux FONs

La théorie de l'exciton moléculaire,[1, 2] démontre qu'à l'état de dimère ou de trimère, l'orientation des chromophores impacte les propriétés photophysiques de ces dimères ou trimères. Sommairement, l'angle formé entre les dipôles de transition des deux chromophores du dimère dissocie l'état excité en deux (illustration 1). Ces deux états excités correspondent à la somme des dipôles de transition dans des configurations de phasage ou déphasage.

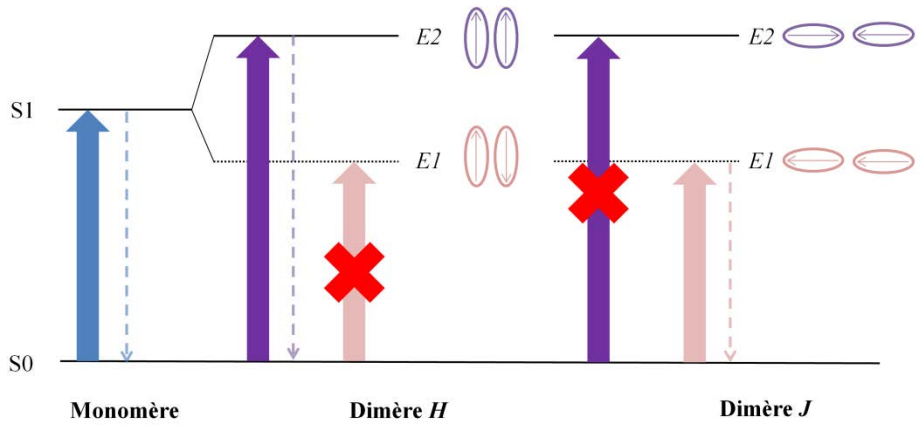


Illustration 1. Influence de l'orientation des dipôles de transition sur les orbitales frontières.[2]

Les deux cas limites de l'illustration 1, où l'angle formé entre les dipôles de transition est de 0° ou 90° ne suffisent pas à expliquer le déplacement hypsochrome de l'absorption ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption et le déplacement bathochrome de l'émission des FONs. Dans sa vulgarisation de la théorie de l'exciton moléculaire, Kasha expose un cas particulier d'orientation de dipôles de transitions (dans le dimère) où les deux états E1 et E2 coexistent. Il s'agit de l'orientation oblique (illustration 2).

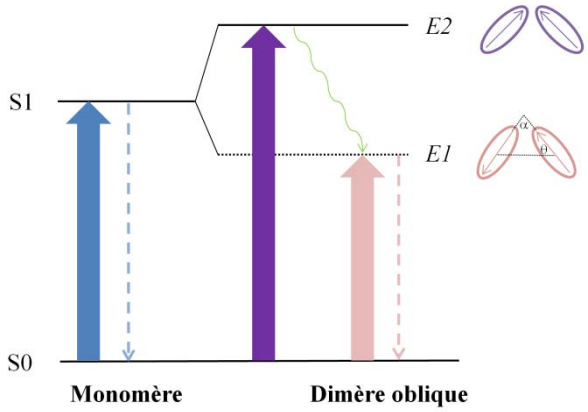


Illustration 2. Influence de la présence de dipôles de transitions dont l'agencement est oblique sur les orbitales frontières.

La coexistence des deux états E1 et E2 s'appelle l'éclatement de l'exciton et sa caractéristique principale est que plus la valeur de ε est importante pour la transition dans le monomère, plus cet éclatement est important (en terme d'énergie) dans le dimère. Pour cette raison, le décalage entre les maximums d'absorption en solution dans le THF et dans les FONs est plus important pour les chromophores **6** et **23** puisque la valeur d'ε^{max} de ces chromophores est 50% supérieure à celle de leurs homologues monothienyls **5** et **16** (tableau 1). Une autre caractéristique importante de l'éclatement de l'exciton est la dépendance de

l'éclatement à la distance entre les chromophores. Cette relation entre ε, la distance intermoléculaire (r_{ab}) et l'éclatement de l'exciton (Δε) est décrite dans l'équation 1.

$$\Delta\varepsilon = \frac{2\left|\frac{4{,}32 \times 10^{-9}}{n} \times \int \varepsilon(\bar{\nu})\, d(\bar{\nu})\right|^2}{r_{ab}^3} \times (\cos\alpha + 3\cos^2\theta)$$

Équation 1. Calcul de l'éclatement de l'exciton.[2]

Dans cette équation, n est l'indice de réfraction du milieu et α et θ sont les angles définissant le caractère oblique de l'orientation des dipôles de transition (illustration 2).

Cet éclatement de l'exciton explique la présence du déplacement de λ_{abs}^{max} dans les nanoparticules, ainsi que la présence d'une seconde bande d'absorption plus décalée vers le rouge. En tenant compte de la loi de Kasha, qui n'autorise l'émission de fluorescence uniquement depuis l'état excité de plus basse énergie, il est facile de remarquer d'après l'illustration 2 que le décalage vers le rouge de la bande d'émission est dû à la transition E1-S0. L'hypothèse de la présence d'un éclatement de l'exciton dans les FONs semble donc être une explication plausible du comportement singulier de celles-ci (figure 1).

En faisant l'hypothèse que les quadrupôles présentés dans ce chapitre possèdent leur dipôle de transition le long de la molécule (hypothèse raisonnable selon la perspective d'un transfert de charge le long des branches), les interactions entre les dipôles de transitions peuvent être extrapolées aux interactions entre les chromophores le long des branches. Ainsi l'état cristallin peut dans une certaine mesure donner des indications sur les interactions intermoléculaires à courte portée.

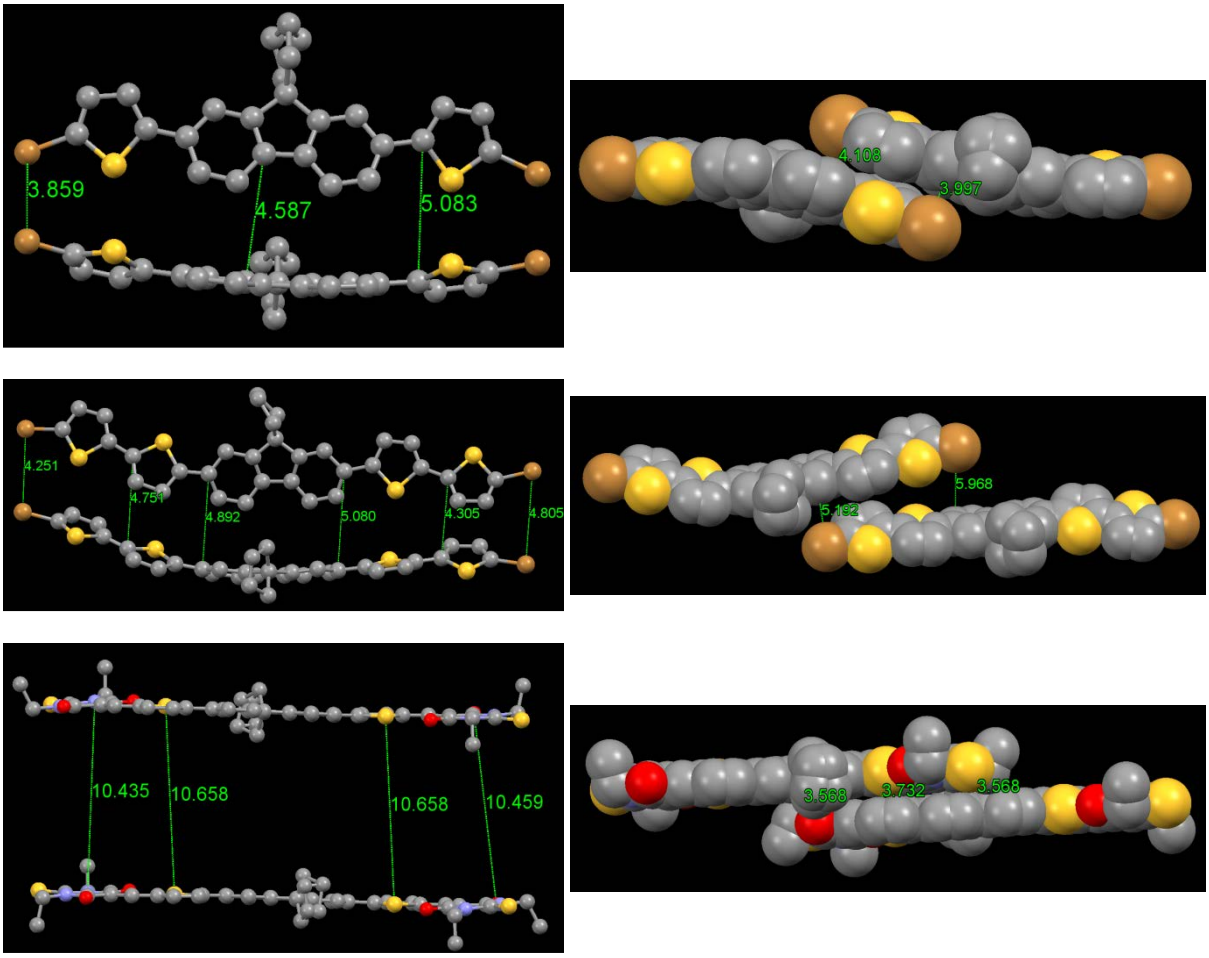


Figure 2. Interactions moléculaires à courte portée de **16** (haut), **23** (milieu) et **14** (bas) dans l'état cristallin (les atomes d'hydrogène sont supprimés pour une meilleure lecture).

L'étude cristalline des chromophores est décrite dans le chapitre V, cependant, en comparant les structures cristallines des chromophores **16** et **23**, on remarque deux interactions de courtes portées (figure 2). À l'inverse, l'agencement intermoléculaire de **14** dans l'état cristallin, montre une interaction de courte portée et une interaction de longue portée. Ces interactions parallèles sont très complexes puisqu'elles associent simultanément deux types de dimères ; l'un des dimères correspond à un chevauchement antiparallèle d'une partie des quadrupôles (figure 2 à droite) et le second dimère correspond à une superposition en phase des quadrupôles (figure 2 à gauche).

Puisque les chromophores sont en configuration parallèle, la valeur de l'angle α dans l'équation 1 vaut 0. Par conséquent, l'éclatement de l'exciton est issu d'un cas particulier des transitions obliques de dipôles : il s'agit des transitions de dipôles coplanaires inclinés (figure 3).

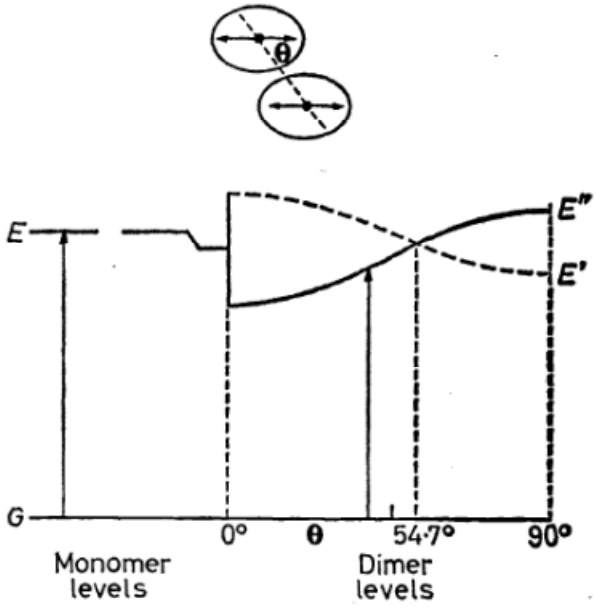


Figure 3. Représentation de l'éclatement de l'exciton dans le cas de transitions de dipôles coplanaires inclinées (extrait de « The Exciton model in molecular spectroscopy »). E' et E'' représentent les états excitoniques.[2]

Bien que les nanoparticules ne soient pas purement cristallines, le mode d'agencement des chromophores quadripolaires dans les FONs est raisonnablement attendu pour être du même type. Ainsi, l'étude des cristaux des composés **14**, **16** et **23** permet de confirmer la présence d'un éclatement de l'exciton dans les FONs **14**, **16** et **23** du fait d'un agencement particulier et complexe des chromophores.

Ce chapitre rapporte la préparation de nanoparticules fluorescentes à base de chromophores quadripolaires. Ces nanoparticules ont pour particularité un déplacement hypsochrome des bandes d'absorption et un déplacement bathochrome de l'émission en comparaison avec les chromophores dissous en solution organique. Cet éclatement du déplacement de Stokes s'explique par un agencement particulier des chromophores au sein des nanoparticules.

Cet agencement, dû à l'influence simultanée de l'absence de moment dipolaire des chromophores ainsi que d'un encombrement local important induit l'apparition de règles de sélection différentes entre l'absorption d'un photon et la relaxation des chromophores par émission de photon. La présence de cet éclatement de l'exciton moléculaire est confirmée par l'agencement des chromophores dans l'état cristallin qui concorde avec la théorie de l'exciton moléculaire.

Il est intéressant de remarquer que les FONs de ce chapitre conservent une forte activité ONL, avec des sections efficaces d'absorption à deux photons se situant aux alentours du million de GM.

La gamme d'émission de ces nanoparticules couvre les UVA, le visible complet ainsi que le proche infrarouge, selon le type de FONs utilisées. Ces émissions de fluorescence, couplées avec les fortes brillances à un et deux photons, les déplacements de Stokes importants, leurs petites tailles ainsi que leur bonne stabilité, font de ces nouvelles FONs des outils prometteurs pour l'imagerie biologique par excitation mono- et biphotonique.

Références bibliographiques

[1] Davydov, A. S., THE THEORY OF MOLECULAR EXCITONS. *Soviet Physics Uspekhi* **1964,** *7*, 145.

[2] Kasha, M.; Rawls, H. R.; El-Bayoumi, M. A., Exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **1965,** *11*, 371-92.

Chapitre VII – Modifier la surface des FONs en vue d'améliorer leurs propriétés photophysiques

Chapitre VII – Modifier la surface des FONs en vue d'améliorer leurs propriétés photophysiques

La préparation de FONs à partir de chromophores quadripolaires, a permis de montrer que les interactions intermoléculaires au sein de ces nanoparticules sont fortes et affectent notablement les propriétés photophysiques de celles-ci. Les potentiels de surface très négatifs de ces nanoparticules semblent indiquer que la surface de celles-ci est le siège de couplages très forts entre les molécules. Ce couplage est d'ailleurs affirmé par la spectroscopie d'absorption UV-visible, qui démontre la présence d'agrégats *H*.

Se basant sur les expériences effectuées sur les FONs à base du dipôle **D4** ayant montré que l'utilisation de solution tampon (PBS) pouvait augmenter la luminescence de ces FONs, il est intéressant d'explorer plus loin les interactions à la surface des FONs, par exemple l'emballage des FONs par des polymères.

Afin d'étudier des modèles simples, mais robustes, des polymères cationiques dont l'affinité pour l'eau est variable ont été utilisés à la place de solutions salines dans le but d'enrober les FONs et d'en étudier les conséquences sur les propriétés photophysiques.

1. Introduction

La surface des nanoparticules organiques ou bien inorganiques est un objectif de choix pour modifier leur caractéristique, puisque c'est la seule partie de la nanoparticule qui interagit physiquement avec son environnement. Pour cette raison, sa modification permet de moduler la manière qu'a la nanoparticule d'interagir avec son environnement.

Par exemple, les QDs sont des nanoparticules purement inorganiques qui ne sont pas solubles dans l'eau. Or une de leur principale utilisation concerne l'imagerie de fluorescence dans des milieux biologiques nécessitant l'emploi de sondes ou marqueurs solubles et stables dans l'eau. Afin de rendre solubles dans l'eau ces nanocristaux, la nature de leur surface est modifiée par l'ajout de polymères ou de tensio-actifs.[1-3]

L'utilisation de surfactants ou bien le greffage de polymère à la surface des nanoparticules est une méthode couramment utilisée dans le domaine de la nanotechnologie que ce soit pour enrober des objets nanométriques, ou bien encapsuler des chromophores (par exemple les nanogouttes).[4, 5]

Cette approche visant à modifier la surface des nanoparticules ne se limite pas à augmenter la solubilité de la nanoparticule dans l'eau. L'intérêt des nanoparticules luminescentes pour l'imagerie est essentiellement dû à la robustesse et la brillance de ces nanoparticules. Cependant, les nanoparticules fluorescentes à l'état brut ne possèdent pas d'interactions spécifiques avec le milieu biologique. Cette particularité limite leur application dans le milieu biologique, il est donc important de leur associer, via une modification de leur surface, la capacité de cibler certains sites d'intérêt biologique comme les lysosomes, l'ADN,[6] les mitochondries, les différents types de membranes ainsi que les cellules cancéreuses.

Il est intéressant de remarquer que la recherche d'un marquage efficace des cellules cancéreuses a permis l'émergence de nombreuses stratégies de modification de la surface des nanoparticules. Ainsi, le marquage tumoral le plus répandu est un effet passif appelé EPR qui en utilisant l'hyper-vascularisation des tumeurs consiste en une bioaccumulation massive du marqueur dans ces cellules. La modification de la surface des nanoparticules dans ce cas-là est simple puisqu'il consiste à augmenter le temps de résidence des NPs dans le circuit sanguin par l'ajout de chaînes PEG à l'extérieur des nanoparticules.[7]

Récemment, une technique de ciblage des cellules cancéreuses utilisant des nanoparticules magnétiques a émergé. Cette technique consiste à appliquer un champ magnétique sur la tumeur pour attirer les nanoparticules présentes dans le circuit sanguin. Cette version améliorée de l'EPR nécessite une connaissance préalable de la localisation de la tumeur, est n'est donc envisageable que dans un cadre thérapeutique comme la PDT (photothérapie dynamique). De même que pour l'EPR, les nanoparticules sont recouvertes de chaînes PEG afin d'augmenter leur temps de résidence dans le circuit sanguin.[8] Les techniques de ciblage plus élaborées peuvent utiliser du glucose ou bien l'acidité des cellules cancéreuses pour le marquage.[9]

Une des stratégies les plus prometteuses actuellement pour le ciblage de cellules cancéreuses à partir de NPs est l'utilisation d'acide folique. Cette molécule est ajoutée à la surface de la nanoparticule *via* un polymère espaceur possédant de l'acide folique à son extrémité.[10-12]

Il est aussi reporté que modifier la surface des nanoparticules peut augmenter la luminescence,[13] mais aussi la photostabilité[14, 15] de celles-ci.

Quel que soit le type de nanoparticules (organique, QDs, inorganique…) les modifications de leur surface suivent la même stratégie :

- Formation de liaisons covalentes *via* la click-chemistry[16-18] ou bien par amidation.

- Formation de liaisons non covalentes par la préparation de "nanomicelles" *via* l'utilisation de molécules amphiphiles[19, 20] ou bien par interactions électrostatiques.[21, 22]

Bien que la modification de la surface des nanoparticules soit un procédé largement répandu, peu de données sont disponibles sur les interactions entre la surface des FONs et l'agent d'enrobage.

2. Préparation des FONs enrobées

La préparation de nanoparticules purement organiques, emballées dans une matrice polymérique *via* la méthode de reprécipitation, nécessite un contrôle précis des différentes étapes. L'utilisation de solutions mères concentrées contenant à la fois le chromophore et le polymère est une stratégie utilisée pour la préparation de nanoparticules enrobées.[20, 23] Cependant cette approche ne permet pas d'obtenir avec certitude la formation de NPs emballées dans une matrice de polymère. *Via* cette procédure, une organisation où le chromophore est présent sous forme d'unités moléculaires « diluées » dans la nanoparticule de polymère est plus attendue.[23]

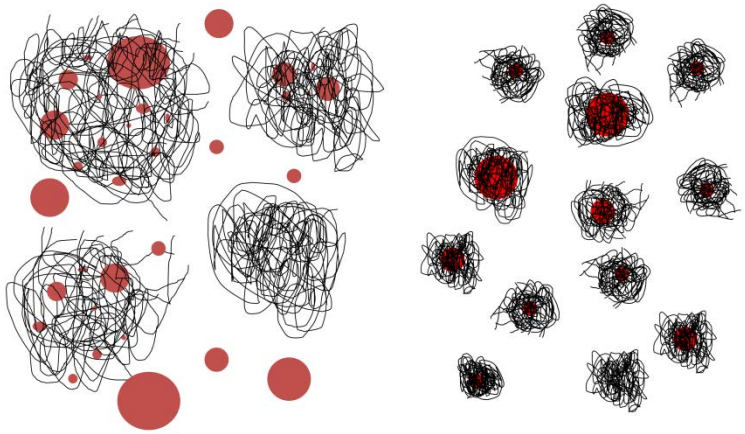
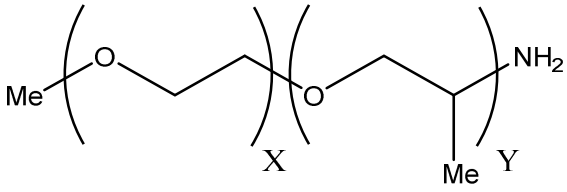


Illustration 1. Schématisation de la formation de nanoparticules à partir d'une solution concentrée comportant à la fois le chromophore et le polymère (gauche) et par addition séquentielle du chromophore puis du polymère (droite).

Dans le but de s'affranchir d'incertitudes supplémentaires, une méthode d'emballage des FONs devant conduire à un emballage maximal a été mise en place. Cette préparation se fait de façon séquentielle (illustration 1); d'abord le cœur des nanoparticules est préparé, par ajout d'une solution mère concentrée de chromophore dans de l'eau. Puis une fois la formation des nanoparticules de cœur effectuée, une solution concentrée de polymère est ajoutée lentement à la solution de nanoparticules de cœur.

Le choix d'un ajout goutte-à-goutte de la solution de polymère s'explique simplement parce qu'un ajout rapide du polymère risque de générer de nombreuses nanoparticules ne contenant que le polymère. Bien qu'elles soient non émissives, la formation de ces nanoparticules de polymère est une gêne importante dans ce type d'étude. Ces nanoparticules de ne participent pas à l'enrobage des FONs, conduisant à une surestimation de la quantité du polymère interagissant avec les nanoparticules.

Cette méthode de préparation de FONs enrobées a été appliquée au chromophore **14** et aux polymères Jeffamine® de la série M. Ces Jeffamines® ont l'avantage de posséder une partie hydrophile (composée de chaînes polyéthylène glycol) et une partie hydrophobe (composée de chaînes polypropylènes) comportant une amine primaire (schéma 1).



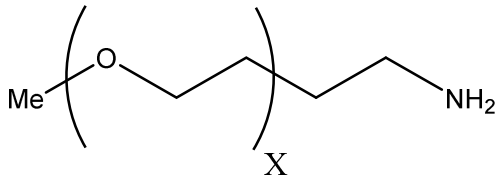
Jeffamine M-2005 : X = 6, Y = 29

Jeffamine M-2070 : X = 31, Y = 10

Schéma 1. Structure chimique des Jeffamines® de la série M.

L'intérêt de l'utilisation de polymères de type Jeffamine® réside dans la variation du caractère hydrophile ou hydrophobe des polymères en fonction du ratio X/Y. Ainsi, le polymère M-2005, pour une longueur de chaîne quasi identique, est plus hydrophobe que le polymère M-2070. Les effets de cette modulation du caractère hydrophobe/hydrophile du polymère sur les propriétés des FONs emballées sont intéressants à étudier, puisqu'une affinité différente entre polymères et FONs sont espérées selon le caractère hydrophobe du polymère.

La longueur de la chaîne polymérique est aussi un aspect important à déterminer, puisque si l'emballage est efficace, la longueur des chaînes devrait moduler la taille des nanoparticules. Pour cette raison, une seconde famille de polymère monoamine est utilisée dans les expériences d'emballages : les PEG-NH_2 (schéma 2).



PEG-NH_2 -736 : X = 15

PEG-NH_2 -2015 : X =44

Schéma 2. Structure chimique des PEG-NH_2.

Le choix de polymère monoaminé est dû au fort potentiel de surface négatif des FONs **14** (-89 mV). Notre stratégie d'emballage repose sur l'utilisation d'interactions électrostatiques entre le polymère et la nanoparticule pour favoriser leur interaction. Ainsi, en utilisant un polymère « chargé » positivement (*via* le caractère ammonium de l'amine dans l'eau) en présence de nanoparticules « chargées » négativement, un emballage non covalent à

courte portée est espéré. Pour valider cette approche, les FONs emballées par les polymères M-2005, M-2070, PEG-736 et PEG 2015 ont été préparées.

La suspension de FONs **14** est préparée par ajout d'une solution de 0.5 mM de **14** dans le THF (0.2 mL) dans de l'eau osmose (19.8 mL) sous agitation de type sonotrode. Afin d'éviter la présence d'objets nanométriques de grande taille (> 200 nm), qui pourrait déstabiliser les nanoparticules, la suspension est filtrée sur un filtre seringue de taille de pores fixés à 0.2 µM. Il est important de noter que la filtration ne modifie que très légèrement l'absorbance de la solution, attestant que la taille des nanoparticules est inférieure à 200 nm.
Afin de pouvoir calculer le rendement quantique de fluorescence dans de bonnes conditions, les solutions aqueuses de FONs sont diluées avec de l'eau osmose jusqu'à obtenir une absorbance proche de 0.1.

