# Chimie de surface de nanocristaux fluorescents pour l'imagerie biologique

Manon Debayle

▶ **To cite this version:**

Manon Debayle. Chimie de surface de nanocristaux fluorescents pour l'imagerie biologique. Matériaux. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS481 . tel-02926287

**HAL Id: tel-02926287**
**https://theses.hal.science/tel-02926287**

Submitted on 31 Aug 2020

**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.

THESE DE DOCTORAT

Sorbonne Université

ED 397

*Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux (LPEM)*
*Synthèse et Imagerie de Sondes Inorganiques (SI2)*

# Chimie de surface de nanocristaux fluorescents pour l'imagerie biologique

Par : Manon Debayle

Thèse de doctorat de Physico-Chimie des Matériaux

Dirigée par : Nicolas Lequeux et Thomas Pons

| | | |
|---|---|---|
| Mme. **Rachel Meallet-Renault** | Université Paris-Saclay | Présidente |
| Mme. **Elena Ishow** | Université de Nantes | Rapporteur |
| M. **Olivier Sandre** | Université de Bordeaux | Rapporteur |
| Mme. **Jutta Rieger** | Sorbonne Université | Examinatrice |
| M. **Nicolas Lequeux** | ESPCI | Co-directeur de thèse |
| M. **Thomas Pons** | ESPCI | Directeur de thèse |

*« Rien dans la vie n'est à craindre, tout est à comprendre »*

Marie Curie

## Remerciements

**C**omment débuter un manuscrit de thèse autrement qu'en remerciant toutes les personnes qui ont participé à la réussite de cette thèse et à mon épanouissement pendant 3 ans ?

**L**'ensemble des membres du jury sont les premières personnes que je souhaite remercier pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Elena Ishow et Olivier Sandre, mes deux rapporteurs de thèse, je vous remercie particulièrement pour la lecture très attentive de mon manuscrit ainsi que pour les discussions pertinentes que nous avons eues à propos de mes recherches. Je remercie également l'examinatrice Jutta Rieger ainsi que Rachel Meallet-Renault, présidente du jury, pour leur regard expert sur mon manuscrit.

**E**nsuite, je souhaite remercier tout particulièrement Thomas Pons, mon directeur de thèse et mon maître Jedi, ainsi que Nicolas Lequeux, mon co-directeur qui m'a appris à planer. J'ai pu découvrir avec vous un vrai travail d'équipe (la dream team PONS/LEQUEUX) avec les challenges et les rebondissements de la recherche publique. Merci à vous deux pour votre encadrement irréprochable mais aussi pour m'avoir laissé beaucoup de liberté. Vous le savez, vous resterez "mes chefs préférés" (et les seuls). Thomas : merci pour ta rigueur, ton excellence et ton honnêteté scientifique. Nicolas : merci pour ta confiance, ton humilité et pour avoir créé les points Nicolas.

**M**es 3 années de thèse ont été un pur bonheur grâce à l'ambiance irremplaçable de notre équipe SI2. Merci, tout d'abord, aux permanents de l'équipe. Sandrine Ithurria et Alexandra Fragola : merci pour votre écoute et pour votre envie de partager. Merci à Xianzhen Xu, à Maxime Dahan, à Elie Baloul, à François Ribot et à Mohamed Hanafi pour votre aide précieuse sur différentes techniques expérimentales.

**E**videmment, merci aux anciens : à Michel Nasilowski grâce à qui j'ai choisi cette thèse, merci à Adrien Robin, l'homme sage et à Fatima Dembele, qui nous a appris à nous rebeller. Je n'oublie pas Eva Izkiki avec qui j'ai partagé beaucoup (trop ?) de choses et aussi Djamila Kechkech avec son humour bien à elle***.

**N**aturellement, je remercie tous les supers doctorants de l'équipe : Marion Dufour pour ton rire de ninja, Antoine Hubert pour assurer dans toutes les situations, Mogha et tes citations de lover, Sheila et ton style musical bien à toi, Subha et ton lancer de gommes et Fanny, la nouvelle chanceuse. On vous passe le flambeau, bon courage pour ce qui vous attend. Une grosse pensée aussi à mon ministagiaire : Thomas et aussi à toute l'ancienne équipe de l'INSP : Clément, Bertille, Nicolas, Audrey, Charlie... et à leur chef.