Afin d'étudier l'influence du taux d'enrobage des FONs, l'ajout du polymère dans la suspension de FONs se fait par gradient de concentration. Ainsi, quatre concentrations totales en polymère sont testées : 50 nM, 500 nM, 5 µM et 50 µM. Cet ajout se fait par addition goutte-à-goutte d'une solution de polymère dans le THF (0.01 mL) dans une solution aqueuse de FONs (9.99 mL) sous agitation modérée. Afin d'éviter une fragmentation des FONs et l'obtention d'un mélange inhomogène, l'agitation ne se fait pas par sonication, mais par l'utilisation d'un barreau aimanté.

Après l'ajout du polymère, la solution est agitée pendant 5 minutes supplémentaires afin de laisser le temps au système de s'équilibrer. Puis les mesures d'absorption et d'émission sont réalisées avant l'ajout d'une solution plus concentrée en polymère.

3. Impact de l'enrobage sur les caractéristiques des FONs

Il est important de notifier que l'ajout de polymère dans le cas des séries Jeffamines® et PEG-NH_2 ne conduit pas à des phénomènes d'agrégations après l'addition et pendant les mesures, pour des concentrations allant jusqu'à 6µM. Cette observation est importante, puisqu'elle garantit la fiabilité des mesures.

3.1 Impact sur la fluorescence

Alors que les spectres d'absorption des FONs nues ou en présence de différentes concentrations en polymères restent presque identiques, l'émission de fluorescence présente elle une dépendance à la concentration en polymère (figure 1). En effet, le suivi du rendement quantique de fluorescence en fonction de la concentration totale en polymère indique que plus la concentration en polymère augmente dans la solution aqueuse de FONs, plus l'émission augmente (tableau 1, figure 1 et 2). Cette augmentation de la fluorescence s'explique par les interactions de surface des FONs.

La présence du polymère autour de la nanoparticule diminue mécaniquement la présence d'eau à la surface des nanoparticules. Plus les affinités entre polymère et nanoparticule sont importantes, et plus l'environnement à la surface des FONs revêt un caractère hydrophobe, moins la présence d'eau à la surface des nanoparticules est attendue (illustrations 2a et 2b). Or comme nous l'avons montré pour l'action du PBS à la surface des FONs (figure 11, chapitre IV), la diminution des interactions entre l'eau et les FONs conduit à une augmentation de la luminescence par l'atténuation du k_{nr} (désactivation non radiative).

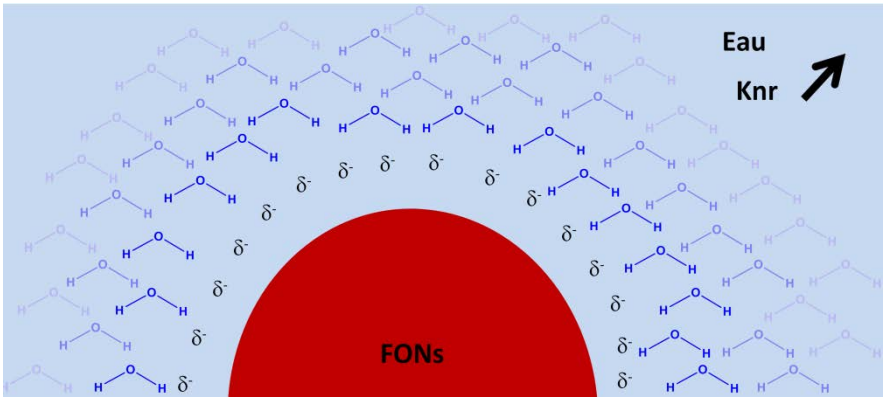


Illustration 2a. Schématisation des interactions à la surface des FONs nues. Pour un souci de clarté, les ions à la surface des FONs ne sont pas représentés.

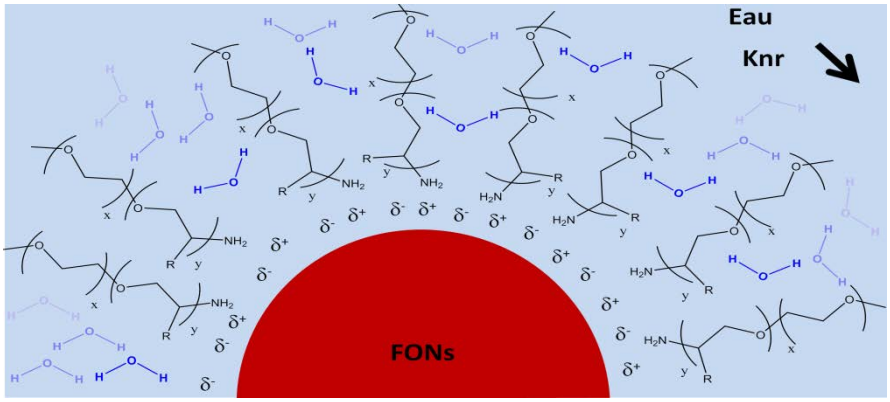


Illustration 2b. Schématisation des interactions à la surface des FONs emballées. Pour un souci de clarté, les ions à la surface des FONs ne sont pas représentés.

Cette augmentation de l'intensité de fluorescence est observable jusqu'à une concentration totale en polymère de 6 µM. En effet, pour une concentration en polymère de 50 µM, l'émission de fluorescence atteint un plateau pour tous les échantillons, excepté le lot contenant la Jeffamine® M-2005 (figure 2). Ce plateau peut indiquer une saturation en polymère à la surface des FONs, correspondant concrètement à l'emballage maximal autorisé par la combinaison polymère/FONs choisie.

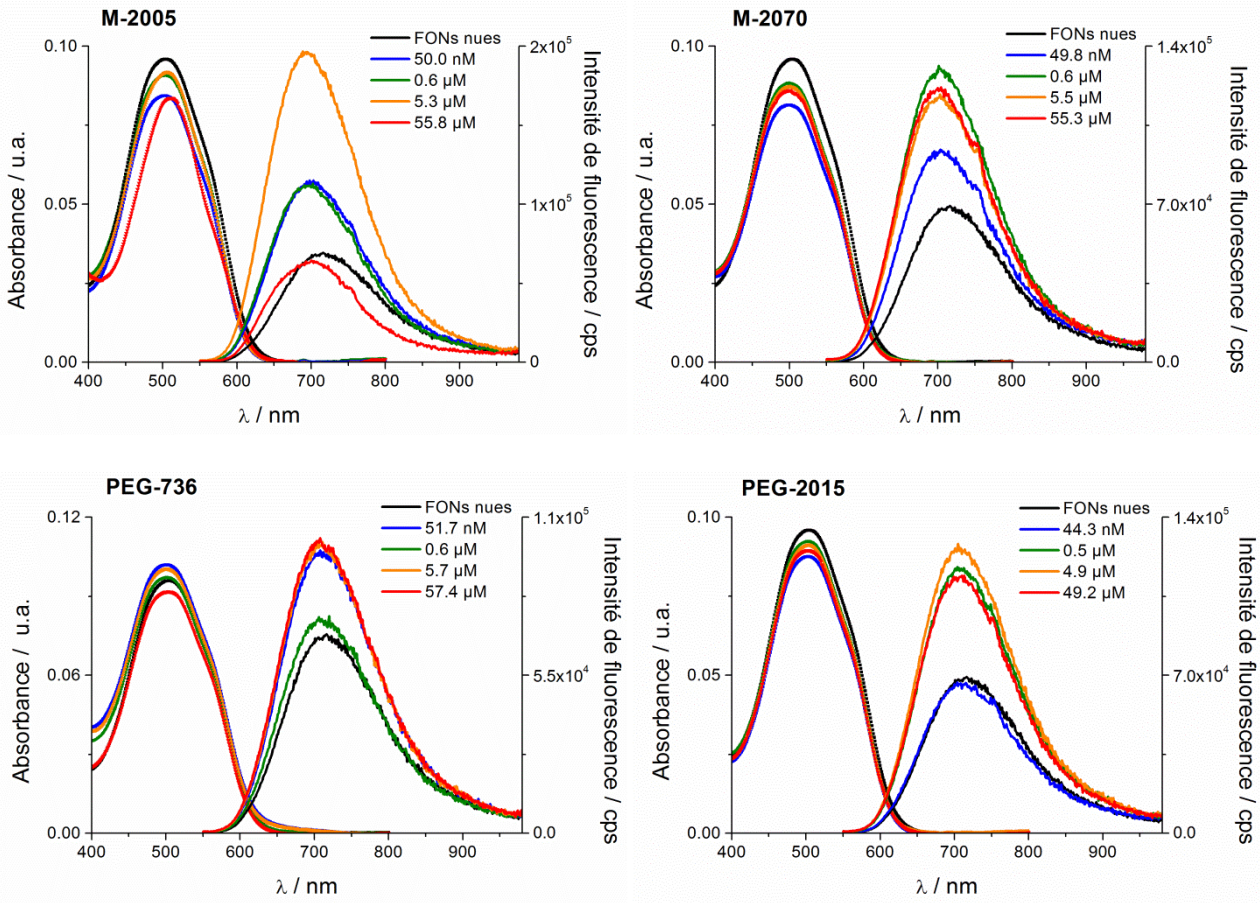


Figure 1. Évolution de l'absorption et de l'émission des FONs encapsulées.

Cette légère baisse de l'absorption et cette augmentation de la fluorescence indiquent que les polymères interagissent avec les nanoparticules de **14**. Puisque les molécules de chromophore à la surface des FONs sont les premiers absorbeurs ; un effet hypochrome, indique donc une légère diminution du transfert de charge (sous réserve que la taille des nanoparticules de fluorophore et leur concentration restent identiques après l'emballage). Cette baisse de l'ICT peut provenir d'une compensation de charge *via* la présence de l'ammonium.

Il est intéressant de noter la chute brutale de l'émission de **14** lorsque la concentration en M-2005 est égale à 56 µM. Cette baisse de l'émission est attribuée à la formation d'agrégats, qui par effet de filtre interne entraînent une baisse de la luminescence.

Une seconde hypothèse tout aussi valable pour expliquer cette baisse de luminescence est qu'à cette concentration le polymère M-2005 a atteint sa concentration micellaire critique. Du fait de sa structure chimique particulière, dans laquelle l'ammonium se trouve dans un environnement hydrophobe, la formation de micelle peut conduire à une perte de l'affinité entre le polymère et les FONs et donc déballer les FONs. Cette dissociation peut conduire à la présence simultanée de micelles et de FONs nues, au lieu de FONs emballées.

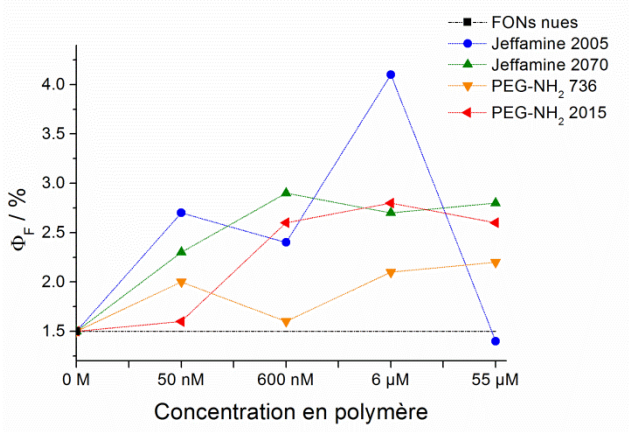


Figure 2. Évolution du rendement quantique de fluorescence en fonction de la concentration en polymère.

L'augmentation du rendement quantique de luminescence des FONs est différente selon le type de polymère utilisé. Le polymère M-2005 est le polymère qui, à une concentration de 6 µM présente l'effet d'exaltation de la fluorescence le plus fort. Ceci indique que le polymère protège la surface des FONs de l'eau efficacement, et donc ce polymère semble avoir une très forte affinité pour les nanoparticules **14**.

Tableau 1. Propriétés photophysiques et caractéristiques des FONs emballées dans l'eau pour une concentration en polymère de 6 µM.

Surface des FONs	r_{TEM} *a)* nm	ζ *b)* mV	λ_{abs}^{max} nm	ε^{max} *c)* $M^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{ém}^{max}$ nm	Stokes' shift cm^{-1}	Φ_F *d)*	$\varepsilon^{max}\Phi_F$ *e)* $M^{-1}.cm^{-1}$
Nue	7	-89	503	$7\ 10^7$	716	5 900	0.01	$1\ 10^6$
M-2005	14	-60	510	$7\ 10^7$	700	5 300	0.04	$3\ 10^6$
M-2070	12	-77	501	$7\ 10^7$	704	5 800	0.03	$2\ 10^6$
PEG-736	9	-81	503	$7\ 10^7$	708	5 800	0.02	$2\ 10^6$
PEG-2015	8	-86	503	$7\ 10^7$	713	5 900	0.03	$2\ 10^6$

a) Rayon « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique. *b)* Potentiel Zeta. *c)* Coefficient d'extinction molaire des FONs. *d)* Rendement quantique de fluorescence mesuré avec comme standard l'indocyanine green dans le DMSO. *e)* Brillance des FONs.

3.2 Impact sur la taille des FONs

Cette forte affinité entre M-2005 et les FONs **14** transparaît aussi dans les mesures de taille (figure 3) et de potentiel de surface. Comme le montre le tableau 1, le diamètre mesuré en microscopie électronique des FONs emballées est plus important que le diamètre des FONs nues. Cette augmentation de la taille « sèches » des FONs ainsi que de la taille « hydratée » (figure 3) est un bon indicateur de l'enrobage.

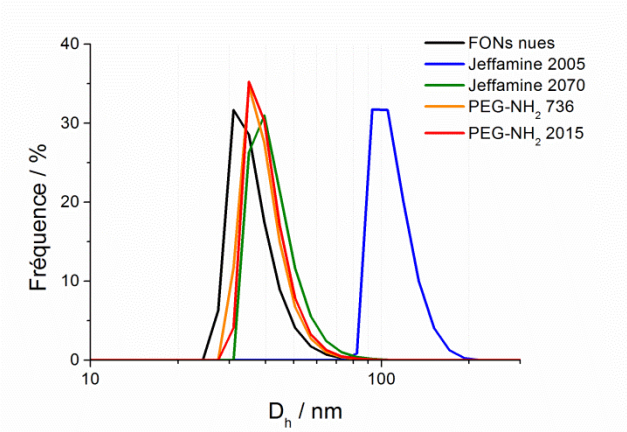


Figure 3. Mesure du diamètre « hydraté » des FONs nues et emballées obtenue par DLS.

De plus, le diamètre des FONs@M-2005 correspond au diamètre le plus grand, ce qui semble correspondre à un taux de recouvrement important de la surface des nanoparticules avec le polymère M-2005. De même que pour la taille, le potentiel de surface des FONs@M-2005 est le moins négatif de toutes les expériences, ce qui indique que la surface est fortement modifiée, ce qui est en accord avec les mesures de taille et de luminescence.

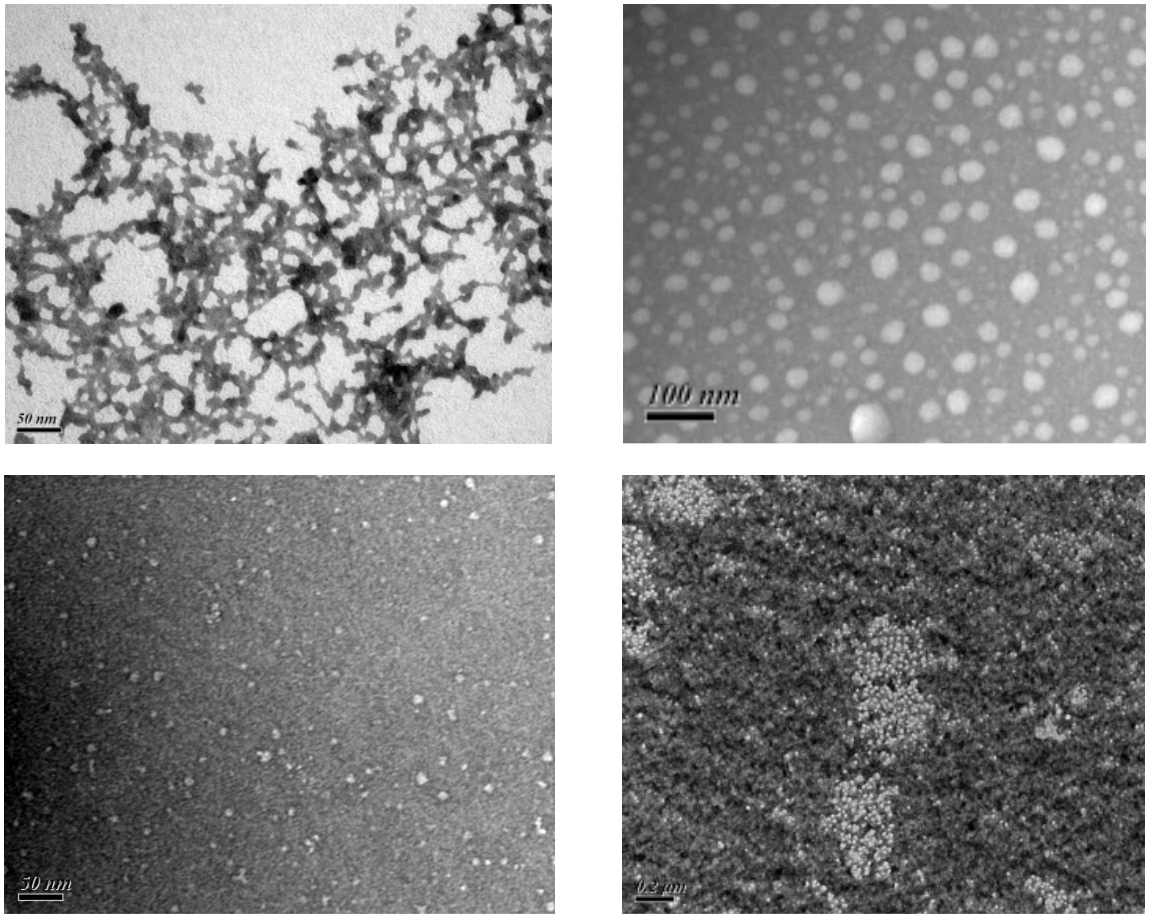


Figure 4. Image TEM des FONs **14** dans l'eau emballées avec les polymères M-2005 (en haut à gauche), M-2070 (en haut à droite), PEG-736 (en bas à gauche) et PEG-2015 (en bas à droite).

Il est intéressant de remarquer la forte concordance entre les mesures d'absorption et d'émission et les mesures de taille et de potentiel de surface. En effet, le maximum d'émission de fluorescence est légèrement décalé de quelques nm, or le composé **14** est une molécule solvatochromie dans l'état excité. Ces décalages signalent une légère modification de la polarité à la surface des nanoparticules, révélant ainsi un environnement moins polaire pour les FONs dont l'affinité avec le polymère est forte (M-2005). À l'inverse, le polymère possédant le moins d'affinité pour les FONs possède un maximum d'émission plus proche des nanoparticules nues.

Pour ces raisons, on peut noter que l'hydrophobicité des polymères joue un rôle prépondérant dans le phénomène d'enrobage :

- Le couple FONs@M-2005 donne la brillance la plus élevée (pour une concentration de 6 µM en polymère) en même temps que les nanoparticules les plus grosses et les « moins stables » colloïdalements.
- Le second couple FONs@M-2070 possède une forte brillance, comparable aux polymères PEG, mais la taille des nanoparticules est plus importante, et le potentiel de surface est le second plus bas.
- Le couple FONs@PEG-736 possède une brillance similaire aux couples FONs@M-2070 et FONs@PEG-2015, cependant, la taille des nanoparticules est légèrement plus grosse que les FONs nues avec un potentiel de surface très négatif, mais plus faible que celui des FONs nues.
- Enfin, le polymère PEG-2015 est celui qui interagit le moins avec les FONs, puisque le diamètre des nanoparticules est très similaire à celui des FONs nues ainsi que le potentiel de surface.

Ces mesures indiquent qu'une augmentation de l'hydrophobicité entraîne une augmentation de l'affinité du polymère pour la surface de la nanoparticule (dans le cas de polymères monoaminés). De plus, il semble que l'utilisation de chaînes polymériques courtes (PEG-736) favorise l'enrobage par comparaison avec des chaînes plus longues (PEG-2015).

Bien que cette relation entre hydrophobicité et enrobage soit attendue, ces résultats montrent que les interactions entre une molécule et la surface des nanoparticules ne sont pas un phénomène systématique, et le choix du polymère est crucial.

L'anticipation d'une meilleure interaction entre nanoparticules et polymères hydrophobes est due à des considérations de miscibilité entre le polymère et l'eau. De même que préparer des nanoparticules dans l'eau à partir d'une molécule soluble dans l'eau est une approche périlleuse ; l'enrobage de nanoparticules en utilisant une (macro-)molécule miscible/soluble dans l'eau est tout aussi risqué.

Ainsi, l'enrobage des FONs se faisant par interaction électrostatique, il est donc assez simple d'imaginer que la miscibilité du polymère dans l'eau rend celui-ci moins disposé à se

lier aux nanoparticules. À l'inverse, si le polymère n'est pas miscible avec l'eau (M-2005), la surface des FONs est l'endroit le plus favorable où le polymère puisse se concentrer.

3.3 Impact sur les propriétés d'absorption à deux photons des FONs

D'après les résultats obtenus, la nature de l'emballage affecte les propriétés d'absorption et d'émission des nanoparticules. La forte sensibilité de l'absorption à deux photons aux variations de champs électriques[24, 25] est un atout pour observer les variations infimes pouvant opérer à la surface des nanoparticules. Profitant de la très forte section efficace d'absorption à deux photons des FONs **14** (Chapitre V), et de l'exaltation de la luminescence par la présence de l'enrobage, des mesures d'absorption à deux photons ont été réalisées sur les FONs emballées.

Comme le montre la figure 5, l'absorption à deux photons mesurée en excitant à 970 nm montre une augmentation significative pour les FONs emballées avec la Jeffamine® M-2005.

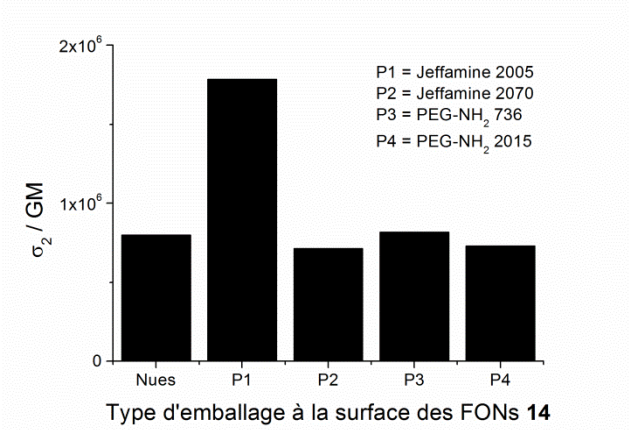


Figure 5. Dépendance de l'absorption à deux photons en fonction du type de polymère utilisé pour l'emballage à λ_{ex}^{2PA} = 970 nm ([polymère] = 6 µM).

Cette augmentation de l'intensité du signal d'absorption à deux photons indique que la présence du polymère modifie localement le champ électrique à la surface des nanoparticules. Bien que légère, cette modification du champ électrique local lorsque l'emballage est important et efficace semble indiquer que la partie ammonium du polymère se trouve à la surface. Il est intéressant de noter que seul le polymère M-2005 conduit à un signal d'ADP exalté. Ce comportement peut être expliqué par la nécessité de cloisonner parfaitement la nanoparticule avec le polymère afin de masquer les effets dominants de l'eau.

3.4 Impact sur la stabilité des FONs

Un autre facteur d'impact de l'emballage des FONs **14** par les polymères est intéressant à suivre : il s'agit de la stabilité des nanoparticules dans le temps (figure 6).

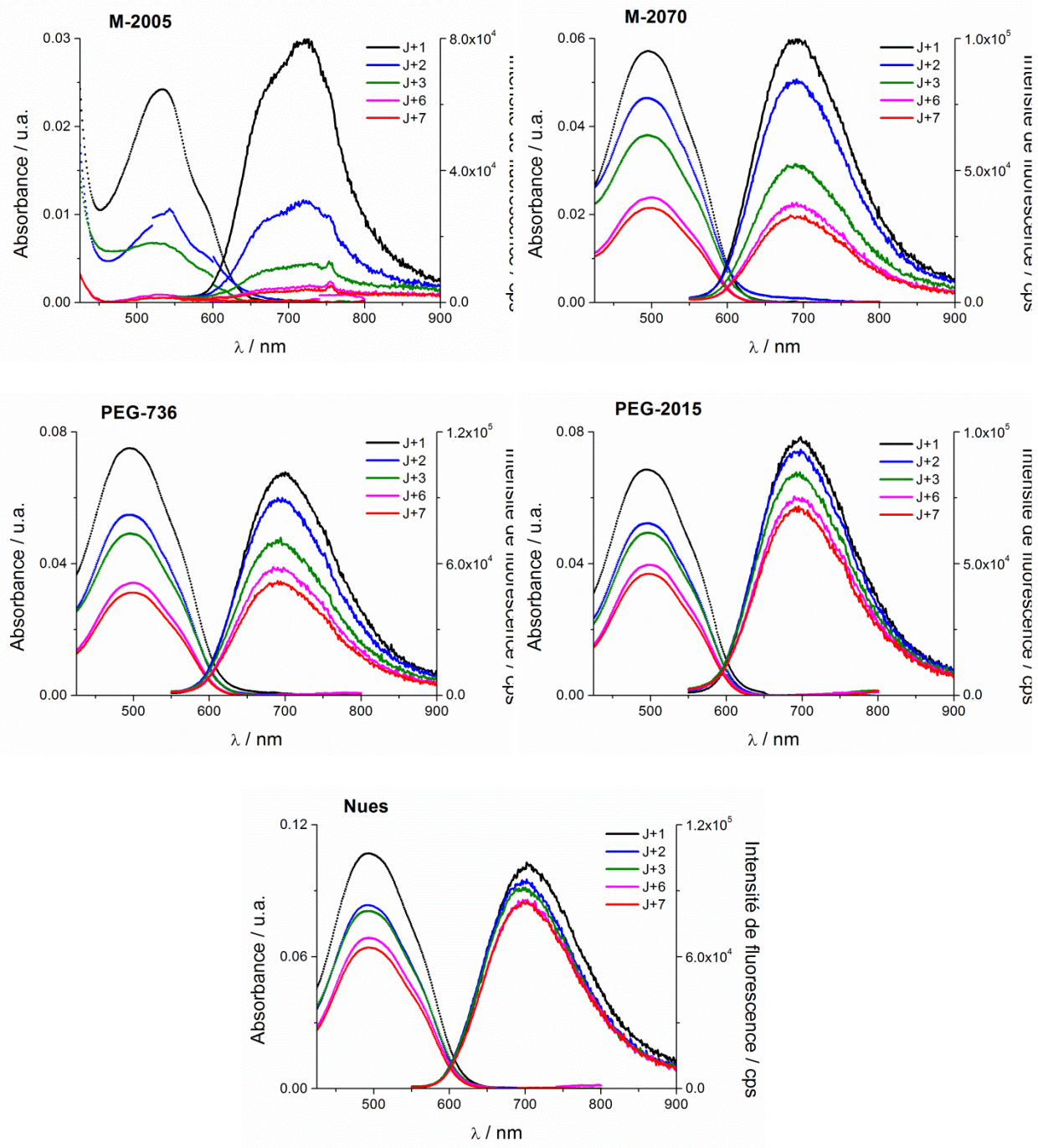


Figure 6. Évolution de l'absorption et de l'émission des FONs emballées ([polymère] = 50 µM) dans le temps.

Comme présentées dans le chapitre VI et sur la figure 6, les FONs nues ont une fluorescence qui se maintient dans le temps, alors que l'absorption indique une sédimentation

des nanoparticules relativement lente (certainement par formation de petits agrégats). Les enrobages « faibles » (PEG -736 et PEG-2015) affectent peu la sédimentation des nanoparticules, à l'inverse, l'émission diminue légèrement pour le polymère ayant le moins d'affinité (PEG-2015) et fortement pour le polymère PEG-736. Cette évolution indique que la présence des polymères affecte la stabilité colloïdale des FONs, et accélère les phénomènes de sédimentation. Cet effet s'accentue pour les polymères à « haute » affinité pour les nanoparticules tels que M-2070 ou bien M-2005. Pour M-2005, il est intéressant de noter qu'après 7 jours les nanoparticules ont totalement sédimenté.

Afin de confirmer cette tendance des effets de l'emballage, un autre chromophore bisaccepteur (**12**) est utilisé. Des FONs issues de **12** sont mises en présence de ces polymères ([polymère] ~10 µM) puis l'absorption et l'émission des FONs résultantes sont mesurées (figure 7).

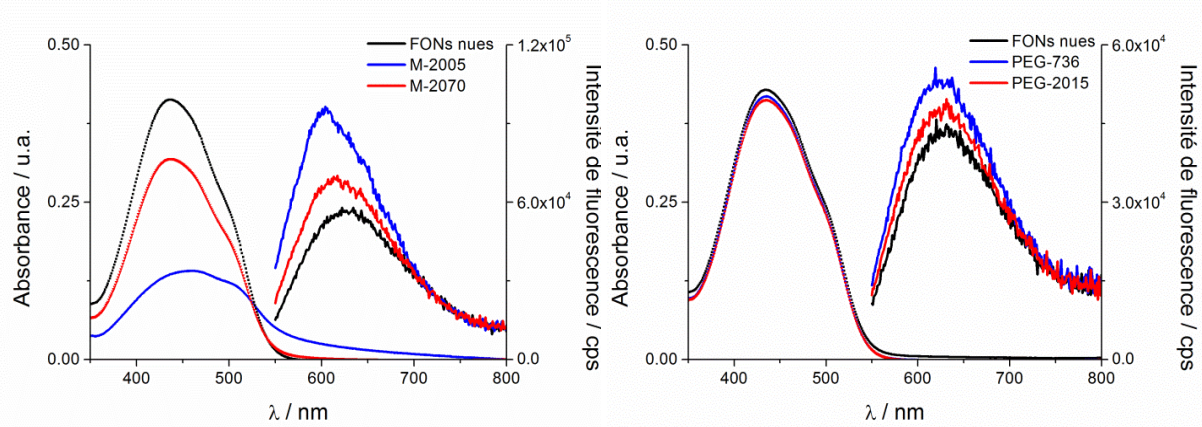


Figure 7. Évolution de l'absorption et de l'émission des FONs 12 en présence des polymères M-2005, M-2070, PEG-736 et PEG-2015 ([polymère]~10 µM).

Ces mesures attestent de la tendance à meilleur enrobage pour les polymères hydrophobes. Il est important de noter que dans cette expérience, le polymère M-2005 déstabilise fortement les FONs, comme le montre le spectre d'absorption sur la figure 7. L'ajout du polymère M-2070 induit une sédimentation légère des FONs. Cette sédimentation non visible à l'œil se manifeste par un effet hypochrome marqué (perte d'environ 25% du signal des FONs nues) sans apparition d'un élargissement inhomogène (caractéristique d'un grossissement des FONs). Ces effets sur la stabilité colloïdale mettent en évidence un aspect important de l'emballage qui est l'influence de la concentration des nanoparticules.

Alors que pour les expériences d'emballage avec les FONs **14**, la solution de nanoparticule a été diluée avant l'ajout de polymère (A~0.1), les FONs **12** sont utilisées non diluées (et non filtrées). Or la stabilité colloïdale est fortement impactée par l'environnement, et plus les nanoparticules sont concentrées moins la suspension est stable.

De ce constat, on remarque que l'ajout des polymères PEG-736 et PEG-2015 ne modifie pas la stabilité colloïdale des FONs, preuve une fois de plus que les interactions entre le polymère et la surface de la nanoparticule sont moins fortes/efficaces lorsque des polymères hydrophiles sont utilisés.

Afin de démontrer que la stabilité colloïdale des FONs enrobées dépend majoritairement de la concentration en nanoparticules, une mesure de l'évolution des propriétés d'absorption et d'émission des FONs **12** est effectuée sur une solution diluée (A~0.1). Le polymère choisi est M-2070 et sa concentration totale est graduellement augmentée jusqu'à atteindre le mM (pour rappel la concentration des FONs est de l'ordre du nM).

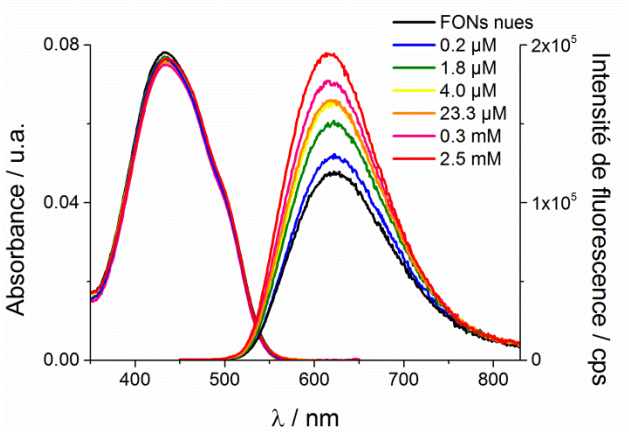


Figure 8. Évolution de l'absorption et de l'émission des FONs **12** (A ~0.1) en fonction de la concentration en polymère M-2070.

Comme les expériences précédentes l'ont montré, l'émission est exaltée alors que l'absorption n'est pas sujette à de fortes modifications malgré une concentration finale en polymère très haute. Ainsi le ratio [M-2070]/[FONs] est trois ordres de grandeur supérieurs pour l'expérience décrite sur la figure 8 ([M-2070] = 2.5 mM) que pour celle de la figure 7. Ceci démontre que lors des expériences d'enrobage, la concentration en nanoparticules est le facteur limitant par comparaison avec la concentration en polymère.

4. Étude par microscopie de suivi de particule unique sur les FONs 14 emballées

Malgré le nombre important de preuves concernant l'emballage des FONs **14** par les polymères M-2005, M-2070, PEG-736 et PEG-2015, une étude par microscopie de molécule unique peut donner de précieuses indications quant au comportement des FONs en suspension dans l'eau. La brillance exceptionnelle des FONs nues et emballées autorise leur observation en tant que particules uniques *via* un microscope à champ large adapté pour la microscopie de molécule unique.

Pour ces mesures de microscopie, certaines précautions vis-à-vis de la préparation de l'échantillon sont à prendre en compte ; la concentration en nanoparticules doit être la plus faible possible. Ainsi malgré une concentration pour les FONs **14** estimée à ~ 1 10^{-8} mol/L, une dilution d'un facteur cinq à dix (selon le type de mesures) est nécessaire. La nécessité d'avoir une faible concentration est due au fait qu'il est complexe de suivre et d'analyser un échantillon dans lequel la densité de population est importante. De plus, il est important de noter que les objets observés sont mobiles et se défocalisent très rapidement, complexifiant encore plus le suivi et l'analyse de particule unique. Pour cette raison, une densité de particules brillantes trop importante entraîne un rapport signal/bruit important, pouvant conduire à une mauvaise lecture de l'image.

La microscopie d'objets micrométriques en solution n'est pas influencée par certains phénomènes physiques contrairement à l'observation d'objets nanométriques. Ainsi, les mouvements de convection du milieu ne sont généralement pas observés lors de la microscopie cellulaire et ne sont donc pas gênants pour l'observation. À l'inverse les mouvements de convection sont très importants et gênants (illustration 3) lorsque l'on observe des nanoparticules en solutions.

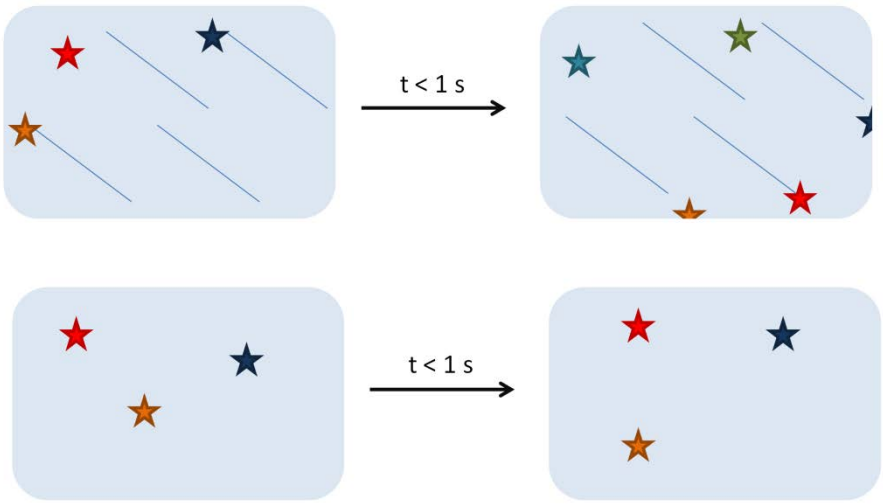


Illustration 3. Schématisation d'une observation de NPs (étoiles) sans contrôle de la convection (haut) et avec contrôle de la convection (bas).

Cette convection est très problématique lorsque des mesures de diffusion des nanoparticules sont envisagées. L'expérience de diffusion vise à déterminer la taille des nanoparticules en analysant leurs trajectoires issues des mouvements browniens. Il est évident que déterminer la trajectoire et la vitesse d'une nanoparticule lorsqu'elle est soumise aux mouvements de convection est impossible. Pour cette raison, les échantillons doivent être scellés pendant l'expérience afin d'éviter ce type de désagrément.

Les mesures de diffusion sont conduites sur les FONs nues et emballées dans l'eau (figure 9). Il est intéressant de remarquer que dans les expériences de diffusion, une discrimination est possible entre les différents types de polymères utilisés. Ainsi les FONs@M-2005 ont plus de mal à diffuser dans le milieu, indiquant une taille supérieure. À l'inverse, les FONs nues et les FONs@PEG-2015 diffusent rapidement dans le milieu, indiquant une taille moins importante.

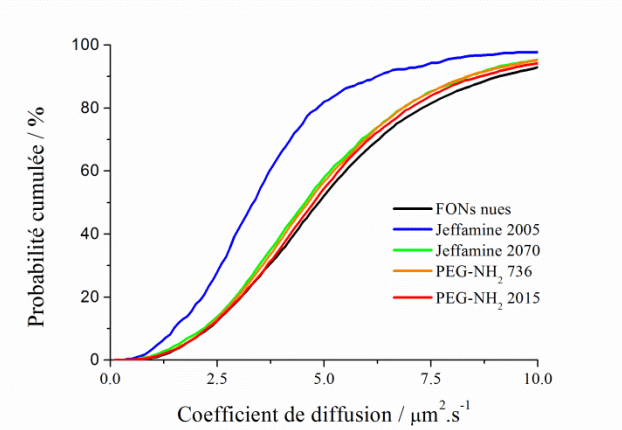


Figure 9. Distribution du coefficient de diffusion des FONs nues et emballées dans l'eau ([polymère] = 50 µM).

Cette technique permet d'évaluer l'épaisseur des couches polymériques enrobant les FONs. Il est intéressant de noter que ces valeurs sont cohérentes au regard des valeurs déterminées par la microscopie électronique (tableau 2).

Tableau 2. Estimation de l'épaisseur de la couche polymère sur les FONs **14** emballées.

Technique	M-2005	M-2070	PEG-736	PEG-2015
TEM	7 nm	5 nm	2 nm	1 nm
Diffusion	20 nm	3 nm	2.4 nm	1.2 nm

5. Influence du polymère sur la photostabilité des FONs emballées

Lors de l'amélioration d'un système, il est important de s'assurer que cette amélioration ne se fait pas aux dépens de propriétés nécessaires aux applications visées. Ainsi, les FONs emballées par des polymères présentent une brillance plus élevée que les FONs nues. La brillance est un élément clé pour l'imagerie biologique. Cependant, un second paramètre clé pour l'imagerie de fluorescence est la photostabilité du système luminescent. Il est donc important de s'assurer que la présence des polymères autour de la nanoparticule ne diminue pas la photostabilité de FONs.

Grâce à l'imagerie de molécule unique, les FONs **14** nues et emballées sont observées en tant que particules uniques et l'évolution de leur déclin de fluorescence est mesurée sous irradiation constante. L'étude de photostabilité qui en résulte (figure 10) montre que la présence des polymères affecte la photostabilité des FONs.

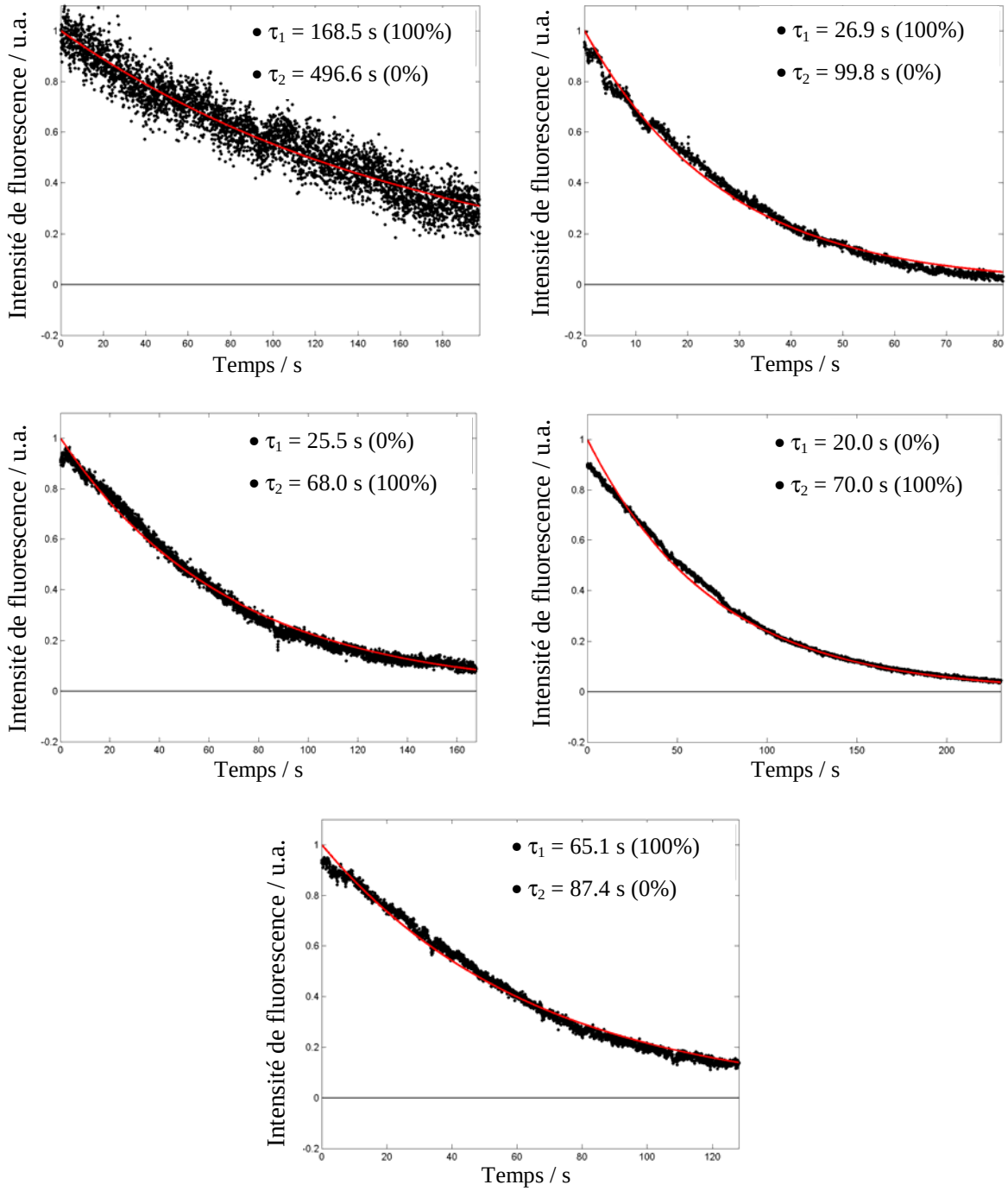


Figure 10. Mesure du déclin de fluorescence en fonction du temps des FONs **14** nues (bas) et emballées dans l'eau. En haut à gauche : M-2005 ; en haut à droite : M-2070 ; au centre à gauche : PEG-736 ; au centre à droite : PEG-2005. Le déclin correspond à la baisse de l'intensité de fluorescence (normalisée) d'une seule nanoparticule en fonction du temps d'irradiation. La courbe en rouge correspond à une courbe d'ajustement de type biexponentielle.

Il est intéressant de remarquer que les FONs nues et emballées avec les polymères PEG-736 et PEG-2005 présentent un déclin de fluorescence très similaire, avec des valeurs de τ entre 70 et 90 s, ce qui indique que ces polymères n'interfèrent pas avec la photostabilité des

FONs. À l'inverse, et de façon tout à fait surprenante, les polymères comportant des motifs hydrophobes ont des effets antagonistes sur la photostabilité. Alors que les FONs@M-2005 augmentent considérablement la photostabilité des FONs (plus de deux fois), la présence du polymère M-2070 semble au contraire la diminuer.

Ce comportement singulier démontre l'importance que revêt le choix du polymère, puisque malgré une brillance plus de deux fois supérieure aux FONs nues, les FONs@M-2070 présentent une photostabilité deux fois plus faible, ce qui est peu intéressant pour de l'imagerie nécessitant un temps d'exposition important.

Ce chapitre a permis de démontrer que la brillance des FONs pouvait être exaltée (gain de fluorescence de plus de 200%) en utilisant une approche hybride, où les interactions entre la surface des FONs et les polymères sont contrôlées par des interactions électrostatiques, mais aussi par l'hydrophobicité du polymère. Les FONs obtenues ont été observées par imagerie de molécule unique, ce qui a permis de mettre en avant une variation de la photostabilité des FONs emballées en fonction du type de polymère utilisé.

L'excellente photostabilité des FONs **14**, couplée à une émission dans le proche infrarouge, rend ces nanoparticules très intéressantes pour des expériences d'imagerie cellulaire. Le chapitre suivant aborde l'utilisation des FONs à base de molécules quadripolaires dans le milieu biologique *via* des expériences d'imagerie multicouleur.

Références bibliographiques

[1] Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P., Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science (Washington, D. C.)* **1998,** *281*, 2013-2016.

[2] Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W., Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science* **2003,** *300*, 1434-1436.

[3] Wu, Z.; Zhao, Y.; Qiu, F.; Li, Y.; Wang, S.; Yang, B.; Chen, L.; Sun, J.; Wang, J., Forming water-soluble CdSe/ZnS QDs using amphiphilic polymers, stearyl methacrylate/methylacrylate copolymers with different hydrophobic moiety ratios and their optical properties and stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009,** *350*, 121-129.

[4] Klymchenko, A. S.; Roger, E.; Anton, N.; Anton, H.; Shulov, I.; Vermot, J.; Mely, Y.; Vandamme, T. F., Highly lipophilic fluorescent dyes in nanoemulsions: towards bright non-leaking nanodroplets. *RSC Adv.* **2012,** *2*, 11876-11886.

[5] Kilin, V. N.; Anton, H.; Anton, N.; Steed, E.; Vermot, J.; Vandamme, T. F.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Counterion-enhanced cyanine dye loading into lipid nano-droplets for single-particle tracking in zebrafish. *Biomaterials* **2014,** *35*, 4950-4957.

[6] Mout, R.; Moyano, D. F.; Rana, S.; Rotello, V. M., Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012,** *41*, 2539-2544.

[7] Cheng, L.; He, W.; Gong, H.; Wang, C.; Chen, Q.; Cheng, Z.; Liu, Z., PEGylated Micelle Nanoparticles Encapsulating a Non-Fluorescent Near-Infrared Organic Dye as a Safe and Highly-Effective Photothermal Agent for In Vivo Cancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2013,** *23*, 5893-5902.

[8] Li, Z.; Wang, C.; Cheng, L.; Gong, H.; Yin, S.; Gong, Q.; Li, Y.; Liu, Z., PEG-functionalized iron oxide nanoclusters loaded with chlorin e6 for targeted, NIR light induced, photodynamic therapy. *Biomaterials* **2013,** *34*, 9160-9170.

[9] Poon, Z.; Chang, D.; Zhao, X.; Hammond, P. T., Layer-by-Layer Nanoparticles with a pH-Sheddable Layer for in Vivo Targeting of Tumor Hypoxia. *ACS Nano* **2011,** *5*, 4284-4292.

[10] Lu, H.; Zhao, X.; Tian, W.; Wang, Q.; Shi, J., Pluronic F127-folic acid encapsulated nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for targeted cellular imaging. *RSC Adv.* **2014,** *4*, 18460-18466.

[11] Li, K.; Jiang, Y.; Ding, D.; Zhang, X.; Liu, Y.; Hua, J.; Feng, S.-S.; Liu, B., Folic acid-functionalized two-photon absorbing nanoparticles for targeted MCF-7 cancer cell imaging. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011,** *47*, 7323-7325.

[12] Hayama, A.; Yamamoto, T.; Yokoyama, M.; Kawano, K.; Hattori, Y.; Maitani, Y., Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008,** *8*, 3085-3090.

[13] Yu, W. W.; Wang, Y. A.; Peng, X., Formation and Stability of Size-, Shape-, and Structure-Controlled CdTe Nanocrystals: Ligand Effects on Monomers and Nanocrystals. *Chemistry of Materials* **2003,** *15*, 4300-4308.

[14] Wadhavane, P. D.; Galian, R. E.; Izquierdo, M. A.; Aguilera-Sigalat, J.; Galindo, F.; Schmidt, L.; Burguete, M. I.; Perez-Prieto, J.; Luis, S. V., Photoluminescence Enhancement of CdSe Quantum Dots: A Case of Organogel-Nanoparticle Symbiosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2012,** *134*, 20554-20563.