**T**ous ceux qui sont venus de loin (jusqu'à 800 km !) pour venir m'écouter parler de zwitterions sont aussi à remercier : ma famille, ma belle famille ainsi que mes amis. Je remercie particulièrement mes parents pour avoir toujours cru en moi et encouragé à suivre mes propres choix et mes sœurs pour être toujours avec moi quoiqu'il arrive. Merci de tout cœur à Greu, Nouille, Minibout et j'en passe... sans oublier mon Clémou.

Pour Lui,

# Table des matières


**I Nanocristaux pour l'imagerie** **11**

I.1 NP inorganiques dans le domaine biomédical . . . . . 13

I.1.1 Des particules de taille nanométrique . . . . . 14

I.1.2 Des particules inorganiques . . . . . 14

I.1.3 Des nanoparticules comme agent d'imagerie . . . . . 15

I.1.4 Des nanoparticules pour la thérapie . . . . . 20

I.1.5 Les limites des NP pour l'*in vivo* . . . . . 23

I.2 Importance des ligands recouvrant les NP . . . . . 24

I.2.1 Rôle des ligands lors de la synthèse de NP en solution . . . . . 24

I.2.2 Les ligands de fonctionnalisation et la stabilité colloïdale des NP dans l'eau 26

I.2.3 Importance des ligands dans la furtivité des NP . . . . . 27

I.2.4 Importance des ligands dans le ciblage des NP . . . . . 29

I.2.5 Fonctionnalités supplémentaires apportées par les ligands . . . . . 29

I.3 Quantum Dots : généralités . . . . . 30

I.3.1 Présentation et historique des QD . . . . . 30

I.3.2 Propriétés électroniques des QD . . . . . 32

I.3.3 Structures cristallines des QD . . . . . 33

I.3.4 Propriétés optiques des QD . . . . . 35

I.3.5 Des QD de type cœur/coque . . . . . 38

I.3.6 Synthèse des QD en milieu organique . . . . . 39

I.4 Les Quantums Dots pour l'imagerie optique *in vivo* . . . . . 41

I.4.1 Les limites de l'imagerie optique . . . . . 41

I.4.2 Avantages des QD par rapport aux sondes organiques fluorescentes . . . 44

I.4.3 Chimie de surface des QD pour l'imagerie *in vivo* . . . . . 46

I.5 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP . . . . . 49

I.5.1 Rappels de théorie sur le FRET . . . . . 49

I.5.2 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP : le NSET . . . . . 50

I.5.3 Durée de vie de fluorescence et transfert d'énergie NSET . . . . . 53

**II Adsorption non spécifiques de protéines sur des QD** **57**
II.1 Synthèse des différentes particules zwitterioniques . . . . . 61
II.1.1 Synthèse des QD . . . . . 61
II.1.2 Synthèse des polymères zwitterioniques et caractérisations . . . . . 62
II.1.3 Synthèse des polymères dibloc zwitterion-imidazole . . . . . 62
II.1.4 Échange de ligands à la surface des Quantum Dots . . . . . 65
II.1.5 Comparaison des différentes chimies de surface . . . . . 67
II.2 Quantification des interactions non spécifiques . . . . . 69
II.2.1 Mesures *in vitro* de la couronne dure de protéines : dosage à la fluorescamine 70
II.2.2 Mesures *in vitro* de la couronne dynamique de protéines : mesures par FCS 71
II.2.3 Mesures dans des cellules vivantes de la couronne de protéines : suivi de QD unique dans le cytoplasme . . . . . 74
II.3 Résultats et discussion . . . . . 75
II.3.1 Comparaison des différents QD-zwitterions . . . . . 75
II.3.2 Influence de l'ajout de fonctions chimiques chargées . . . . . 81
II.3.3 Influence de la fonction d'ancrage des polymères à la surface des QD . . 84
II.3.4 Importance de la pureté des polymères . . . . . 85
II.3.5 Imagerie *in vivo* dans les cellules et marquage biologique . . . . . 88

**III Sondes de pH fluorescentes et réversibles** **91**
III.1 Choix du polymère sensible au pH . . . . . 97
III.1.1 Études réalisées sur des copolymères sulfadimethoxines (SDM) . . . . . 98
III.1.2 Études réalisées sur des copolymères sulfamethazine (SMZ) . . . . . 103
III.2 Nano-sonde de pH avec des QD visibles . . . . . 107
III.2.1 Assemblage de la nano-sonde de pH . . . . . 107
III.2.2 Mesures ratiométriques . . . . . 112
III.3 Nano-sonde de pH dans l'infrarouge court : SWIR . . . . . 117
III.3.1 Synthèse de la nano-sonde SWIR . . . . . 117
III.3.2 Sensibilité au pH et réversibilité . . . . . 120
III.3.3 Mesures ratiométriques . . . . . 121
III.4 Comparaison entre la théorie et l'expérience . . . . . 123

**IV Micelles sensibles au pH** **131**
IV.1 Échange de ligands sensibles au pH sur les NP . . . . . 138
IV.1.1 Synthèse des polymères pDPA et pDPA/LA sensibles au pH . . . . . 138
IV.1.2 Caractérisations des polymères sensibles au pH . . . . . 140
IV.1.3 Échange de ligands sur des AuNP sphériques . . . . . 142
IV.1.4 Échange de ligands sur des QD visibles et SWIR . . . . . 143
IV.2 Micelles de copolymère pDPA-b-SB sensibles au pH . . . . . 145
IV.2.1 Synthèse des copolymères surfactants pDPA-b-SB . . . . . 145

IV.2.2 Caractérisations des polymères surfactants pDPA-b-SB . . . . . 147
IV.2.3 Analyse des micelles avec du pyrène . . . . . 150
IV.2.4 Analyses des micelles par DLS . . . . . 154
IV.3 Auto-assemblage des micelles autour des NP-pDPA/LA . . . . . 155
IV.3.1 Micelles encapsulant les AuG-pDPA/LA . . . . . 155
IV.3.2 Micelles encapsulant les QD-pDPA/LA . . . . . 156
IV.3.3 Micelles encapsulant les AuNP-pDPA/LA et les QD-pDPA/LA . . . . . 157
IV.4 Micelles fluorescentes sensibles au pH . . . . . 157
IV.4.1 Influence de la présence du surfactant pH-labile . . . . . 158
IV.4.2 Influence de la quantité du surfactant pH-labile . . . . . 160
IV.4.3 Influence de la taille du polymère surfactant pH-labile . . . . . 160
IV.4.4 Influence de la taille et de la quantité des AuNP . . . . . 161
IV.4.5 Résultats préliminaires avec des sondes visibles et SWIR en mesures ratiométriques . . . . . 165

**V Détection d'activité enzymatique par imagerie 169**
V.1 Les Quantum Dots $CuInSe_2$@ZnS . . . . . 173
V.1.1 Synthèse et caractérisations . . . . . 173
V.1.2 Passage des QD dans l'eau et échange de ligands . . . . . 176
V.1.3 Fluorescence et temps de vie des QD NIR . . . . . 177
V.1.4 Stabilité des particules *in vivo* . . . . . 178
V.2 L'imagerie à fenêtre temporelle . . . . . 179
V.2.1 Principe et montage optique . . . . . 179
V.2.2 Imagerie à fenêtre temporelle *in vivo* . . . . . 181
V.3 Détection d'activité enzymatique par imagerie à fenêtre temporelle . . . . . 182
V.3.1 Principe de la nano-sonde . . . . . 182
V.3.2 Principe de l'imagerie à fenêtre temporelle pour la mesure de transfert d'énergie . . . . . 183
V.3.3 Nano-sonde avec des accepteurs organiques . . . . . 185
V.3.4 Nano-sonde avec des accepteurs inorganiques : AuNP . . . . . 188
V.3.5 Optimisation de la détection à fenêtres temporelles . . . . . 189
V.3.6 Détection de la collagénase et mesure de l'activité enzymatique . . . . . 191

**VI Conclusion et perspectives 195**

**VII Annexes 205**
VII.1 PROTOCOLE DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS TAMPONS . . . . . 206
VII.2 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES . . . . . 207
VII.3 SYNTHÈSE DES LIGANDS . . . . . 212
VII.4 SYNTHÈSE DES POLYMÈRES . . . . . 216

VII.5 ÉCHANGE CLASSIQUE DE LIGANDS . . . . . 223
VII.6 SYNTHESE DES QD-SB-$COO^-$ . . . . . 223
VII.7 SYNTHESE DES QD-SB-BIOTINE . . . . . 224
VII.8 INCORPORATION DES QD DANS DES ÉRYTHROCYTES . . . . . 224
VII.9 RÉACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE . . . . . 225
VII.10 ANALYSES DE LA COURONNE DURE DE PROTÉINES . . . . . 226
VII.11 POLYMÉRISATION RAFT . . . . . 227
VII.12 PRINCIPE DE LA RMN DOSY . . . . . 228
VII.13 ANALYSE DE LA COURONNE DURE PAR FCS ET CALIBRATIONS . . 230
VII.14 SUIVI DE QD UNIQUE DANS DES CELLULES HELA . . . . . 233
VII.15 CIBLAGE DE QD SUR LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE . . . . . 234
VII.16 THÉORIE DU FRET . . . . . 235
VII.17 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION . . . . . 238
VII.18 PRODUITS CHIMIQUES UTILISES . . . . . 241