[15] Li, Z. F.; Ruckenstein, E., Water-Soluble Poly(acrylic acid) Grafted Luminescent Silicon Nanoparticles and Their Use as Fluorescent Biological Staining Labels. *Nano Letters* **2004,** *4*, 1463-1467.

[16] Li, N.; Binder, W. H., Click-chemistry for nanoparticle-modification. *Journal of Materials Chemistry* **2011,** *21*, 16717-16734.

[17] Kuang, L.; Fink, M. J. In *Modification of alkene-passivated silicon nanoparticles by thiol-ene click reaction*2010 American Chemical Society; pp SESW-770.

[18] Zhang, S.; Zhao, Y., Facile Synthesis of Multivalent Water-Soluble Organic Nanoparticles via "Surface Clicking" of Alkynylated Surfactant Micelles. *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2010,** *43*, 4020-4022.

[19] Chen, C.-S.; Yao, J.; Durst, R. A., Liposome encapsulation of fluorescent nanoparticles: quantum dots and silica nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2006,** *8*, 1033-1038.

[20] Reisch, A.; Runser, A.; Arntz, Y.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles. *ACS Nano* **2015,** *9*, 5104-5116.

[21] Poon, Z.; Chang, D.; Zhao, X.; Hammond, P. T., Layer-by-layer nanoparticles with a pH-sheddable layer for in vivo targeting of tumor hypoxia. *ACS Nano* **2011,** *5*, 4284-92.

[22] Powell, T. J.; Palath, N.; DeRome, M. E.; Tang, J.; Jacobs, A.; Boyd, J. G., Synthetic nanoparticle vaccines produced by layer-by-layer assembly of artificial biofilms induce potent protective T-cell and antibody responses in vivo. *Vaccine* **2011,** *29*, 558-569.

[23] Trofymchuk, K.; Reisch, A.; Shulov, I.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale* **2014,** *6*, 12934-12942.

[24] Terenziani, F.; Morone, M.; Gmouh, S.; Blanchard-Desce, M., Linear and two-photon absorption properties of interacting polar chromophores: standard and unconventional effects. *ChemPhysChem* **2006,** *7*, 685-696.

[25] Rouxel, C.; Charlot, M.; Mongin, O.; Krishna, T. R.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., From Graftable Biphotonic Chromophores to Water-Soluble Organic Nanodots for Biophotonics: The Importance of Environmental Effects. *Chem. - Eur. J.* **2012,** *18*, 16450-16462.

Chapitre VIII – Utilisation des FONs en imagerie multicouleur par suivi de particule unique (SPT)

Chapitre VIII – Utilisation des FONs en imagerie multicouleur par suivi de particule unique (SPT)

Les expériences d'imagerie de particule unique ont permis de mettre en avant l'excellente photostabilité des FONs **14** dans l'eau. La petite taille de ces FONs (D_{TEM} ~14 nm) ainsi que leur émission dans le proche IR sont des atouts essentiels en vue d'une utilisation en microscopie de fluorescence. Tirant partit des larges bandes d'absorption des FONs **14** et des FONs **20** ainsi que de leur déplacement de Stokes important, des expériences d'imagerie où les deux types de nanoparticules sont excitées ont été réalisées. Les résultats de ces expériences sont consignés dans ce chapitre.

1. Introduction

La microscopie de fluorescence est un outil essentiel en biologie et depuis quelques années, l'imagerie multicouleur de molécules uniques est devenue une technique de choix pour la compréhension de phénomènes complexes. L'utilisation de plusieurs marqueurs luminescents permet l'observation de plusieurs objets simultanément, par exemple la localisation de protéines,[1] l'internalisation de protéines cargo[2] ou la visualisation de plusieurs canaux lymphatiques.[3] L'imagerie multicouleur nécessitant l'utilisation de plusieurs sondes luminescentes en même temps, il est absolument nécessaire que les émissions des différentes sondes ne se recouvrent pas. Dans le cas contraire, le recouvrement spectral entre les différentes sondes apporte une incertitude sur l'identité du marqueur observé perdant ainsi l'intérêt de cette technique d'imagerie.

Grâce à la grande diversité de leur structure chimique et de leur émission de fluorescence, les fluorophores organiques ont été intensivement utilisés pour l'imagerie multicouleur. Bien que biocompatibles, les molécules fluorescentes ont une photostabilité limitée en milieu biologique ainsi que des brillances relativement faibles ($\varepsilon\Phi \sim 10^4$-$10^5$ L. $mol^{-1}.cm^{-1}$).

Ces caractéristiques limitent leur application pour du suivi de molécule unique et, malgré le développement de nouvelles générations de sondes de type Atto et Alexa,[4, 5] le

faible déplacement de Stokes de ces fluorophores restreint leur utilisation en imagerie multicouleur.

Plusieurs stratégies ont été développées depuis quelques années dans le but d'optimiser la brillance et la photostabilité des molécules organiques, par exemple la protection du chromophore au sein de structures polypeptidiques telles que les protéines fluorescentes.[6, 7] Les protéines fluorescentes (FP) sont des protéines extraites de la faune marine qui ont la particularité d'émettre naturellement de la fluorescence. Les FPs biosourcés les plus connus sont la protéine fluorescente verte (GFP) issue de la méduse *Aequorae victoria* et la protéine fluorescente rouge (DsRed) extraite du corail *Discosoma* (figure 1).[8, 9]

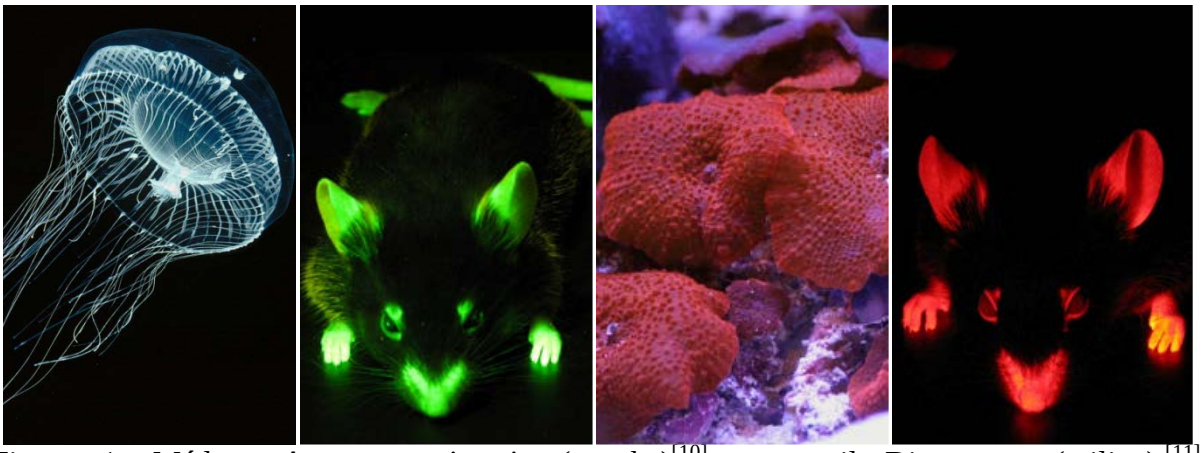


Figure 1. Méduse *Aequorae victoria* (gauche)[10] et corail Discosoma (milieu).[11] Fluorescence obtenue par l'expression de la GFP (milieu) et du DsRed (droite) chez la souris.[12]

D'autres couleurs ont pu être obtenues par mutations de la GFP et du DsRed, donnant ainsi accès à une large palette de protéines fluorescentes dans la gamme du visible pour l'imagerie multicouleur.[13-16] L'intérêt des protéines fluorescentes réside dans leur capacité à être sélectivement exprimée dans certaines organelles ou autres sites biologiques (figure 2) tout en étant biocompatibles. Cependant, malgré les efforts effectués pour améliorer les propriétés photophysiques de ces protéines, la présence d'un unique chromophore par protéine limite fortement leurs brillances ($\varepsilon\Phi$ ~10^4-10^5 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$).[13] De plus la photostabilité de ces FPs reste toujours très faible, en comparaison avec les nanocristaux inorganiques (QDs).

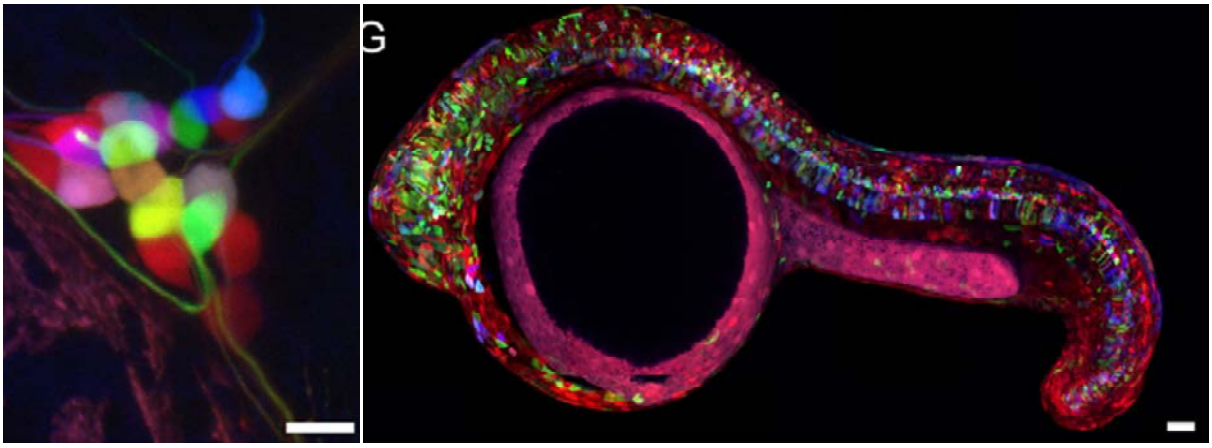


Figure 2. Exemple de neurones sensitifs trijumeaux marqués avec des FPs chez l'embryon de poisson-zèbre.[15] Échelle : 50 µm.

L'excellente photostabilité et brillance des QDs leur a permis d'être largement utilisés en imagerie classique et multicouleur.[17-20] Cependant depuis quelques années, les recherches se sont intensifiées dans le but de proposer des NPs « toutes organiques » avec des brillances comparables à celles des QDs, par exemple les dendrimères,[21] les NPs de carbone[22] et les nanoparticules organiques luminescentes.[23-26]

2. Choix des FONs pour l'imagerie multicouleur

L'imagerie de particule unique requiert l'utilisation de nanoparticules brillantes et suffisamment photostables pour être observées sur une période de temps pouvant aller jusqu'à la minute. Dans le chapitre VI, grâce à leur brillance et leur photostabilité, les FONs **14** sont apparues comme étant des nano-objets prometteurs pour le suivi de particule unique. De plus, leur émission située dans le proche IR permet d'envisager des expériences d'imagerie dans les tissus biologiques. Les interactions moléculaires fortes au sein de ces FONs ont permis l'émergence d'un déplacement de Stokes important (~6 000 cm^{-1}), qui est un paramètre essentiel pour faire de l'imagerie multicouleur.

Grâce au nombre conséquent de chromophores présents dans le laboratoire, une sélection des FONs a pu être effectuée dans le but de trouver un partenaire idéal aux FONs **14** dans l'optique d'effectuer de l'imagerie multicouleur. Lors de cette sélection, les FONs **20** semblent être un partenaire idéal puisqu'elles possèdent une brillance très élevée (~2 10^8 $M^{-1}.cm^{-1}$) ainsi qu'un grand déplacement de Stokes (~5 300 cm^{-1}). Ces FONs

émettrices vertes ont leur maximum d'absorption situé dans le bleu, alors que les FONs **14** absorbent dans le vert.

Tableau 1. Caractéristiques physiques et photophysiques des FONs **14** et **20** dans l'eau.

	λ_{abs}^{max}	λ_{em}^{max}	$\varepsilon^{max}\Phi$ *a)*	$\varepsilon^{488}\Phi$ *b)*	Stokes' shift	D_{TEM} *c)*
	nm	nm	$M^{-1}.cm^{-1}$	$M^{-1}.cm^{-1}$	cm^{-1}	nm
FONs **14**	503	716	$1\ 10^6$	$9\ 10^5$	5 910	14
FONs **20**	400	507	$2\ 10^8$	$6\ 10^5$	5 280	43

a) Brillance des FONs à λ_{ex}^{max}. *b)* Brillance des FONs à λ_{ex} = 488 nm. *c)* Diamètre « sec » des FONs déterminé par microscopie électronique.

Cette différence entre les spectres d'absorption permet d'effectuer une excitation collective des FONs (**14** et **20**) ou bien une excitation sélective des FONs **14** (figure 3, tableau 1). De même l'émission de fluorescence des FONs **14** et **20** peut être facilement discriminée au vu de leur spectre d'émission (figure 3) autorisant ainsi la détection exclusive d'une des deux nanoparticules.

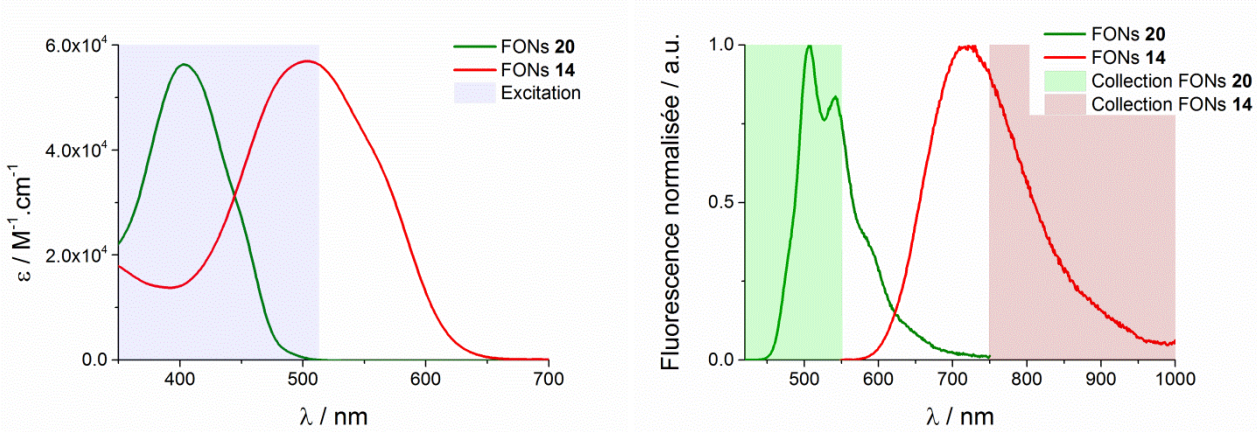


Figure 3. Recouvrement des spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) des FONs **14** et **20** dans l'eau.

L'excitation de deux nanoparticules différentes via l'utilisation d'une seule longueur d'onde est très intéressante pour une application en imagerie, car cela simplifie la plateforme d'imagerie utilisée.

3. Montage de la plateforme d'imagerie

Tirant profit des propriétés photophysiques de ces FONs, nous avons choisi d'utiliser un microscope inversé avec une excitation monochromatique fixée à 488 nm. Cette valeur est choisie, car à cette longueur d'onde, les brillances des FONs **14** et **20** sont du même ordre de

grandeur (tableau 1). Malgré les grandes valeurs de déplacement de Stokes pour les deux types de FONs, la largeur des bandes d'émission ne permet pas de collecter la totalité de l'émission de fluorescence des FONs **14** et **20**. Ainsi en utilisant des filtres optiques adaptés (annexe), la plage de longueur d'onde 550-776 nm n'est pas collectée, et les émissions de fluorescence des FONs **14** et **20** sont collectées sur des caméras différentes.

Afin de s'assurer que chaque caméra ne détecte que les FONs pour lesquelles elle a été assignée, des solutions aqueuses de FONs **14** et **20** sont observées et leur fluorescence est récoltée sur chaque caméra (figure 4).

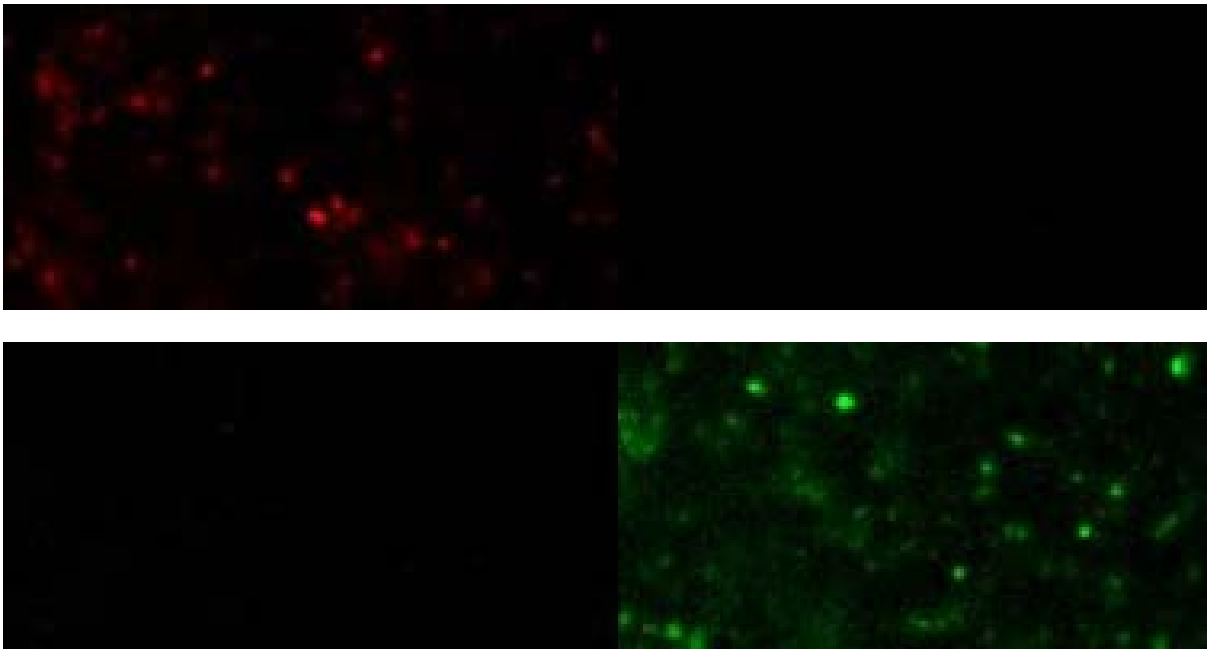


Figure 4. Observation d'une solution aqueuse de FONs **14** (en haut) et de FONs **20** (en bas) par microscopie de fluorescence de molécule unique. L'image de gauche correspond à la détection « NIR » et l'image de droite à la détection du vert. Les couleurs sont artificielles.

Comme le montre la figure 4, chaque caméra ne détecte qu'un type de FONs, permettant ainsi de s'assurer de la fiabilité des mesures dans les sections suivantes.

4. Mesure de la photostabilité des FONs

Les caractéristiques spectrales et photophysiques des FONs **14** et **20** rendent possible leur utilisation en imagerie multicouleur. Cependant tout comme la luminescence, la photostabilité est un paramètre important à déterminer pour ce type d'imagerie.

La mesure de photostabilité est une mesure qui dépend de nombreux paramètres dont évidemment la puissance d'irradiation. À cause de cette dépendance, et dans une approche qualitative, la photostabilité des FONs **14** est mesurée une nouvelle fois (figure 5). Ceci afin de pouvoir s'assurer que la comparaison entre la stabilité des deux FONs **14** et **20** est possible et cohérente.

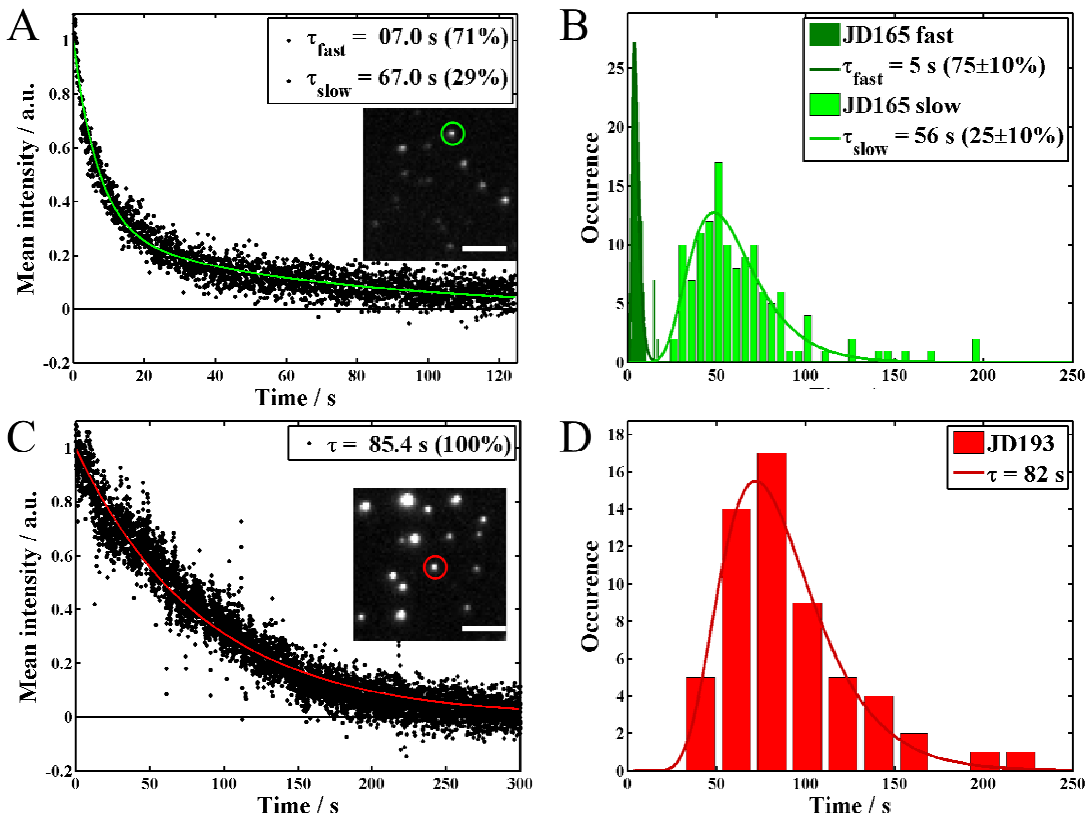


Figure 5. Mesure de photostabilité (gauche) d'une FONs **20** (haut) et **14** (bas) dans l'eau. Les histogrammes (droite) représentent la distribution du déclin de fluorescence en fonction du temps sur un échantillon de *n* FONs (*n* = 64 pour les FONs **14** et *n* = 128 pour les FONs **20**). P = 1.70 kW.cm^{-2} pour les FONs **20** et P = 0.35 kW.cm^{-2} pour les FONs **14**. Échelle : 5 µm.

Les mesures de déclin de fluorescence de la figure 5 confirment l'excellente photostabilité des FONs **14,** mais indiquent que les FONs **20** présentent un profil de photostabilité nettement inférieur. Curieusement, les FONs **20** ont un déclin de fluorescence biexponentiel avec la composante majoritaire très courte ($\tau_{1/2}$ = 5 s) et la composante minoritaire longue ($\tau_{1/2}$ = 56 s).

Bien que frustrants, ces résultats sur les FONs **20** ne sont pas surprenants. Des mesures électrochimiques sur le composé **20** ont permis de déterminer le potentiel d'oxydoréduction du couple **20**$^{2+}$/**20** à +0.8 V. Cette valeur étant inférieure à celle du couple O_2/H_2O (+1.23 V),

il apparaît clairement que l'oxygène dissous dans l'eau peut oxyder les chromophores à la surface des FONs. De plus, les processus d'oxydation étant favorisée dans l'état excité, l'hypothèse d'une oxydation de la surface de la nanoparticule conduisant à la diminution de sa fluorescence sont plausibles.

Néanmoins, grâce à l'excellente brillance des FONs **20** celles-ci peuvent être détectées pendant plus d'une minute (figure 5) autorisant leur utilisation en imagerie de suivi de particule unique (SPT).

5. Expérience de SPT dans l'eau

Avant de tester ce couple de FONs dans des expériences d'imagerie multicouleur, il est intéressant d'étudier le comportement des FONs individuellement dans l'eau. Le suivi de particule unique permet d'observer le comportement des nanoparticules dans l'eau tant en terme de déplacement (aléatoire ou non) qu'en terme de stabilité (agrégation, coalescence ou bien fragmentation des NPs en solution). Ces expériences ont donc été conduites sur des solutions aqueuses composées exclusivement des FONs **14** ou **20** (figure 5).

5.1 Validation du montage

Similairement aux expériences de SPT menées dans le chapitre VII, les mesures de suivi de particule unique sur des solutions aqueuses de FONs **14** ou **20** permettent de déterminer leur diamètre hydrodynamique (D_h). L'analyse de la trajectoire des FONs et la reconstruction de celle-ci permet de déterminer le coefficient de diffusion des FONs et par traitement mathématique de calculer la valeur de D_h. Les valeurs obtenues concordent avec les valeurs mesurées par DLS (chapitre VI).

Durant les mesures, aucun signe évident d'une modification dans la stabilité colloïdale ou chimique des FONs n'a été observé. L'absence d'agrégation en solution est un point positif pour une utilisation potentielle de ces FONs en imagerie *in vivo*.

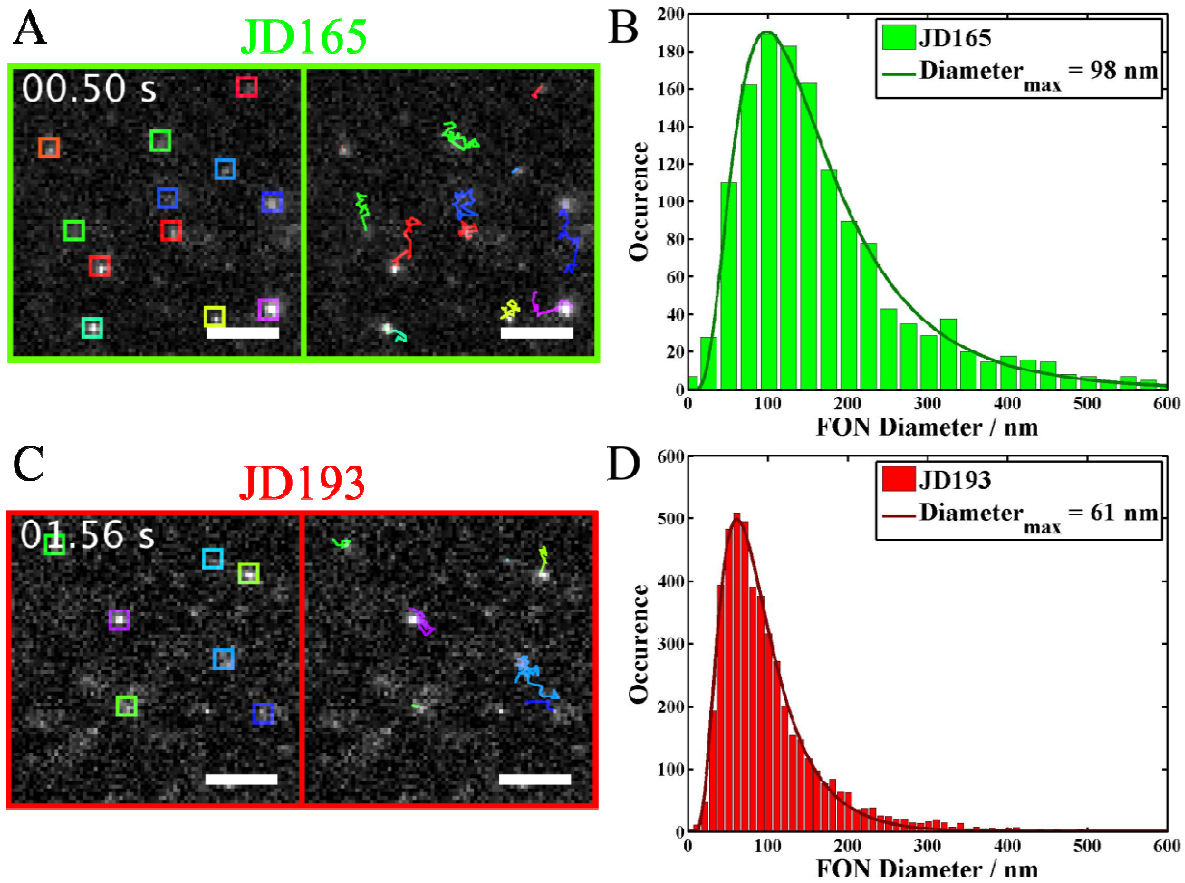


Figure 5. Suivi de particules uniques (gauche) des FONs **14** (bas) et **20** (haut) et distributions des diamètres hydrodynamique (D_h) extraites des expériences de SPT (droite). Échelle : 5µm.

Sur la figure 5, les trajectoires des FONs sont représentées par des traits colorés. La petite taille des FONs **14** leur permet de se déplacer beaucoup plus vite dans l'eau. Du fait de ces mouvements rapides, ces nanoparticules ont tendances à se défocaliser très rapidement, et donc le suivi de leur trajectoire dans le plan focal est plus difficile que celui des FONs **20** qui ont une taille plus importante et donc une vitesse de déplacement plus faible.

Cette différence de mobilité est très utile, puisqu'elle permet de détecter plus facilement les FONs **20** qui se trouvent être les nanoparticules les plus diluées et les moins photostables. Un second avantage issu de cette différence de mobilité est que dans le cadre d'une expérience d'imagerie multicouleur en milieu biologique, il est possible d'envisager que la mesure de la diffusion des FONs dans le milieu pourrait donner de précieuses indications sur la viscosité du milieu. De plus, sous réserve que la taille et la stabilité colloïdale des FONs restent inchangées en milieu biologique, le fait d'utiliser deux types de FONs avec des vélocités différentes permet d'utiliser une des deux NPs comme référence interne.

Les expériences de SPT, couplées avec les mesures de stabilité des FONs permettent d'envisager sereinement l'utilisation de ces nanoparticules pour de l'imagerie multicouleur. Les systèmes biologiques étant des milieux complexes, il est important de s'assurer que les deux types de FONs n'interagissent pas ensemble en observant leur comportement dans une solution aqueuse contenant les FONs **14** et **20**.

5.2 Imagerie multicouleur

Une solution aqueuse de FONs contenant à la fois des FONs **14** et des FONs **20** a été obtenue en mélangeant simplement des solutions aqueuses de FONs **14** et **20**. Initialement, les concentrations en FONs sont estimées à 4 nM pour une solution aqueuse de FONs **14** et 0.3 nM pour une solution aqueuse de FONs **20**. Cependant, à cause de la faible photostabilité des FONs **20**, la solution aqueuse de nanoparticules contenant un mélange des deux FONs utilisée pendant l'expérience d'imagerie bicouleur, est composée de 80% de FONs **20** et de 20% de FONs **14** (% volumiques) dans le but de rendre maximale la détection des FONs **20**. Les profils d'excitation et de détection des FONs sont les mêmes que pour les expériences de SPT (figure 6).

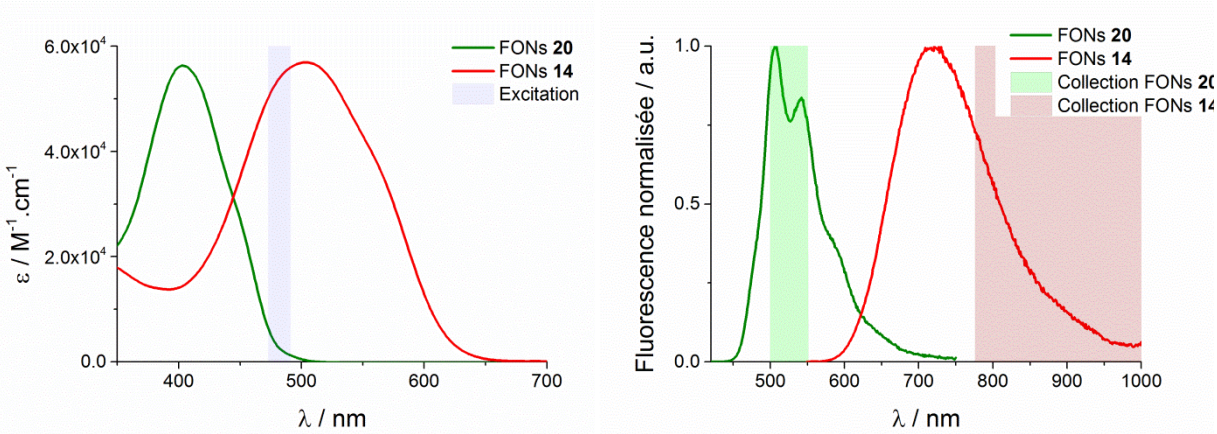


Figure 6. Profils d'excitation (à gauche) et de détections (à droite) des FONs **14** et **20** mélangées dans l'eau.

De façon tout à fait remarquable, les deux types de FONs sont facilement détectables et il est possible de suivre individuellement le déplacement des FONs ainsi que leur trajectoire. Il est important de noter que les collisions entre FONs ne sont pas observées, ce qui laisse penser que malgré la grande concentration en particules, les interactions électrostatiques dévient les FONs les unes des autres. La présence d'une couleur jaune dans la

figure 7 (bas), signe d'un recouvrement entre le vert et le rouge est probablement dû à la présence de FONs **14** et **20** sur le même axe z, mais dans des plans de focalisation différents.

Comme attendu, la combinaison des images obtenues sur les deux caméras (figure 7 en bas) montre bien qu'il n'y a pas de colocalisation des FONs et que les nanoparticules ne semblent pas interagir.

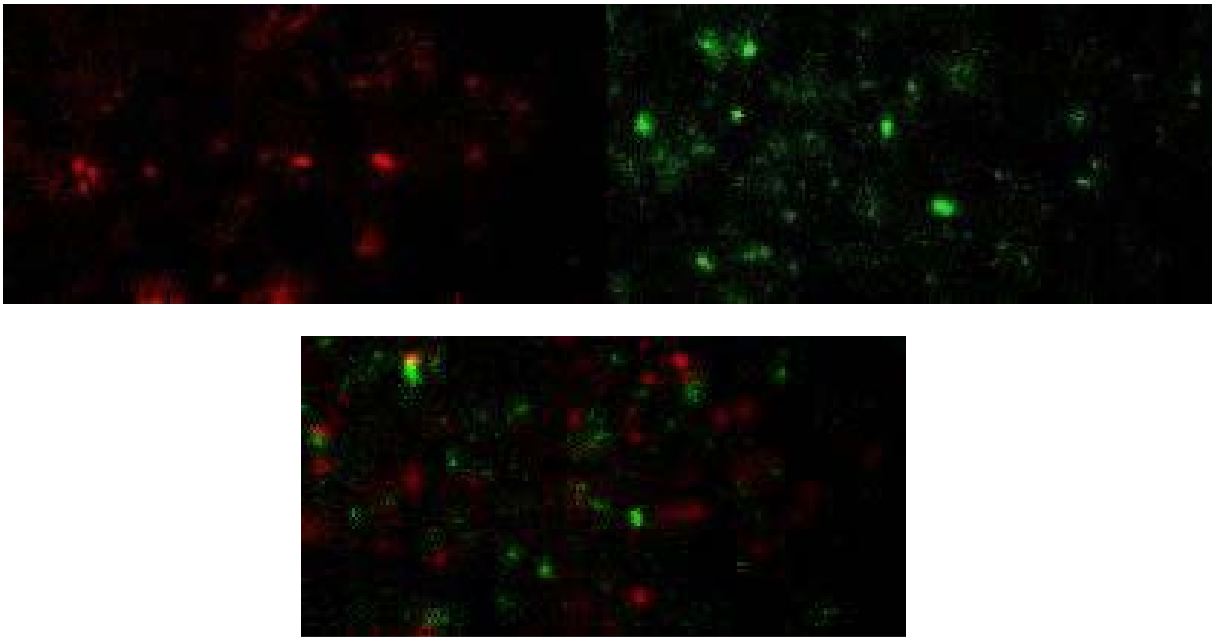


Figure 7. Observation simultanée d'une solution aqueuse contenant des FONs **14** (gauche) et **20** (droite) et fusion des signaux collectés sur les deux caméras (bas). Les couleurs sont artificielles.

Toutes ces expériences montrent que le concept de suivi de particule unique en mode multicouleur fonctionne parfaitement pour ce couple de FONs. La dernière étape et la plus cruciale est la validation de ce concept en milieu biologique.

6. Imagerie multicouleur simultanée des FONs en milieu cellulaire

Pour cette expérience, les FONs **14** et **20** sont incubées dans des cellules de fibroblastes COS 7 pendant 2h dans les mêmes conditions de concentration que l'expérience d'imagerie multicouleur dans l'eau. Afin d'éviter une pollution due à la diffusion de FONs présentent dans le milieu extracellulaire, une fois l'incubation terminée, les cellules sont rincées plusieurs fois avec du milieu de culture.

Les cellules sont observées dans les mêmes conditions de mesures que l'expérience de microscopie multicouleur de la section précédente.

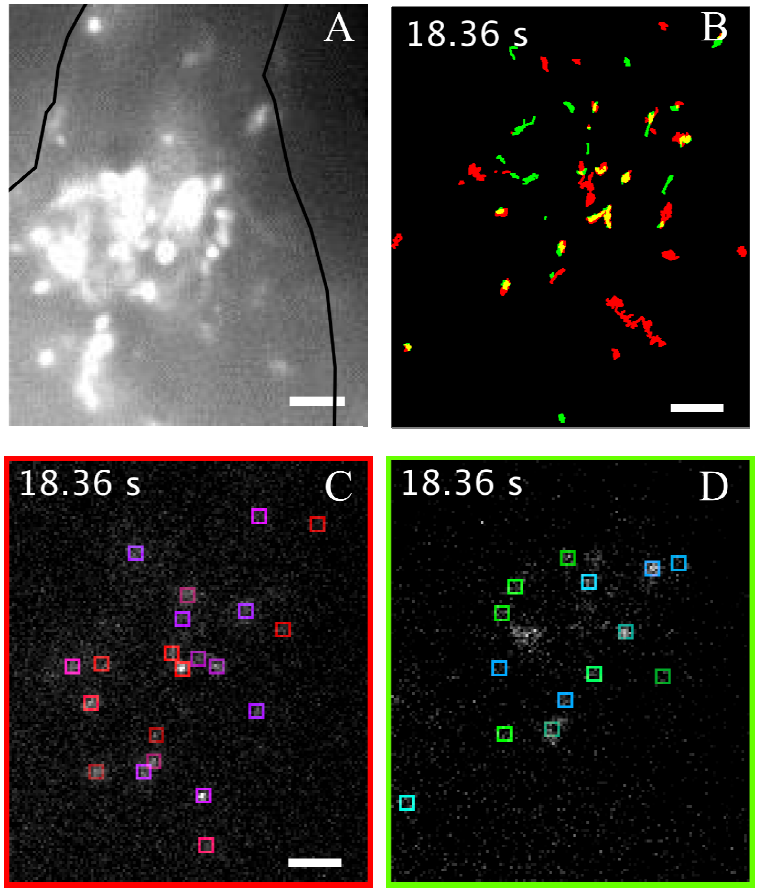


Figure 8. SPT des FONs **14** (en bas à gauche) et **20** (en bas à droite) dans des cellules vivantes de COS 7. Le contour de la cellule est délimité en noir (en haut à gauche). Reconstruction de la trajectoire des FONs (en haut à droite) Echelle : 5 µm.

Les mesures de SPT montrent que les FONs **14** et **20** conservent leur fluorescence en milieu cellulaire et la reconstruction de leur trajectoire montre qu'elles ne restent pas immobiles dans la cellule. Cette mobilité est importante puisqu'elle montre que les FONs ne s'agrègent pas sur des organelles ou bien sur la membrane cellulaire. Curieusement, le déplacement des FONs **14** et **20** est plus lent que lors des expériences dans l'eau. Bien que le milieu cellulaire soit fortement ionique, il est probable que le ralentissement des FONs provienne de leur internalisation dans des vésicules cellulaires. De plus, certaines trajectoires semblent dirigées comme le montrent les flèches blanches (figure 9), or la diffusion libre des FONs (mouvement brownien) est un processus aléatoire, un déplacement préférentiel pourrait suggérer le transport des FONs par une entité biologique.

Il est important de souligner qu'après 24 h d'incubation des FONs **14** et **20**, aucun signe de toxicité n'a pu être observé.

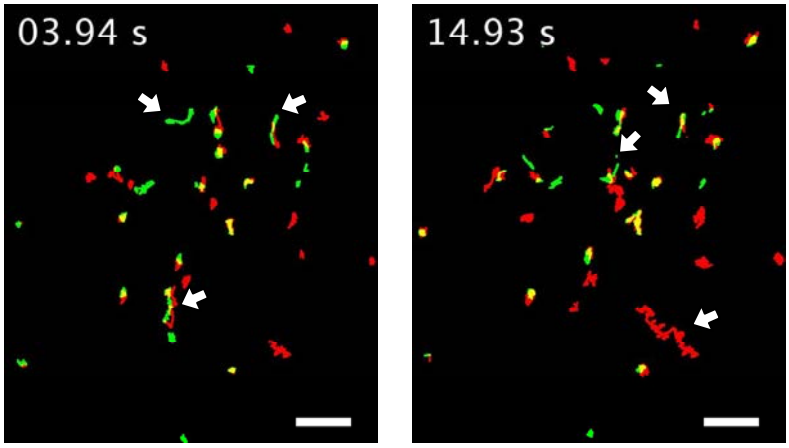


Figure 9. Trajectoire des FONs **14** et **20** dans les cellules COS 7 à différentes échelles de temps. Échelle : 5 µm.

L'excellente brillance, la photostabilité et le choix de filtres optiques adaptés ont permis de montrer dans ce chapitre que les FONs peuvent être utilisées pour des expériences d'imagerie multicouleur. Grâce à la nature de leur surface et leur taille, ces FONs peuvent être incorporées dans des cellules de type COS 7 de façon passive et leur robustesse autorise le suivi simultané de particule unique en imagerie multicouleur dans des cellules biologiques. L'absence d'affinité spécifique associée à l'absence de toxicité sur une période de 24 h est un atout majeur pour ces FONs. Ceci démontre le potentiel extraordinaire des FONs en tant qu'outils pour l'imagerie biologique.

Références bibliographiques

[1] Shroff, H.; Galbraith, C. G.; Galbraith, J. A.; White, H.; Gillette, J.; Olenych, S.; Davidson, M. W.; Betzig, E., Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007,** *104*, 20308-20313.

[2] Keller, P.; Toomre, D.; Diaz, E.; White, J.; Simons, K., Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* **2001,** *3*, 140-149.

[3] Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Regino, C. A. S.; Urano, Y.; Choyke, P. L., Simultaneous Multicolor Imaging of Five Different Lymphatic Basins Using Quantum Dots. *Nano Letters* **2007,** *7*, 1711-1716.

[4] Fluorescent Labels and Dyes. ATTO-TEC, Ed. ATTO-TEC2009.

[5] Wiederschain, G. Y., *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. MAIK Nauka/Interperiodica2011; Vol. 76, p 1276.

[6] Lippincott-Schwartz, J.; Patterson, G. H., Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **2003,** *300*, 87-91.

[7] Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y., A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2005,** *2*, 905-9.

[8] McPhie, P., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. Joseph R. Lakowicz. *Anal. Biochem.* **2000,** *287*, 353-354.

[9] Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y., Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **1995,** *20*, 448-455.

[10] geographic, N. http://voices.nationalgeographic.com/2012/04/03/love-and-war-the-essence-of-luminosity/aequorea/.

[11] Thermofisher https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/labeling-your-samples/labeling-using-fluorescent-proteins.html.

[12] Nightsea http://www.nightsea.com/products/dfp/.

[13] Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y., Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotech* **2004,** *22*, 1567-1572.

[14] Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y., Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002,** *3*, 906-918.

[15] Pan, Y. A.; Freundlich, T.; Weissman, T. A.; Schoppik, D.; Wang, X. C.; Zimmerman, S.; Ciruna, B.; Sanes, J. R.; Lichtman, J. W.; Schier, A. F., Zebrabow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* **2013,** *140*, 2835-2846.

[16] Lichtman, J. W.; Livet, J.; Sanes, J. R., A technicolour approach to the connectome. *Nat Rev Neurosci* **2008,** *9*, 417-422.

[17] Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y., Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotech* **2004,** *22*, 1567-1572.

[18] Wolfbeis, O. S., An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015,** *44*, 4743-4768.

[19] Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2005,** *307*, 538-544.

[20] Nicolas, J.; Brambilla, D.; Carion, O.; Pons, T.; Maksimovic, I.; Larquet, E.; Le Droumaguet, B.; Andrieux, K.; Dubertret, B.; Couvreur, P., Quantum dot-loaded PEGylated poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for in vitro and in vivo imaging. *Soft Matter* **2011,** *7*, 6187-6193.

[21] Jaiswal, J. K.; Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Simon, S. M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotech* **2003,** *21*, 47-51.

[22] Krishna, T. R.; Parent, M.; Werts, M. H. V.; Moreaux, L.; Gmouh, S.; Charpak, S.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Blanchard-Desce, M., Water-soluble dendrimeric two-photon tracers for in vivo imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006,** *45*, 4645-4648.

[23] Jiang, K.; Sun, S.; Zhang, L.; Lu, Y.; Wu, A.; Cai, C.; Lin, H., Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015,** *54*, 5360-5363.

[24] Trofymchuk, K.; Reisch, A.; Shulov, I.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S., Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale* **2014,** *6*, 12934-12942.

[25] Amro, K.; Daniel, J.; Clermont, G.; Bsaibess, T.; Pucheault, M.; Genin, E.; Vaultier, M.; Blanchard-Desce, M., New route towards fluorescent organic nanoparticles with red-shifted emission and increased colloidal stability. *Tetrahedron* **2014,** *70*, 1903-1909.

[26] Genin, E.; Gao, Z.; Varela, J. A.; Daniel, J.; Bsaibess, T.; Gosse, I.; Groc, L.; Cognet, L.; Blanchard-Desce, M., "Hyper-bright" Near-Infrared Emitting Fluorescent Organic Nanoparticles for Single Particle Tracking. *Adv. Mater.* **2014,** *26*, 2258-2261.

[27] Fery-Forgues, S., Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications. *Nanoscale* **2013,** *5*, 8428-8442.

Conclusion générale

Dans un contexte de course effrénée de la recherche de sondes fluorescentes toujours plus brillantes et photostables pour l'imagerie, ce manuscrit présente des résultats originaux sur des nanoparticules organiques fluorescentes (FONs). La préparation de FONs nécessite l'utilisation de fluorophores dont le design prend en compte les interactions intermoléculaires. De plus dans ce manuscrit, la préparation de FONs à partir de fluorophores de différentes structures et nature a montré que le choix du fluorophore est crucial pour la préparation de FONs. Ainsi, nous avons montré qu'en jouant sur la longueur du système π conjugué ou bien sur l'encombrement stérique, il est possible de moduler l'émission et la stabilité des FONs.

L'utilisation de chromophores quadripolaires originaux pour la préparation des FONs a mis en avant que pour ce type de fluorophores, les interactions entre les molécules au sein de la nanoparticule conduisent à des phénomènes d'éclatement excitoniques, générant des FONs à large déplacement de Stokes ainsi que des émissions plus fortement décalées vers le rouge par rapport aux FONs issues de molécules dipolaires. L'utilisation de diverses méthodes de spectroscopie a permis de caractériser ces nanoparticules et dans le cas des FONs **D2** et **D3**, l'utilisation de la diffusion hyper-Rayleigh a montré que l'on pouvait sonder l'organisation des molécules à la surface des FONs. La nature de la surface des FONs a permis de démontrer que ces nanoparticules peuvent être enrobées par des polymères *via* des interactions électrostatiques. Nous avons pu montrer que la nature de la couche polymérique pouvait influencer les propriétés photophysiques à un et deux photons de ces FONs.

Les brillances élevées ainsi que leur taille et la nature de leur surface permettent à ces nanoparticules de pénétrer certainement par endocytose à l'intérieur des cellules. De plus, l'excellente photostabilité des FONs **D4**, **14** et **20** a permis de montrer qu'il est possible de faire de l'imagerie de particule unique sur des cellules vivantes et de suivre ces nanoparticules sans toxicité apparente. Ces expériences d'imagerie démontrent que ces nanoparticules organiques sont des alternatives viables aux QDs pour des applications en bioimagerie. Les interactions électrostatiques à la surface des FONs ainsi que la brillance à deux photons de ces nanoparticules pourront être utilisées conjointement afin de doter ces FONs de fonctions de reconnaissance par exemple pour la détection de cellules cancéreuses *in vivo*.

Articles soumis durant la thèse

Chapitre II:

Amro K, Daniel J, Clermont G, Bsaibess T, Pucheault M, Genin E, Vaultier M and Blanchard-Desce M 2014 New route towards fluorescent organic nanoparticles with red-shifted emission and increased colloidal stability *Tetrahedron* **70** 1903-09.

Chapitre III:

Daniel J, Bondu F, Adamietz F, Blanchard-Desce M, Rodriguez V 2015 Interfacial Organization in Dipolar Dyes-based Organic Nanoparticles probed by Second-Harmonic Scattering *ACS Photonics* **2** 1209-16 .

Chapitre IV:

Genin E, Gao Z, Varela J A, Daniel J, Bsaibess T, Gosse I, Groc L, Cognet L and Blanchard-Desce M 2014 "Hyper-bright" Near-Infrared Emitting Fluorescent Organic Nanoparticles for Single Particle Tracking *Adv. Mater.*, **26** 2258-61.

Chapitre VII:

Daniel J, Godin G A, Clermont G, Lounis B, Cognet L, Blanchard-Desce M 2015 NIR-emitting molecular-based nanoparticles as new two-photon absorbing nanotools for single particle tracking *Proc. SPIE9523* DOI:10.1117/12.2189638.

Chapitre VIII:

Daniel J, Godin G A, Palayret M, Lounis B, Cognet L, Blanchard-Desce M 2015 Innovative molecular-based fluorescent nanoparticles for multicolor single particle tracking in cells *J. Phys. D: Appl. Phys.* – Révisé.