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

| Abréviation | Nom réel |
|---|---|
| APMA | N-(3-aminopropyl)méthacrylamide |
| AuNP | Nanoparticule d'or |
| AuG | Germe d'or (AuNP de 2 nm de diamètre) |
| Au5 | AuNP de 5 nm de diamètre |
| Au8 | AuNP de 8 nm de diamètre |
| Au20 | AuNP de 20 nm de diamètre |
| BS3 | 2,2-Bis(2,5-dioxo-3-sulfo-1-pyrrolidinyl)octanedioate |
| BSA | albumine de sérum bovin |
| CB | Carboxybétaïne |
| DMF | N,N-diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DPA | Diisoprypylamide |
| EDC | 1-éthyl-3-(-3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorohydrate |
| HEPES | acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| HS | Sérum Humain |
| MES | 2-(N-morpholino)éthanosulfonique |
| NIR | "Near Infra-red" |
| NP | Nanoparticules |
| NHS | N-hydroxysuccinimide |
| PC | 2-methacryloyloxyéthyl phosphorylcholine (ou phosphorylcholine) |
| PEG | Polyethylene glycol |
| QD | Quantum Dot |
| SAv | streptavidine |
| SB | N,N'-dimethyl(acrylamidopropyl)ammonium propane sulfonate (ou sulfobétaïne) |
| SD | Sulfadimethoxine |
| SDM | Sulfadimethoxine méthacrylamide |
| SMZ | Sulfamethazine méthacrylamide |
| SWIR | "Short Wave Infrared" |
| SZ | Sulfamethazine |
| THF | tetrahydrofurane |
| V50 | 2,2'-[1,2-diazènediyl]bis(2-méthylpropanimidamide) chlorohydrate |

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les nanoparticules ont un avenir prometteur en imagerie pour le diagnostic et la thérapie grâce à leur propriétés physico-chimiques exceptionnelles. Certaines nanoparticules inorganiques présentent des propriétés soit optiques, électroniques ou magnétiques remarquables qui en font d'excellents agents de contraste dans des techniques d'imagerie telles que : l'imagerie optique de fluorescence, l'IRM, l'imagerie photoacoustique ou encore l'imagerie par tomographie X. Certaines nanoparticules sont aussi de très bons candidats pour la thérapie, pour la délivrance d'un principe actif par exemple. Toutefois, à l'heure actuelle, de nombreuses limitations empêchent encore leur utilisation courante dans le domaine biomédical. En effet, leur manque de stabilité colloïdale, leur toxicité, leur mauvais ciblage et leur élimination de l'organisme sont des freins majeurs.

Les limitations pour l'utilisation des nanoparticules provient bien souvent de la chimie de surface. En effet, les ligands à la surface des NP jouent un rôle crucial pour leur utilisation dans des milieux biologiques complexes, c'est à dire pour des applications *in vitro* ou *in vivo*. Bien avant de pouvoir utiliser les NP comme agent diagnostique ou thérapeutique, il est primordial que les particules soient stables, c'est à dire qu'elles ne s'agrègent pas, et aussi qu'elles réussissent à atteindre leur cible. Cependant les nanoparticules possèdent une très grande surface spécifique, ce qui augmente leurs interactions avec des biomolécules. Ces interactions, soit électrostatiques soit hydrophobes, induisent une reconnaissance des NP par le système immunitaire et conduisent souvent à une accumulation dans les macrophages du foie ou de la rate.

Il est ainsi nécessaire d'étudier les interactions entre NP et biomolécules afin de mieux les comprendre et de chercher à les diminuer. Il est très rare que des NP soient complètement furtives (lorsqu'aucune biomolécule ne vient s'y adsorber). Bien souvent des protéines s'adsorbent à leur surface. Il est possible de distinguer les couronnes dures et dynamiques de protéines en fonction de leurs interactions avec la surface des NP (respectivement fortes ou faibles). Cette couronne de protéines va jouer un rôle primordial car elle peut entraîner l'agrégation des nanoparticules et modifier leur ciblage ou leur biodistribution.