Autres:

Cueto Diaz E J, Picard S, Chevasson V, Daniel J, Hugues V, Mongin O, Genin E and Blanchard-Desce M 2015 Cooperative Dyads for Two-Photon Uncaging *Org. Lett.* **17** 102-5.

Bourdenx M, Daniel J, Genin E, Soria F, Blanchard-Desce M, Bezard E, Dehay B 2015 Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implication for Parkinson's and other lysosomal-related diseases *Autophagy* – Accepté.

Daniel J, Mastrodonato C, Sourdon A, Clermont G, Vabre J-M, Goudeau B, Voldoire H, Arbault S, Mongin O, Blanchard-Desce M 2015 pKa tuning in quadrupolar-type two-photon ratiometric fluorescent membrane probes *ChemComm* **51** 15245-248.

Verlhac J-B, Daniel J, Pagano P, Clermont G, Blanchard-Desce M 2015 Enhanced two-photon brightness in molecular-based organic nanoparticles built from articulated-dipoles *Comptes rendus Chimie* – Accepté.

Abréviations

À : accepteur

ADP/TPA : absorption a deux photons

CCD : capteur photographique

$CHCl_3$: chloroforme

D : donneur

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DCM : dichlorométhane

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DR : taux de dépolarisation

EFISHG : génération de second harmonique induite par un champ électrique

EPR : perméabilité et rétention améliorées

EtOH : éthanol

FITC : fluorescéine isothiocyanate

FONs : nanoparticules organiques fluorescentes

FONs@M-2005: nanoparticules organiques fluorescentes enrobées de polymère M-2005

FWHM : largeur à mi-hauteur

GFP : protéine fluorescente verte

GM : Goeppert-Mayer

HRS : diffusion hyper-Rayleigh

ICT : transfert de charge intramoléculaire

IR/NIR : infrarouge / proche infrarouge

LM : Lippert-Mataga

LE : excitation locale

MeCN : acétonitrile

MeOH : méthanol

NEt_3 : triéthylamine

NPs : nanoparticules

ONL : optique non linéaire

PEG : polyéthylène glycol

PBS : tampon phosphate salin

QDs : quantum dots

RMN : résonnance magnétique nucléaire

SHG : génération de second harmonique

SHS : diffusion de second harmonique

SPT : suivie de particule unique

TEM : microscopie électronique à transmission

THF : tétrahydrofuran

TPEF : fluorescence par excitation à deux photons

UV/UVA : ultraviolet / ultraviolet de catégorie A (λ =400-315 nm)

Grandeurs et unités photophysiques

Déplacement de Stokes : écart énergétique entre le maximum d'absorption et d'émission exprimé en cm^{-1}.

λ_{Abs} : longueur d'onde d'absorption, s'exprime en nm.

λ_{Em} : longueur d'onde d'émission, s'exprime en nm.

ε : coefficient d'extinction molaire, s'exprime en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.

σ_2 : section efficace d'absorption à deux photons, s'exprime en GM.

Φ_F : rendement quantique de fluorescence, sans unité.

$\varepsilon\Phi_F$: brillance à un photon, s'exprime en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.

$\sigma_2\Phi_F$: brillance à deux photons, s'exprime en GM.

τ : temps de vie de fluorescence, s'exprime en s.

D_h : diamètre hydrodynamique des nanoparticules, s'exprime en nm.

D_{TEM} : diamètre sec des nanoparticules, s'exprime en nm.

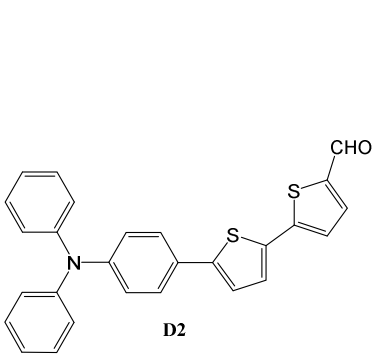
ζ : potentiel de surface, s'exprime en mV.

β : hyperpolarisabilité du premier ordre, s'exprime en esu.

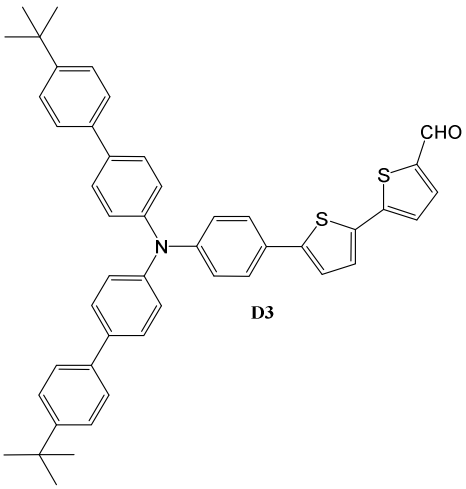
ρ : facteur d'anisotropie non linéaire, sans unité.

Annexe

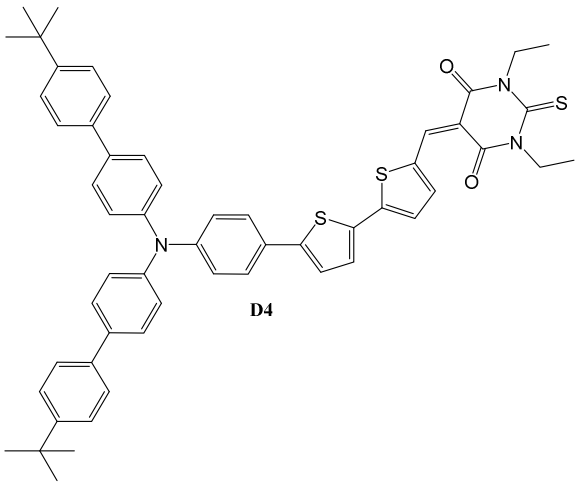
1. Chromophores dipolaires :



D2

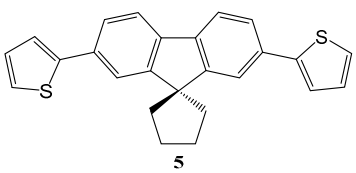


D3

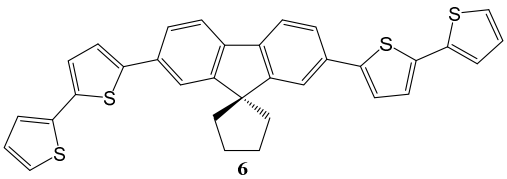


D4

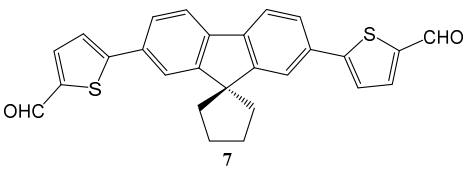
2. Chromophores quadripolaires :



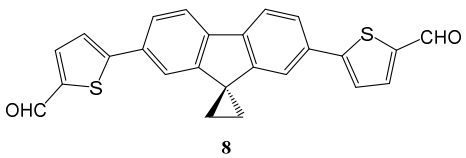
5



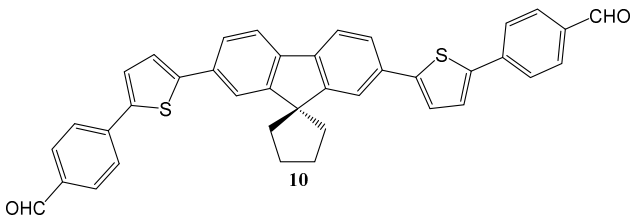
6



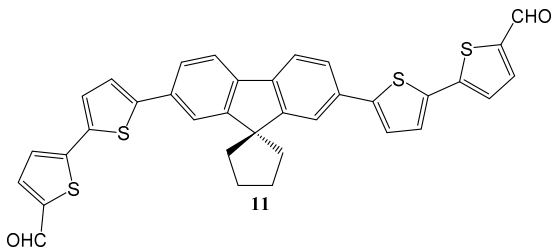
7



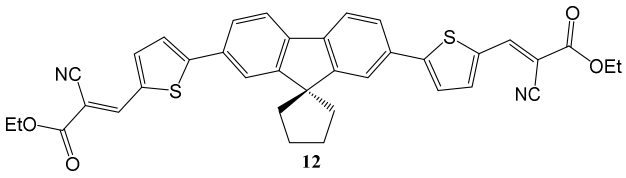
8



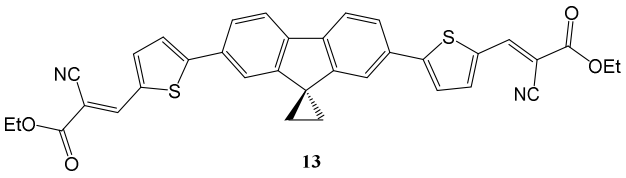
10



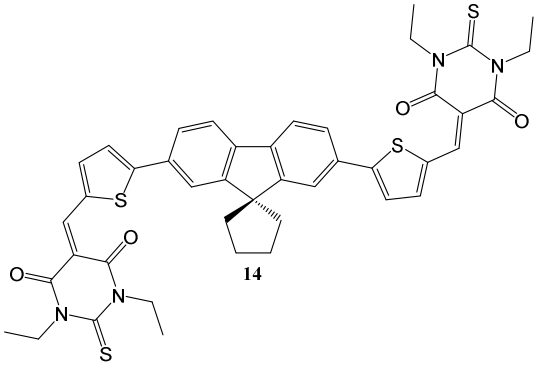
11



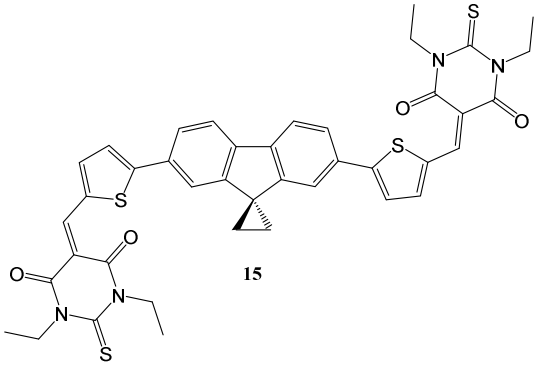
12



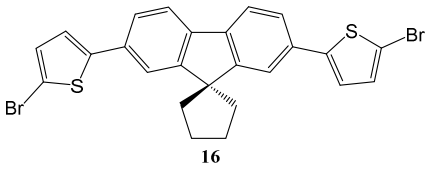
13



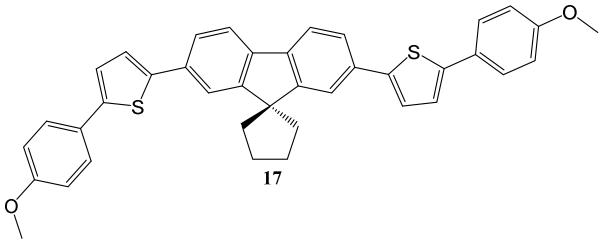
14



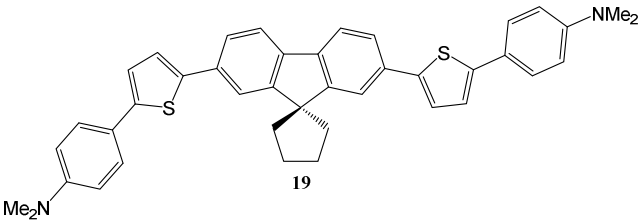
15



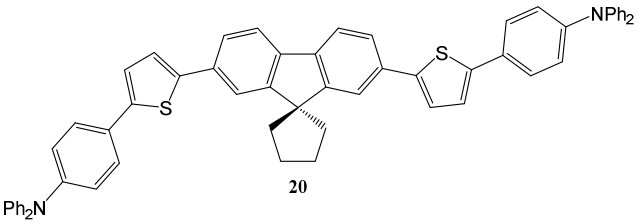
16



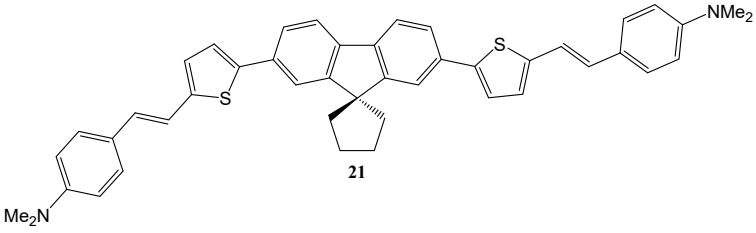
17



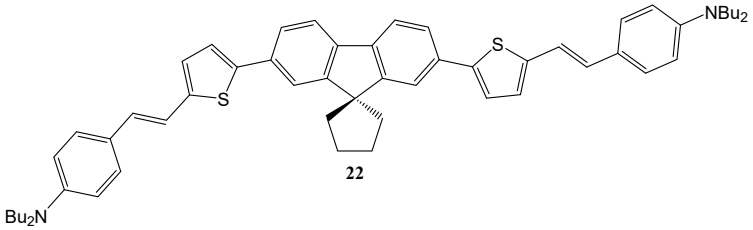
19



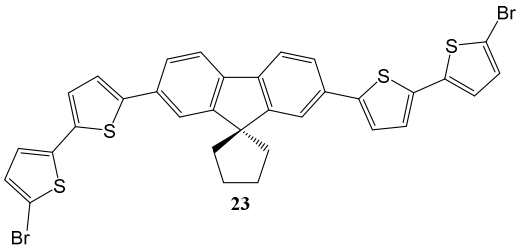
20



21



22



23

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Détails expérimentaux

1.1 Synthèse

Les solvants organiques utilisés sont purifiés par distillation avant leur utilisation, en utilisant le desséchant approprié.[1] Excepté pour le NBS qui est recristallisé dans l'eau ainsi que le pinacol qui est sublimé, les réactifs commerciaux sont utilisés sans purification. Les réactions pallado-catalysées sont sensible à la présence d'oxygène, le montage réactionnel est donc purgé à l'argon, puis dans certains cas, de l'argon est mis à buller dans le solvant. Les condensations de Knoevenagel sont sensibles à la présence d'eau, pour cette raison, le montage est surmonté d'une garde $CaCl_2$. Les réactions chimiques sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des feuilles d'aluminium préenduites de gel de silice (60F-254). Les purifications par colonne de chromatographie sont réalisées avec du gel de silice Si 60 (40-63 µm, 230-400 mesh).

Excepté pour le composé **20** (pour lequel la dissolution se fait à 90 °C), les purifications par recristallisation sont effectuées par dissolution à reflux de solvant du brut, puis par filtration de la liqueur sur du papier Joseph suivi d'un retour lent à température ambiante de la liqueur. Les produits issus de condensation de Knoevenagel sont concentrés à chaud si nécessaire puis le précipité est collecté à température ambiante par simple filtration.

1.2 Caractérisation des chromophores

Les points de fusion sont déterminés par banc Kofler, ou par DSC (Mettler Toledo DSC 1). Les spectres infrarouges sont mesurés sur un Perkin Elmer Spectrum 100 Optica. Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C sont mesurés sur un Bruker Avance III 200 à 200 MHz et 50 MHz respectivement, sur un Bruker Avance I 300 à 300 MHz et 75 MHz respectivement ou sur un Bruker Avance II 400 MHz et 100 MHz respectivement. Le spectre RMN ^{31}P est mesuré sur un Bruker Avance I 300 à 150 MHz. Les déplacements chimiques (δ) ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P sont donnés en ppm et les constantes de couplages (J) en Hz. Les déplacements chimiques sont centrés sur la valeur en ppm du solvant deutéré, excepté pour le phosphore qui est centré par

rapport à l'acide phosphorique 85% (référence externe). Les mesures de masse haute et basse résolution ont été effectuées au Centre Régional de Mesures de l'Ouest (CRMPO à Rennes) ou au CESAMO (Bordeaux) sur QTOF II, MicroTOF-Q II ou QStar Elite. Les analyses élémentaires ont été mesurées au CESAMO ou à l'ICSN-CNRS (Gif-sur-Yvette). Les structures cristallines ont été mesurées à CDIFX-ISCR (Rennes) sur un AXS-Bruker APEXII, au CESAMO sur un Bruker APEX 2 DUO, ou bien à l'IECB (Bordeaux) sur un FR-X Rigaku ou un R-Axis Rapide Rigaku MSC.

1.3 Caractérisation des nanoparticules

Les mesures de taille par microscopie électronique (TEM) ont été effectuées sur la plateforme de service du BIC (Bordeaux) sur un Hitachi H7650 selon le protocole suivant : une grille de cuivre dont la surface est recouverte par une membrane de carbone est chargée positivement par l'utilisation d'un plasma (technique dite de «Glow discharge »). Cette polarisation négative de la surface de la grille doit permettre aux nanoparticules de mieux adhérer sur celle-ci. Une goutte de solution aqueuse de nanoparticule est déposée sur la grille plusieurs minutes, puis l'excédent de solutions est éliminé par capillarité en utilisant un papier absorbant. L'absence d'atome lourd dans les nanoparticules nécessite l'utilisation d'un agent de contraste pour observer les nanoparticules organiques par TEM.

Pour cette raison, une goutte d'acétate d'uranyle est déposée sur la grille contenant les nanoparticules, puis après quelques minutes, le surplus de solutions est éliminé par capillarité en utilisant un papier absorbant. L'observation est effectuée une fois la grille « sèche ».

Les mesures de DLS (Dynamic Light Scaterring) sont effectuées sur un Horiba SZ-100Z en collectant la lumière diffusée à 173°. Les mesures sont effectuées à 25°C, sur des solutions filtrées si nécessaire afin de réduire la présence de poussière micro- ou submicrométrique parasitant la diffusion du laser (λ = 532 nm). Les diamètres hydrodynamiques (D_h) sont calculés via les coefficients de diffusion selon l'équation de Stokes-Einstein. Les corrélogrammes sont obtenus en utilisant le logiciel fourni par le fabricant (SZ-100). Les mesures de potentiel Zeta sont effectuées sur le même appareillage.

1.4 Photophysique

Toutes les mesures photophysiques en solution organique ont été effectuées avec des solutions fraîchement préparées, équilibrées avec l'air en utilisant des solvants de qualité spectroscopique.

Les spectres UV-visible sont enregistrés à 22°C sur un spectromètre JASCO V-670 en utilisant des cellules en quartz avec un trajet optique de 1 cm. Les spectres de fluorescence sont enregistrés sur un spectromètre FluorLog ou FluoroMax, en utilisant des solutions diluées (A < 0.1 ; C ~10^{-6} M) afin d'éviter les phénomènes de filtre interne. Les spectres d'émission obtenus en excitant à λ_{abs}^{max} et sont corrigés. Les rendements quantiques de fluorescence sont calculés en utilisant comme standard le bisulfate de quinine dans H_2SO_4 1N (Φ_F = 0.546 à λ_{ex} = 347 nm), la fluorescéine dans NaOH 1N (Φ_F = 0.9 à λ_{ex} = 474 nm), la rhodamine-6G dans l'éthanol (Φ_F = 0.94 à λ_{ex} = 488 nm), le crésyl violet dans le méthanol (Φ_F = 0.54 à λ_{ex} 570 nm) ou l'indocyanine green dans le DMSO (Φ_F = 0.11 à λ_{ex} = 678 nm) selon l'équation 1.

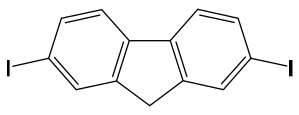
$$\Phi_F = \Phi_{FR} \times \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_{Exc})}}{1 - 10^{-A(\lambda_{Exc})}} \times \frac{\int_0^\infty I_f(\lambda_{Exc}, \lambda_f)\, d\lambda_f}{\int_0^\infty I_{fR}(\lambda_{Exc}, \lambda_f)\, d\lambda_f}$$

Équation 1. Calcul du rendement quantique de fluorescence.

Les mesures de temps de vie de fluorescence sont effectuées par la méthode de comptage du premier photon (TCSPC) en utilisant une nanoLED (370, 455 ou 545 nm) comme source d'excitation monochromatique. La diffusion de la lumière par une suspension de Ludox® est utilisée comme référence. Le calcul des temps de vie se fait par une courbe de reconvolution des déclins de fluorescence, la reconvolution est jugée acceptable si le facteur de corrélation est faible (χ^2 < 1.1).

2. Synthèse des fluorophores quadripolaires

2,7-Diiodo-9H-fluorène (**2**) :



2

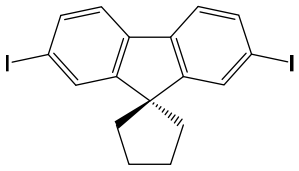
Mw = 418.02 g.mol^{-1}

Dans un bicol de 1L, surmonté d'un réfrigérant, on dissout du fluorène **1** (20 g, 120.0 mmol) dans un mélange acide acétique/eau/acide sulfurique (300.0 :7.0 :2.8, 309.8 mL). Le mélange est chauffé à 75°C puis de l'acide periodique (7 g, 30.7 mmol) et de l'iode broyé (16 g, 63.0 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 1 h à 75°C puis un nouvel ajout d'acide periodique (7 g, 30.7 mmol) et de l'iode broyé (16 g, 63.0 mmol) est effectué. La solution est de nouveau agité pendant 1 h à 65°C puis laissée refroidir à température ambiante. Une fois refroidi, le pH est ajusté à ~7 par l'ajout d'une solution aqueuse de $NaHCO_3$ par petites quantités. Le composé **2** est extrait par du dichlorométhane, puis la phase organique est lavée abondamment avec du thiosulfate de sodium. Une fois les phases organiques séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées sur évaporateur rotatif, le brut est recristallisé dans de l'heptane pour obtenir le composé **2**[2] pur (42.6 g, 85%).

Aspect : poudre jaune pâle

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) : δ 7.88 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 0.8 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H).

2',7'-Diiodospiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**3**) :



3
Mw = 472.11 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 250 mL, on dissout du KOH (26.81 g, 477.81 mmol) dans de l'eau (26.8 mL). À cette solution, sont ajoutés du *n*Bu4NBr (0.21 g, 0.65 mmol) et du 1,4-dibromobutane (12.0 mL, 100.60 mmol), puis le mélange est agité à 75°C pendant 30 minutes. Une solution de **2** (4.00 g, 9.57 mmol) dans le toluène (26.0 mL) est ajoutée puis le mélange est agité de nouveau à 75°C pendant 2 h. Une fois le mélange biphasique revenu à température ambiante, de l'eau est ajoutée puis le composé **3** est extrait au dichlorométhane. La phase organique est lavée trois fois avec de l'eau, puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée sur évaporateur rotatif. Le brut est recristallisé dans de l'heptane pour obtenir le composé **3** pur (3.62 g, 80%).

Aspect : aiguilles blanchâtres

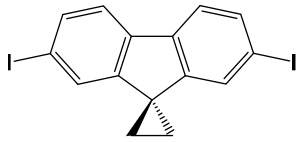
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.73 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 7.64 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.07 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 156.1, 138.2, 136.0, 132.3, 121.5, 93.4, 57.8, 39.7, 27.1.

HRMS (ESI/ASAP) : m/z 471.9185 calculé pour $C_{17}H_{14}I_2$ (M^+), trouvé 471.9192.

Point de fusion : 172°C.

2',7'-Diiodospiro[cyclopropyl-1,9'-fluorene] (**4**) :



4

Mw = 444.05 g.mol^{-1}

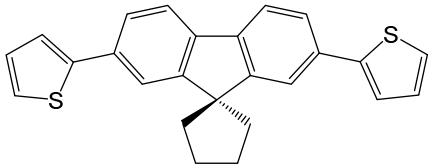
Dans un ballon de 250 mL, **2** (2.10 g, 5.0 mmol) est dissous dans du DMSO (67 mL), puis du 1,2-dibromoéthane (4.77 g, 25.4 mmol) et du *n*Bu4NBr (0.08 g, 0.2 mmol) sont ajoutés. Sous agitation et goutte à goutte, une solution concentrée de KOH (50%, 10 mL) est additionnée. Le mélange est agité à 36°C pendant 15 h, puis de l'eau est ajoutée. La phase organique est extraite au dichlorométhane, puis lavée à l'eau trois fois, séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur une mince couche de silice puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est recristallisé dans de l'heptane pour obtenir **4**[3] pur (1.18 g, 53%).

Aspect : poudre jaune

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.67 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 1.73 (s, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 149.9, 138.4, 135.0, 127.9, 121.6, 92.4, 29.1, 18.8.

2',7'-Di(2-thienyl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**5**):



5

Mw = 384.56 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 100 mL, une suspension contenant des copeaux de magnésium (360 mg, 14.8 mmol) et un cristal d'iode dans le THF (50.0 mL) est refroidie à -40°C. Une fois la suspension refroidie, du 2-bromothiophène (1.4 mL, 14.9 mmol) est ajoutée goutte à goutte sous agitation à -40°C sous argon. Une fois l'adition terminée, on laisse la solution revenir à température ambiante sous agitation jusqu'à complète consommation du magnésium (~1 h30). Dans un ballon de 100 mL sont ajoutés le composé **3** (1.55 g, 3.3 mmol) et du $PdCl_2$dppf (90 mg, 0.1 mmol). Une fois surmontée d'un réfrigérant et purgé à l'argon, la suspension de magnésien est additionnée dans le ballon contenant les réactifs à l'aide d'une canule. Quand l'adition est terminée, le mélange réactionnel est agité à reflux pendant deux jours. Une fois la réaction terminée, de la glace est ajoutée, puis le brut est extrait avec de l'éther diéthylique (4x50 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, puis filtrée sur une fine couche de silice puis évaporée au rotavapeur rotatif. Le brut est recristallisé dans l'heptane pour obtenir **5**[4] pur (943 mg, 75%).

Aspect : cristaux incolores

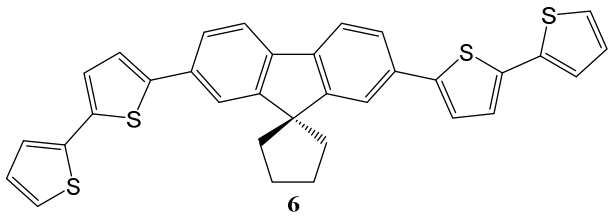
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.68 (d, *J* = 7.9Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 7.60 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 3.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, 2H), 7.30 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 2H), 7.11 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 3.6 Hz, 2H), 2.19 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 155.4, 145.2, 138.7, 133.9, 128.2, 125.1, 124.7, 123.1, 120.6, 120.1, 57.9, 40.0, 27.2.

Point de fusion : 196°C.

Analyse élémentaire pour $C_{25}H_{20}O_2S_2$ (384.56 g/mol) : % théorique : C, 78.08;H, 5.24. % expérimental C, 77.42; H, 5.19.

2',7'-Bis([2,2'-bithiophen]-5-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**6**):



6

Mw = 548.80 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 100 mL, sont mélangés **3** (441 mg, 0.93 mmol), du $PdCl_2$dppf (58 mg, 0.07 mmol), du 2-[2,2'-bithiophène]-5-yl-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (563 mg, 193 mmol) et K_2CO_3 (1.30 g, 9.43 mmol). Du toluène (20 mL) ainsi que du méthanol (10 mL) sont ajoutés, puis la solution est dégazée avec de l'argon pendant 30 minutes. Le mélange est agité à 75 °C pendant la nuit, puis une fois la réaction terminée, la solution refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, puis le brut est extrait au dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4, celle-ci est filtrée sur une fine couche de silice puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est recristallisé dans l'heptane pour obtenir **6** pur (495 mg, 95%).

Aspect : poudre jaune.

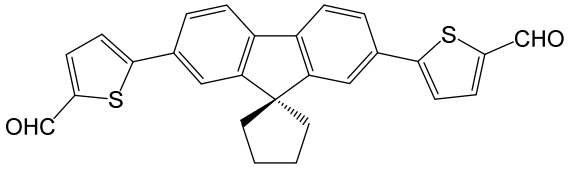
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.4 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.04 (dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 3.8 Hz, 2H), 2.20 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 155.4, 143.8, 138.7, 137.6, 136.6, 133.5, 128.0, 124.8, 124.7, 124.5, 123.7, 123.7, 120.2, 120.1, 57.9, 40.0, 27.2.

HRMS (Q-TOF 2) : m/z 549.08391 calculé pour $C_{33}H_{25}S_4$ ($[M+H]^+$), trouvé 549.0840.

Point de fusion : 191°C.

2',7'-Bis(5-formyl-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**7**):



7

Mw = 440.58 g.mol^{-1}

Méthode 1: double formylation de **5** :

Dans un ballon de 10 mL, sec purgé à l'argon, **5** (144 mg, 0.37 mmol) est dissous dans du 1,2-dichloroéthane (4.0 mL) puis du $POCl_3$ (70 µL, 0.73 mmol) suivi de DMF (60 µL, 0.78 mmol) sont additionnés. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h30, puis de l'eau est ajoutée suivie de dichlorométhane. La phase organique est récoltée puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice, éluant heptane/DCM (1/1) puis (1/3). Après évaporation du solvant, le composé **7** est obtenu pur (6 mg, 4%).

Méthode 2: couplage de Suzuki-Miyaura :

Dans un ballon de 100 mL, sont mélangés **3** (512 mg, 1.08 mmol), du $PdCl_2$dppf (14 mg, 0.02 mmol), de l'acide 5-formyl-2-thienyl boronique (634 mg, 4.06 mmol) et K_2CO_3 (1.46 g, 10.56 mmol). Du toluène (18 mL) ainsi que du méthanol (12 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 30 minutes. Le mélange est agité à 75 °C pendant la nuit, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, puis le brut est extrait à l'éther diéthylique. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4, celle-ci est filtrée sur une fine couche de silice puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est cristallisé dans l'heptane pour obtenir **7** pur (449 mg, 94%).

Aspect : cristaux jaunes.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 9.91 (s, 2H), 7.77 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.69 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 2.20 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 182.7, 155.7, 154.7, 142.3, 140.0, 137.4, 132.8, 125.6, 124.0, 121.0, 50.0, 39.8, 27.0.

FTIR (cm^{-1}) : 1650 (ν_{CHO})

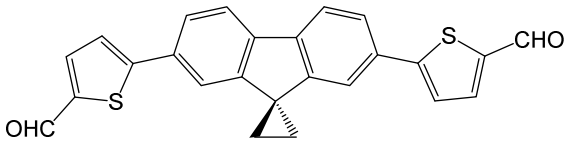
HRMS (ESI/ASAP) : m/z 441.0983 calculé pour $C_{27}H_{21}O_2S_2$ ($[M+H]^+$) trouvé 441.0984.

Point de fusion : > 265°C.

Analyse élémentaire pour $C_{27}H_{21}O_2S_2$ (440.58 g/mol) : % théorique : C, 73.51;H, 4.58. % expérimental C, 73.24; H, 4.47.

Structure cristalline : obtenue

2',7'-Bis(5-formyl-thiophen-2-yl)spiro[cyclopropane-1,9'-fluorene] (**8**):



8

Mw = 412.52 g.mol^{-1}

Dans un schlenk, sont mélangés **4** (500 mg, 1.12 mmol), du $PdCl_2$dppf (28 mg, 0.03 mmol), de l'acide 5-formyl-2-thienyl boronique (351 mg, 2.25 mmol) et K_2CO_3 (768 mg, 5.55 mmol). Du toluène (10 mL) ainsi que du méthanol (5 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 30 minutes. Le mélange est agité à 75 °C pendant 9 h, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, puis le brut est extrait au dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4, celle-ci est évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice avec un gradient d'éluant (DCM/acétate d'éthyle, 1:0 jusqu'à 0:1) pour obtenir **8** pur (115 mg, 25%).

Aspect : poudre orange.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) : δ 9.90 (s, 2H), 7.88 (m, 2H), 7.75 (m, 4H), 7.45 (s, 2H), 7.33 (s, 2H), 1.87 (s, 4H).

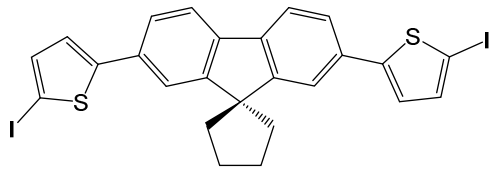
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 182.7, 154.6, 149.6, 142.3, 140.1, 137.4, 132.2, 124.9, 124.1, 121.0, 116.6, 29.8, 19.0.

FTIR (cm^{-1}) : 1651 (ν_{CHO})

HRMS (FD+) : m/z 412.05917 calculé pour $C_{25}H_{16}O_2S_2$ (M^+) trouvé 412.05971.

Structure cristalline : obtenue

2',7'-Bis(5-iodo-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**9**):



9

Mw = 636.35 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 10 mL, on dissout **5** (300 mg, 0.78 mmol) dans un mélange $CHCl_3$/$AcOH_{gl}$ (4 :1, 4mL). Puis du N-iodosuccinimide (369 mg, 1.64 mmol) est ajouté et immédiatement, le ballon est agité dans un bain à 90°C (déjà préchauffé) pendant 5 minutes exactement. Une fois la réaction terminée, le ballon est refroidi à température ambiante puis le chloroforme est évaporé par évaporateur rotatif. Le brut est trituré dans de l'acide acétique glacial puis filtré. Le résidu solide est lavé avec de l'éthanol pour obtenir **9** pur (506 mg, quant.).
Cette synthèse est inspirée d'un protocole expérimental décrit dans la littérature.[5]

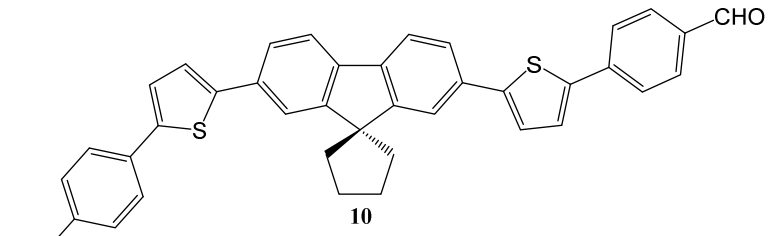
Aspect : Poudre jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 7.66 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 0.5 Hz, 2H), 7.55 (s, 2H), 7.50 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 2.17 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) : δ 155.5, 151.1, 139.0, 138.1, 133.2, 125.0, 124.6, 120.4, 120.3, 72.2, 57.9, 40.0, 27.2.

HRMS (FD+) : m/z 635.89393 calculé pour $C_{25}H_{18}I_2S_2$ (M^+) trouvé 635.89411.

2',7'-Bis[5-[4-(formyl)phenyl]-thiophen-2-yl]spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**10**):



10

Mw = 592.77 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 25 mL, sont mélangés **9** (151 mg, 0.24 mmol), du $PdCl_2$dppf (14 mg, 0.02 mmol), de l'acide 4-formylphenylboronique (74 mg, 0.50 mmol) et K_2CO_3 (463 mg, 3.35 mmol). Du toluène (5 mL) ainsi que du méthanol (3 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 15 minutes. Le mélange est agité à 74 °C pendant la nuit, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, suivie de dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4, celle-ci est filtrée sur une fine couche de silice puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice avec un gradient d'éluant (DCM/acétate d'éthyle, 1:0 jusqu'à 0:1) pour obtenir **10** pur (45 mg, 32%).

Aspect : poudre jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 10.0 (s, 2H), 7.81-7.91 (AA'BB', J_{AB} = 8.2 Hz, 8H), 7.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.69 (s, 2 H), 7,65 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 3.8 Hz, 2 H), 7.40 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 2.21 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 191.5, 155.6, 146.7, 141.6, 140.2, 139.1, 135.2, 133.5, 130.7, 126.3, 125.8, 125.0, 124.5, 120.4, 58.0, 40.1, 27.3

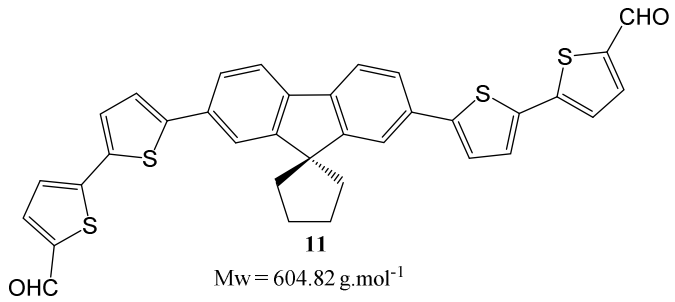
FTIR (cm^{-1}) : 1692 (ν_{CHO})

HRMS (FD+) : m/z 592.15307 calculé pour $C_{39}H_{28}O_2S_2$ (M^+) trouvé 592.15483.

Point de Fusion : 200°C (décomp.)

Structure cristalline : obtenue

2',7'-Bis(5'-formyl-[2,2'-bithiophen]-5-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**11**):



11

Mw = 604.82 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 50 mL, on mélange **3** (66.5 mg, 0.14 mmol), du $PdCl_2$dppf (9.0 mg, 0.01 mmol), de l'acide 5'-formyl-2,2'-bithiophène-5-boronique (71.4 mg, 0.14 mmol) et K_2CO_3 (173.9 mg, 1.26 mmol). Du toluène (4 mL) ainsi que du méthanol (2 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 30 minutes. Le mélange est agité à 75 °C pendant la nuit, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. Le brut est filtré sur une fine couche de silice puis de l'éther diéthylique est ajouté (20 mL). Le précipité est filtré puis lavé par de l'éther diéthylique, puis du pentane. Le résidu est séché pour obtenir **11** pur (38 mg, 45%).

Aspect : poudre orange.

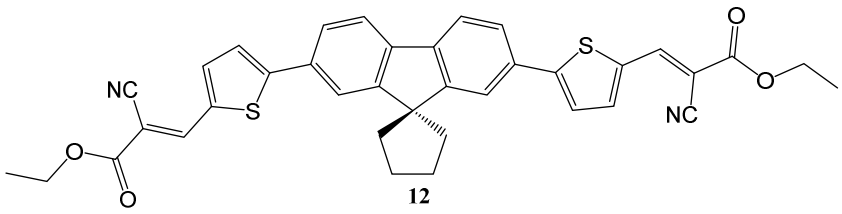
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 9.88 (s, 2H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 7.66 (s, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.34-7.37 (AB, J_{AB} = 3.9 Hz, 4H), 7.30 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 2.20 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 182.6, 155.6, 147.2, 146.8, 141.7, 139.3, 137.5, 135.1, 133.2, 127.4, 125.1, 125.0, 124.3, 124.1, 120.4, 40.0, 27.2.

FTIR (cm^{-1}) : 1649 (ν_{CHO})

HRMS (FD+) : m/z 604.06591calculé pour $C_{35}H_{24}O_2S_4$ (M^+) trouvé 604.06621.

2',7'-Bis(ethyl 2-cyano-3-(5-thienyl-2-yl) acrylate)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**12**):



12

Mw = 630.78 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 100 mL, surmonté d'une garde au $CaCl_2$, sont mélangés **7** (71.4 mg, 0.16 mmol), du cyano acétate d'éthyle (45.4 mg, 0.40 mmol) et un grain de β-alanine (< 1 mg). De l'éthanol (54 mL) et du toluène (10 mL) sont ajoutés et la solution est portée à reflux pendant deux jours. La solution est concentrée par distillation jusqu'à formation d'un précipité orange. Le ballon est refroidi à température ambiante puis le précipité est filtré, lavé à l'éthanol puis séché pour obtenir **12** pur (65.0 mg, 64%).

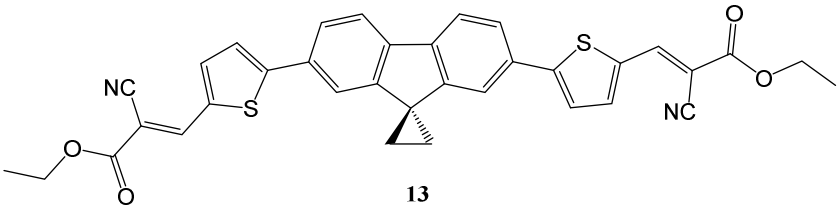
Aspect : poudre orange.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 8.31 (s, 2H), 7.77 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.72 (s, 4 H), 7.48 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.20 (m, 8H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

FTIR (cm^{-1}) : 2956 (ν_{Csp2-H}), 2206 (ν_{CN}), 1712 ($\nu_{C=O}$), 1576 ($\nu_{C=C}$), 1215 (ν_{C-O}), 805 (δ_{Csp2-H}).

HRMS (FD) : m/z 630.16470 calculé pour $C_{37}H_{30}O_4S_2$ (M^+) trouvé 630.16560.

2',7'-Bis(ethyl 2-cyano-3-(5-thienyl-2-yl) acrylate)spiro[cyclopropane-1,9'-fluorene] (**13**):



13

Mw = 602.72 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 10 mL, surmonté d'une garde au $CaCl_2$, sont mélangés **8** (20.0 mg, 48.5 µmol), du cyano acétate d'éthyle (16.6 mg, 146.8 µmol) et un grain de β–alanine (< 1 mg). De l'éthanol (1 mL) est ajouté et la solution est portée à reflux pendant deux jours. Le ballon est refroidi à température ambiante puis le précipité orange est filtré, lavé à l'éthanol puis séché pour obtenir **13** pur (21.0 mg, 72%).

Aspect : poudre orange

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 8.31l (s, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.74 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.6 Hz, 4 H), 7.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 4 H), 1.91 (s, 4H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

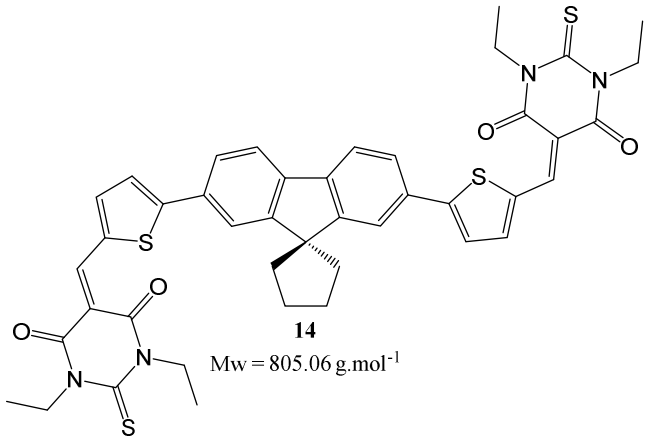
RMN ^{13}C : du fait de la très mauvaise solubilité du composé, la RMN du carbone n'a pas pu être réalisée pour ce composé.

FTIR (cm^{-1}) : 2970 (ν_{Csp2-H}), 2206 (ν_{CN}), 1702 ($\nu_{C=O}$), 1576 ($\nu_{C=C}$), 1201 (ν_{C-O}), 799 (δ_{Csp2-H}).

HRMS (FD+) : m/z 602.13340 calculé pour $C_{35}H_{26}O_4S_2$ (M^+) trouvé 602.13434.

Structure cristalline : obtenue

4,6(1*H*,5*H*)-Pyrimidinedione, 5,5'-[spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene-2,7'-diylbis(5,2-thiophenediylmethylidyne)]bis[1,3-diethyldihydro-2-thioxo- (**14**):



14

Mw = 805.06 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 50 mL, surmonté d'une garde au $CaCl_2$, sont mélangés **7** (110.8 mg, 0.25 mmol), de l'acide 1,3 diéthylthiobarbiturique (105.8 mg, 0.53 mmol) et un grain de β-alanine (< 1 mg). De l'éthanol (1.2 mL) et du toluène (20.0 mL) sont ajoutés et la solution est portée à reflux pendant deux jours. La solution est concentrée par distillation jusqu'à formation d'un précipité rouge. Le ballon est refroidi à température ambiante puis le précipité est filtré, lavé à l'éthanol puis séché pour obtenir **14** pur (166.0 mg, 83%).

Aspect : poudre rouge.

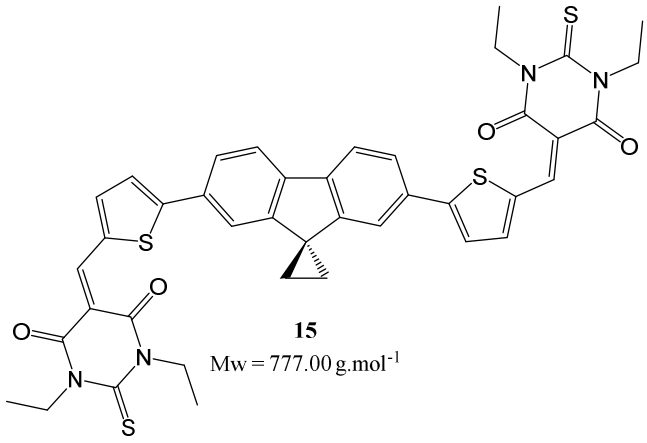
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 8.69 (s, 2H), 7.92 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.65 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 4.60 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.26 (m, 8H), 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

FTIR (cm^{-1}) : 2932 (ν_{Csp2-H}), 1647 ($\nu_{C=O}$), 1556 ($\nu_{C=C}$), 794 (δ_{Csp2-H}).

HRMS (FD+) : m/z 804.19324 calculé pour $C_{43}H_{40}O_4S_4$ (M^+) trouvé 804.19347.

Structure cristalline : obtenue

4,6(1*H*,5*H*)-Pyrimidinedione, 5,5'-[spiro[cyclopropane-1,9'-fluorene-2,7'-diylbis(5,2-thiophenediylmethylidyne)]bis[1,3-diethyldihydro-2-thioxo- (**15**):



15

Mw = 777.00 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 10 mL, surmonté d'une garde au $CaCl_2$, sont mélangés **8** (20.0 mg, 48.5 µmol), de l'acide 1,3 diéthylthiobarbiturique (25.4 mg, 126.8 µmol) et un grain de β-alanine (< 1 mg). De l'éthanol (1 mL) est ajouté et la solution est portée à reflux pendant deux jours. Le ballon est refroidi à température ambiante puis le précipité noir est filtré, lavé à l'éthanol puis séché pour obtenir **15** pur (10.0 mg, 26%).

Aspect : poudre noire.

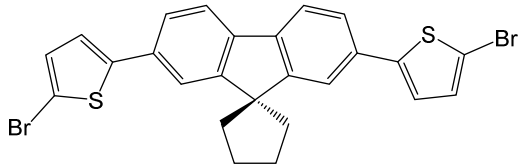
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 8.68 (s, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 7.48 (s, 2H), 4.62 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 4.61 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.96 (s, 4H), 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

RMN ^{13}C : du fait de la très mauvaise solubilité du composé, la RMN du carbone n'a pas pu être réalisée pour ce composé.

FTIR (cm^{-1}) : 2984 (ν_{Csp2-H}), 1657 ($\nu_{C=O}$), 1536 ($\nu_{C=C}$), 782 (δ_{Csp2-H}).

HRMS (FD) : m/z 776.1694 calculé pour $C_{41}H_{36}O_4S_4$ (M^+) trouvé 776.16265.

2',7'-Bis(5-bromo-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**16**):



16

Mw = 542.35 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 50 mL, le composé **5** (247 mg, 0.64 mmol) est dissous dans du THF (12.3 mL), suivi de l'ajout de *N*-bromosuccinimide (231 mg, 1.30 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 2 h30, puis de l'eau est ajoutée suivie de dichlorométhane. La phase organique est extraite, puis lavée avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$, puis de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est recristallisé dans l'heptane pour obtenir **16** pur (268 mg, 78%).

Aspect : cristaux marron

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.65 (d, *J* = 7.9Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.48 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 2.17 (m, 8H).

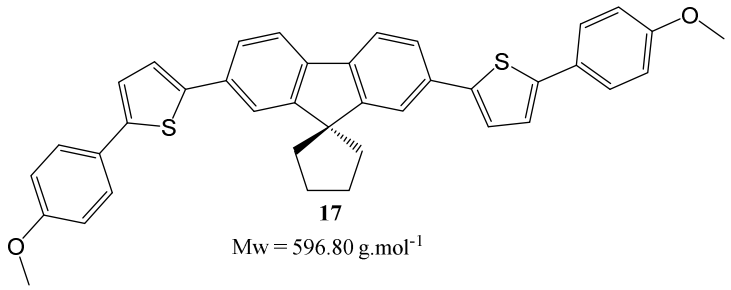
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 155.5, 146.5, 138.9, 133.2, 131.0, 124.8, 123.2, 120.3, 120.2, 111.3, 57.9, 40.0, 27.2

HRMS (Q-TOF2) : m/z 540.92949 calculé pour $C_{25}H_{19}Br_2S_2$ ([M+H$^+$]) trouvé 540.9295.

Point de fusion : 215 °C.

Structure cristalline : obtenue

2',7'-Bis(5-(4-methoxyphenyl)-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**17**):



17

Mw = 596.80 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 25 mL, on mélange **16** (150 mg, 0.28 mmol), du $PdCl_2dppf$ (12 mg, 0.01 mmol), de l'acide 4-méthoxyphenylboronique (165 mg, 1.09 mmol) et K_2CO_3 (386 mg, 2.79 mmol). Du toluène (5 mL) ainsi que du méthanol (3 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 15 minutes. Le mélange est agité à 74 °C pendant 20 h, puis une fois la réaction terminée, la solution est laissée refroidir à température ambiante. De l'eau est ajoutée, suivie de dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4, celle-ci est filtrée sur une fine couche de silice puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est recristallisé dans le chloroforme pour obtenir **17** pur (129 mg, 77%).

Aspect : cristaux jaunes

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.61 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 6.95-7.58 (AA'XX', JAX = 8.9 Hz, 8H), 3.86 (s, 6H), 2.21 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 159.4, 155.4, 143.3, 138.6, 133.8, 127.4, 127.0, 124.6, 123.9, 123.1, 120.1, 114.5, 57.9, 55.5, 40.0, 27.2

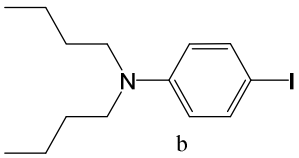
HRMS (Q-TOF2) : m/z 597.1922 calculé pour $C_{39}H_{33}O_2S_2$ ([M+H$^+$]) trouvé 597.1920.

Point de fusion : 182-240 °C.

Analyse élémentaire pour $C_{39}H_{32}O_2S_2$; 0.04 $CHCl_3$ (601.58 g/mol) : % théorique : C, 77.95; H, 5.37. % expérimental C, 77.92; H, 5.34.

Structure cristalline : obtenue

N, N-dibutyl-4-iodoaniline (b):



b

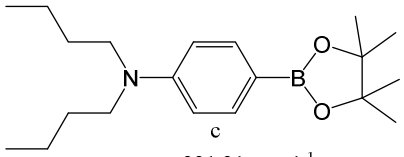
Mw = 331.24 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 1 L, de la N, N-dibutylaniline (6.65 g, 32.4 mmol) est ajoutée à une solution de $NaHCO_3$ 1N (50.0 mL). La solution est refroidie à 5°C puis une solution de diiode (8.26 g, 32.5 mmol) dans du dichlorométhane (350 mL) est ajoutée goutte-à-goutte pendant 1 h30. Une fois l'ajout terminé, le mélange est agité à température ambiante pendant 20 h, puis la phase organique est extraite. La phase organique est ensuite traitée avec une solution aqueuse de $Na_2S_2O_3$, lavée à l'eau puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice avec un comme éluant de l'heptane pur pour obtenir b pur (9.37 g, 87%).

Aspect : huile jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.42 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.43 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 3.25 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.55 (m, 4H), 1.35 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H).

N, N-dibutyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (c):



c

Mw = 331.31 g.mol^{-1}

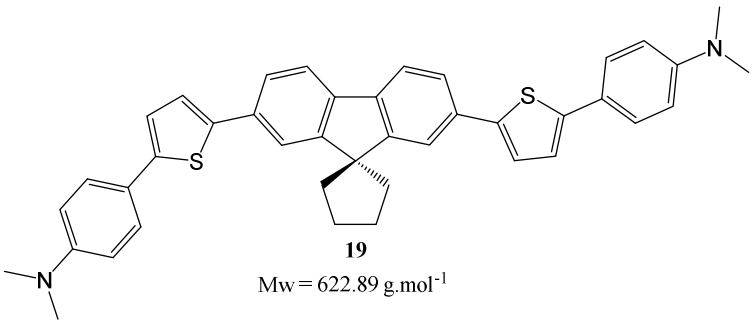
Dans un ballon de 10 mL, purgé à l'argon, sont mélangés dans l'ordre du $PdCl_2$dppp (19.2 mg, 0.03 mmol), b (360.3 mg, 1.09 mmol), du toluène (3.0 mL), de la triéthylamine (0.4 mL, 2.9 mmol) et du diisopropylamine borane (0.3 mL, 1.9 mmol). La solution est chauffée à 100°C dans un bain préalablement chauffé à 100°C pendant 2 h, puis 1 h à température ambiante. La solution est refroidie à 0°C, puis du méthanol (2.0 mL) est ajouté goutte à goutte. Une fois l'addition terminée, le mélange est agité pendant 1 h à température

ambiante. Les solvants sont évaporés par un évaporateur rotatif puis du pinacol (157 mg, 1.3 mmol) et du diéthyl éther (2.0 mL) sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant 16 h puis est filtrée sur célite. La solution est lavée par une solution de $CuCl_2$ (50 g/L), puis la phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée par un évaporateur rotatif afin d'obtenir c (361 mg, quant.) La pureté du produit est suffisante pour qu'il soit utilisé sans autres purifications.

Aspect : huile incolore.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.68 (s, 2H), 3.32 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.30 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 1.57 (m, 4H), 1.34 (m, 4H), 1.33 (s, 12H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 6H).

2',7'-Bis[5-(4-N, N'diméthylamino)phenyl]-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**19**):



19

Mw = 622.89 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 25 mL, on mélange **16** (33.5 mg, 62 µmol), du $PdCl_2(PPh_3)_2$ (8.0 mg, 9 µmol), de l'acide 4-(N, N'-diméthylamino)phenylboronique (30.5 mg, 185 µmol), de la triphénylphosphine (3.7 mg, 14 µmol) et K_2CO_3 (84.2 mg, 609 µmol). Du toluène (2 mL) ainsi que du méthanol (1 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 1 h. Le mélange est agité à 80 °C pendant 3 h30, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, suivie de dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée à l'eau, puis séchée sur $MgSO_4$, celle-ci est évaporée à l'évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (heptane/DCM, 1:0 jusqu'à 1:1) pour obtenir **19** pur (22.0 mg, 58%).

Aspect : poudre jaune.

RMN ^{1}H (CD_2Cl_2, 300 MHz) : δ 7.69 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.68 (s, 2H), 7.61 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 6.75-7.53 (AA'XX', JAX = 8.9 Hz, 8H), 2.99 (s, 12H), 2.22 (m, 8H).

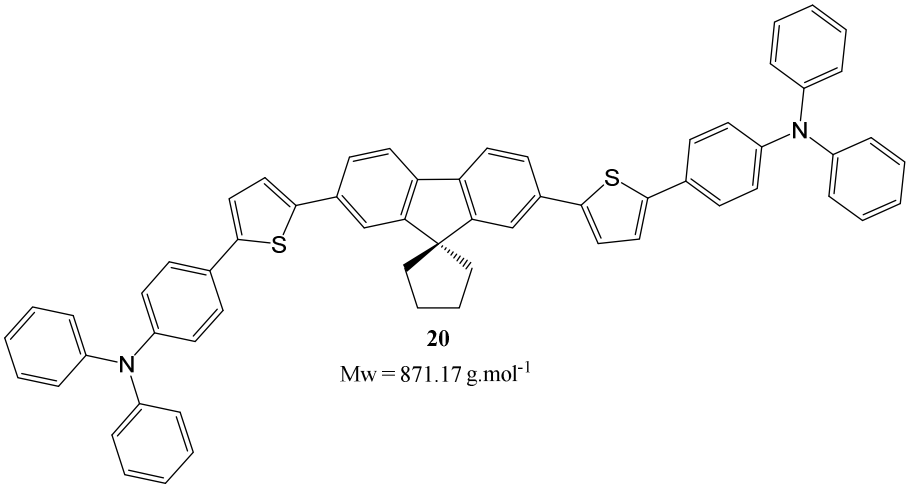
RMN ^{13}C : du fait de la très mauvaise solubilité du composé, la RMN du carbone n'a pas pu être réalisée pour ce composé.

HRMS (Q-TOF2) : m/z 622.24764 calculé pour $C_{41}H_{38}N_2S_2$ (M^+) trouvé 622.2491.

Point de fusion : > 260 °C.

Analyse élémentaire pour $C_{41}H_{38}N_2S_2$; 2.1 CH_2Cl_2 (801.24 g/mol) : % théorique : C, 64.61; H, 5.31. % expérimental C, 64.75; H, 5.41.

2',7'-Bis[5-(4-N, N'diphénylamino)phenyl]-thiophen-2-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**20**):



20

Mw = 871.17 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 25 mL, on mélange **9** (150 mg, 0.24 mmol), du $PdCl_2$dppf (10 mg, 0.01 mmol), de l'acide 4-(N, N'-diphénylamine)phenylboronique (170 mg, 0.60 mmol) et K_2CO_3 (326 mg, 2.4 mmol). Du toluène (5 mL) ainsi que du méthanol (3 mL) sont ajoutés, puis la solution est bullée sous argon pendant 15 minutes. Le mélange est agité à 74°C pendant une nuit, puis une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante. De l'eau est ajoutée, suivie de dichlorométhane. Une fois la phase organique lavée

à l'eau, puis séchée sur $MgSO_4$, celle-ci est filtrée sur une mince couche de silice, puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est recristallisé dans le DMSO à 90°C pour obtenir **20** pur (125.0 mg, 61%).

Aspect : poudre jaune.

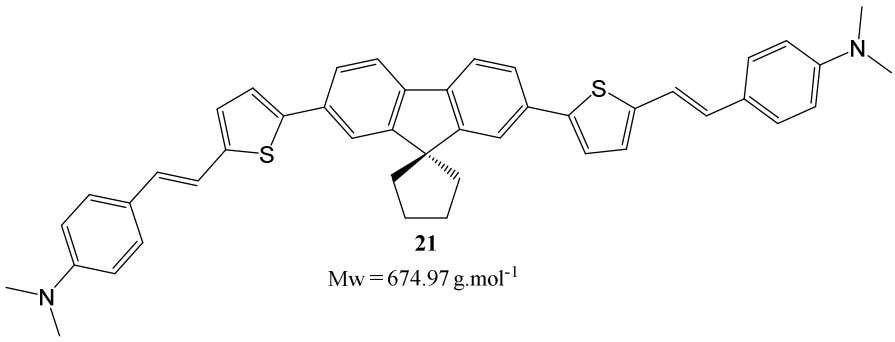
RMN ^{1}H (CD_2Cl_2, 200 MHz) : δ 7.69 (m, 6H), 7.53 (d, J = 8.7Hz, 4H), 7.29 (m, 12H), 7.10 (m, 16H), 2.22 (m, 8H).

RMN ^{13}C (CD_2Cl_2, 75 MHz): δ 156.0, 148.1, 148.1, 148.0, 143.8, 139.0, 134.2, 130.0, 130.0, 128.8, 126.8, 126.8, 125.2, 125.2, 125.0, 124.5, 124.1, 124.1, 123.8, 123.8, 120.6, 120.5, 58.4, 40.5, 27.6.

HRMS (FD) : m/z 870.31024 calculé pour $C_{61}H_{46}N_2S_2$ (M^+) trouvé 870.31108.

Structure cristalline : obtenue

2',7'-Bis[5-[(1*E*)-2-[4-(*N*,*N*'-dimethylamino)phenyl]ethenyl]-thiophen-2-yl]spiro[cyclo-pentane-1,9'-fluorene] (**21**):



21

Mw = 674.97 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 25 mL, sont dissous **7** (70 mg, 0.16 mmol) et de l'iodure de ([4-(N,N'-diméthylamino)phényl]méthyl)triphenyl phosphonium (226 mg, 0.43 mmol) dans du THF (8 mL), puis du NaH (37 mg, 0.62 mmol) est ajouté. La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 2 jours. De l'eau est ajoutée, suivie de dichlorométhane. La phase organique est récoltée, séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de en utilisant un gradient d'éluant (heptane/DCM, 1:0 jusqu'à 0:1), pour obtenir **21** pur (10 mg, 10%).

Aspect : poudre orange

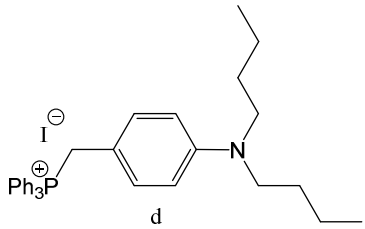
RMN ^{1}H (THFd_6, 300 MHz) : δ 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.33 (s, 2H), 7.08 (AB, J_{AB} = 15.7 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 6.90 (AB, J_{AB} = 15.7 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 2.97 (s, 12H), 2.20 (m, 8H).

RMN ^{13}C : du fait de la très mauvaise solubilité du composé, la RMN du carbone n'a pas pu être réalisée pour ce composé.

HRMS (FD) : m/z 674.27894 calculé pour for $C_{45}H_{42}N_2S_2$ (M^+) trouvé 674.27874.

Structure cristalline : obtenue

Phosphonium, iodo-([4-(N,N'-dibutylamino)phényl]méthyl)triphenyl (d):



d

Mw = 607.56 g.mol^{-1}

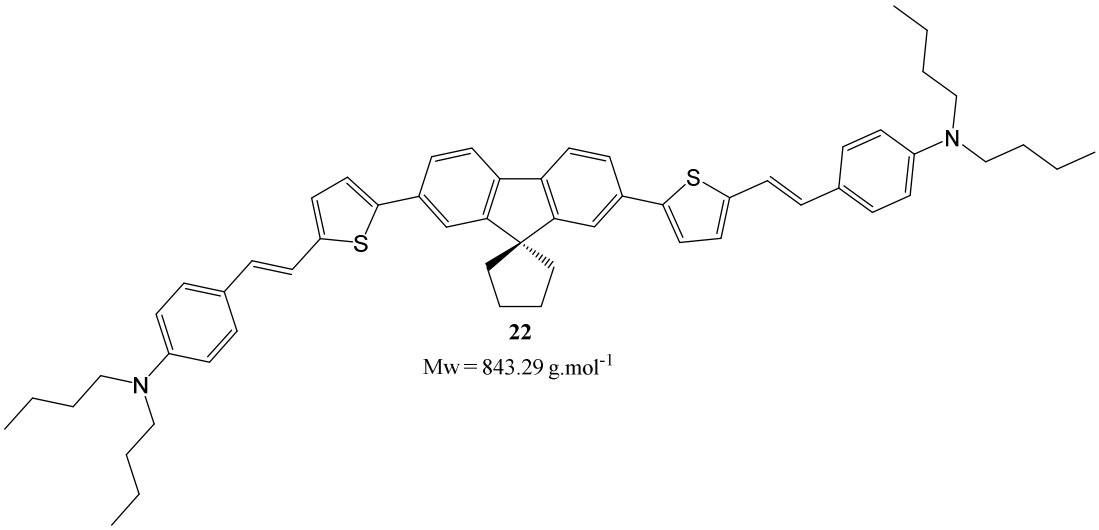
Dans un ballon de 100 mL, on dissout du paraformaldéhyde (490 mg, 5.4 mmol) et de la N,N'-dibutylaniline (3.74 g, 18.2 mmol) dans du chloroforme (29.0 mL). Du NaI (3.40 g, 22.7 mmol) est ensuite ajouté à la solution, puis de l'eau (1.3 mL), de l'acide acétique glacial (3.6 mL) et de la triphénylphosphine (4.88 g, 18.6 mmol). La solution est chauffée à reflux pendant 20 h, puis une fois la solution refroidit, une solution saturée de $NaHCO_3$ est ajoutée. Du dichlorométhane est additionné, puis la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'huile obtenue est triturée dans le l'éther diéthylique jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc. La suspension est filtrée sur Büchner, puis la poudre est lavée à l'éther, et enfin séchée pour obtenir d pur (5.83 g, 53%).

Aspect : poudre blanche

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.74 (m, 3H), 7.59 (m, 12H), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.77 (d, *J* = 12.7, 2H), 3.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.11 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.43 (m, 4H), 1.24 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 150 MHz) : δ 20.316.

2',7'-Bis[5-[(1*E*)-2-[4-(*N*,*N'*-dibutylamino)phenyl]ethenyl]-thiophen-2-yl]spiro[cyclo-pentane-1,9'-fluorene] (**22**):



22

Mw = 843.29 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 10 mL, on dissout **7** (149 mg, 0.34 mmol), du tert-butoxyde de potassium (149 mg, 1.33 mmol) et d (413 mg, 0.68 mmol) dans du dichlorométhane (4 mL). La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 24 h. La solution est filtrée sur célite puis évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le brut est purifié sur gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (heptane/DCM, 1:0 jusqu'à 2:1), pour obtenir **22** pur (202 mg, 71%).

Aspect : poudre jaune.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.60 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 6.87-7.00 (AB,

J_{AB} = 16.0 Hz, 4H), 6.62-7.32 (AA'XX', J_{AX} = 8.9 Hz, 8H), 3.30 (dd, *J* = 7.9 Hz, J = 7.3 Hz, 8H), 2.20 (m, 8H), 1.57 (m, 8H), 1.38 (m, 8H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 12H).

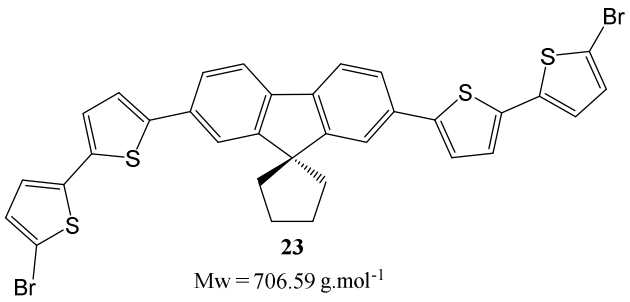
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 155.4, 148.0, 143.7, 142.1, 138.5, 133.9, 128.9, 127.8, 125.8, 124.6, 124.2, 123.5, 120.0, 117.2, 111.8, 57.7, 50.9, 40.1, 29.6, 27.5, 20.5, 14.2

HRMS (MicrO-Tof-Q II) : m/z 842.4662 calculé pour $C_{57}H_{66}N_2S_2$ (M^+) trouvé 842.4667.

Point de fusion : 181 °C.

Analyse élémentaire pour $C_{57}H_{66}N_2S_2$ (843.29 g/mol) : % théorique : C, 81.19; H, 7.89. % expérimental C, 81.11; H, 7.83.

2',7'-Bis(5'-bromo-[2,2'-bithiophen]-5-yl)spiro[cyclopentane-1,9'-fluorene] (**23**):



23

Mw = 706.59 g.mol^{-1}

Dans un ballon de 50 mL, le composé **6** (200 mg, 0.36 mmol) est solubilisé dans du THF (7 mL), puis on ajoute du *N*-bromosuccinimide (134 mg, 0.75 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit, puis de l'eau est additionnée suivie de dichlorométhane. La phase organique est extraite puis lavée avec une solution aqueuse de $NaHCO_3$, puis de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est lavé plusieurs fois avec du méthanol, puis filtré et séché pour obtenir **23** pur (204 mg, 79%).

Aspect : poudre jaune.

RMN ^{1}H (CD_2Cl_2, 300 MHz) : δ 7.71 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 7.59 (dd, J = 7.9 Hz, J = 1.4 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.15-7.30 (AX, JAX = 3.8 Hz, 4H), 7.00-7.02 (AB, JAB = 3.8 Hz, 4H), 2.21 (m, 8H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) : 155.4, 144.3, 139.0, 138.8, 135.5, 133.3, 130.77, 124.9, 124.7, 123.7, 123.6, 123.7, 120.2, 120.1, 110.9, 57.9, 40.0, 27.2

HRMS (FD) : m/z 703.89711 calculé pour $C_{33}H_{22}Br_2S_4$ (M^+) trouvé 703.89759.

Structure cristalline : obtenue

3. Préparation des FONs

Les FONs sont préparées par la méthode de reprécipitation.[6] Le chromophore est solubilisé dans du THF pour obtenir une solution de concentration 1 mM ou 0.5 mM en chromophore. À l'aide d'une microseringue, 200 µL de cette solution sont injectés en une fois dans 19.8 mL d'eau osmose, sous agitation. L'agitation peut être mécanique (par l'utilisation d'un barreau aimanté, 400 rpm, 10 min.) ou bien sonique (par l'utilisation d'un doigt de sonication, 10W, 3 min.). Les FONs quadripolaires sont exclusivement préparées par sonication. Une fois l'agitation terminée, la solution est utilisée sans purification, sauf cas contraire, ou la solution peut être filtrée par l'utilisation d'un filtre seringue 0.2 µm. La qualité de l'eau osmose est vérifiée systématiquement avant la préparation des NPs en mesurant sa conductivité qui doit être inférieure à 15 µS pour la préparation des FONs.

4. Protocole d'imagerie de mesure de la photostabilité et du suivi de particule unique

4.1 Dans l'eau

La solution aqueuse de FONs est diluée pour atteindre une concentration ~pM, puis 5 µL sont déposés sur une lame en verre précédemment nettoyée par un plasma. La goutte est recouverte d'une lamelle en verre dont les contours sont graissés afin d'éviter les mouvements de convection pendant l'observation.

Pour les mesures de photostabilité, les FONs sont déposées sur la lame en verre par la méthode de spin coating (20 µL, 2 min.) puis 5 µL d'eau sont ajoutés sur la lame en verre afin de réhydrater les FONs. Pour l'imagerie bicouleur, une solution aqueuse contenant à la fois

les FONs **14** et **20** est préparée par simple mélange des solutions aqueuses de FONs **14** et **20** dans un ratio 1:4 (v/v).

Les FONs sont observées sur un microscope inversé modifié (Nikon Eclipse Ti) en utilisant un objectif x60 avec une ouverture numérique de 1.45 en immersion dans l'huile (Plan Apo TIRF Nikon ou Plan Apo TIRFM Olympus). L'excitation se fait à 488 nm en utilisant un laser (OBIS, 488LX laser, 150 mW). L'observation des FONs se fait sur une caméra rapide EMCCD (ProEM 512B Princeton Instruments or QuantEM : 512SC Photometrics). Un miroir dichroïque FF495-Di03 (Semrock) est utilisé en combinaison avec un filtre d'émission HQ525/50m pour les FONs **20** ou un filtre BLP01-635R (Semrock) pour les FONs **14**.

Pour le suivi de particule unique, le temps d'exposition de la caméra est fixé à 10 ms, et pour les mesures de photostabilité à 50 ms. Pour les mesures de photostabilité, différentes puissances de laser sont utilisées afin d'obtenir le même nombre de photons au départ pour les deux solutions de FONs (**14** et **20**).

Pour l'imagerie bicouleur, l'émission de fluorescence de la solution aqueuse contenant les deux FONs est divisée en deux à l'aide d'un miroir dichroïque (FF655-Di01 Semrock). Chacune des deux émissions est filtrée par un filtre HQ525/50m (Semrock) pour l'émission des FONs **20** et par un filtre FF01-776/LP (Semrock) pour l'émission des FONs **14**. Une fois les émissions des FONs **14** et **20** filtrées par leur filtre respectif, celles-ci sont projetées sur la moitié de la caméra avec un temps d'exposition de 10 ms.

Pour les FONs **D4**, l'émission est récoltée à travers un filtre passe-haut (> 633 nm) avec une excitation à 547 nm avec une concentration en FONs estimée à ~0.1 nM.

4.2 En milieu cellulaire

Les cellules COS 7 ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium sans ajout de rouge-phénol (PAN Biotech P04-01515) contenant 10% en volume de sérum fœtal de veau (FCS-Dominique Dutscher, 500105), 1% en volume de pénicilline/streptomycine (Dominique Dutscher P06-07100) dans des flacons de 25 mL (Falcon 353082) à 37°C sous atmosphère contrôlée (5% en CO_2). Les cellules sont incubées en présence de 40 µL de FONs **20** (0.3 nM) et 10 µL de FONs **14** (4.5 nM) dans 1 mL de

milieu pendant 2 h à 37°C sous atmosphère contrôlée (5% en CO_2). Les cellules sont rincées deux fois avec du milieu à 37°C pour éliminer les FONs qui n'ont pas été incorporées dans les cellules.

L'observation des FONs en imagerie bicouleur dans les cellules COS 7 se fait dans les mêmes conditions expérimentales que pour les mesures dans l'eau (section 4.1) avec un temps d'exposition de la caméra de 62.5 ms.

Les fibroblastes d'embryon de souris ont été cultivés dans du DMEM (Gibco) contenant 10% en volume de FBS à 37°C sous atmosphère contrôlée (5% en CO_2). Les cellules sont incubées avec 0.1 nM de FONs **D4** pendant 24 h à 37°C sous atmosphère contrôlée (5% en CO_2). Le milieu est ensuite remplacé par du milieu « frais » pour l'imagerie.

Pour le contrôle de l'activité mitochondriale, avant le remplacement du milieu cellulaire, les cellules sont incubées avec 1 µg/L de MitoTracker Green (Molecular Probes) à 37°C pendant 10 minutes. Pour le contrôle de l'intégrité de la membrane cellulaire, de l'iodure de propidium est ajouté (1 µg/L) juste avant l'imagerie dans le milieu cellulaire.

L'observation des FONs **D4** dans les cellules se fait avec un objectif 40x Plan Apo Nikon avec une ouverture numérique de 1.4 en immersion dans l'huile. L'excitation et la collecte de l'émission des FONs D4 se font dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'observation dans l'eau (section 4.1). L'émission du MitoTracker Green est récoltée en utilisant un filtre cube GFP et l'émission de l'iodure de propidium est récoltée en utilisant un cube filtre TRITC.

Références bibliographiques

[1] Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D., Purification of Laboratory Chemicals, Fourth Edition. Pergamon1997; p 512 pp.

[2] Bansal, R. C.; Eisenbraun, E. J.; Ryba, R. J., The iodination of fluorene to 2,7-diiodofluorene. Org. Prep. Proced. Int. 1987, 19, 258-60.

[3] Wang, Z.; Shao, H.; Ye, J.; Zhang, L.; Lu, P., Substituent effects on crosslike packing of 2',7'-diarylspiro(cyclopropane-1,9'-fluorene) derivatives: synthesis and crystallographic, optical, and thermal properties. Adv. Funct. Mater. 2007, 17, 253-263.

[4] Destri, S.; Pasini, M.; Botta, C.; Porzio, W.; Bertini, F.; Marchio, L., Synthesis and crystal structure and optical properties of fluorenic-core oligomers. Journal of Materials Chemistry 2002, 12, 924-933.

[5] Hemgesberg, M.; Ohlmann, D. M.; Schmitt, Y.; Wolfe, M. R.; Mueller, M. K.; Erb, B.; Sun, Y.; Goossen, L. J.; Gerhards, M.; Thiel, W. R., Simple Access to Sol-Gel Precursors Bearing Fluorescent Aromatic Core Units. Eur. J. Org. Chem. 2012, 2012, 2142-2151, S2142/1-S2142/93.

[6] Masuhara, H.; Nakanishi, H.; Sasaki, K.; Editors, Single Organic Nanoparticles. Springer-Verlag2003; p 402 pp.