Dès lors, il est nécessaire de maîtriser la chimie de surface des nanoparticules. La connaissance de la nature des ligands à leur surface mais aussi de la stabilité de leur fonction d'ancrage, de leur nombre, de leur densité de surface, de leur densité de greffage, de leur charge... sont des facteurs clés.

Une fois les NP relativement furtives, il sera alors possible de fonctionnaliser la chimie de surface soit pour y ajouter des fonctions de ciblage telles que, par exemple, des biomolécules ciblant les cellules cancéreuses. Il est aussi possible d'utiliser les ligands à la surface des NP pour les rendre sensibles à leur environnement. Les ligands peuvent, par exemple, permettre de modifier,

sous l'effet d'un facteur biochimique agissant comme stimulus, les propriétés physico-chimiques des NP. Ces stimuli peuvent être de différentes natures, ainsi au sein d'un micro-environnement tumoral, il y a des différences de pH, d'activité enzymatique, de potentiel rédox par rapport à des tissus sains.

Dans cette thèse, je me suis intéressée particulièrement au pH car il va pouvoir jouer le rôle de stimulus pour détecter la présence d'une tumeur et car son rôle certain dans le développement métastatique n'est pas encore parfaitement compris dans le domaine scientifique. L'imagerie de ce pH pourrait permettre de détecter les tumeurs mais aussi de mieux comprendre leurs mécanismes de développement. Dans le milieu extracellulaire des tumeurs, le pH est légèrement plus acide (pH$\approx$ 6) que dans les tissus sains (pH $\approx$ 7,3). Ce pH peut être encore plus acide dans les lysosomes (pH$\approx$ 5).

L'activité enzymatique est aussi un facteur important sur lequel j'ai travaillé, qui différencie le micro-environnement tumoral du reste des tissus sains. Certaines enzymes sont surexprimées par les cellules cancéreuses, ce qui modifie leur concentration localement. Il est alors possible d'utiliser ce stimulus afin soit de détecter la présence de tumeurs soit de mieux comprendre ces nouvelles activités enzymatiques.

Dans cette thèse les nanoparticules utilisées sont des nanocristaux de semi-conducteurs (appelés Quantum Dots, notés QD) pour leurs propriétés exceptionnelles de fluorescence qui en font d'excellents candidats pour l'imagerie optique. Contrairement aux molécules organiques, ils résistent très bien au photoblanchiment, leur bande d'émission est fine, leur section efficace d'absorption est très large et ils possèdent de bons rendements quantiques de luminescence dans le domaine du NIR (700-900 nm) et du SWIR (900-1400 nm). Ce dernier point est crucial pour l'imagerie optique car il va permettre de diminuer l'autofluorescence et l'absorbance des tissus biologiques mais aussi leur diffusion. Cela permettra de faire de l'imagerie dans les tissus en profondeur à quelques cm ou avec une résolution de l'ordre du µm.

L'intensité de fluorescence ou le temps de vie de l'état excité de ces sondes peuvent être modulés en présence de molécules (ou particules) qui induisent des transferts d'énergie par désexcitations non radiatives des QD. Ces transferts d'énergie se produisent lorsque le donneur (ici le QD) est proche spatialement d'un accepteur d'énergie. Il existe différents types de transfert d'énergie. Dans cette thèse, nous étudierons le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) lorsque les accepteurs seront des molécules organiques et le NSET (Nanometal Surface Energy Transfer) lorsque les accepteurs seront des nanoparticules d'or. Cette modulation de fluorescence en intensité ou en temps de vie a été utilisée dans plusieurs projets de cette thèse afin de créer des nano-objets sensibles à des facteurs biochimiques provenant du micro-environnement tumoral.

# ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit se découpe en 5 chapitres : le premier est un chapitre d'introduction et d'état de l'art et les chapitres suivants présentent les quatre projets que j'ai menés pendant cette thèse.

Le **CHAPITRE I** est consacré à l'introduction générale des nanoparticules inorganiques dans le domaine biomédical et présente notamment l'apport des NP dans certaines techniques d'imagerie mais aussi dans la thérapie. Ce chapitre développe ensuite l'importance des ligands à la surface des nanoparticules : lors de la synthèse, lors de la fonctionnalisation mais aussi pour la furtivité et le ciblage des particules. Ce chapitre permet également d'introduire les Quantum Dots utilisés pendant cette thèse et présente leurs propriétés physiques ainsi que leur synthèse et leur transfert dans l'eau. Les Quantum Dots présentent certains avantages en tant que sondes luminescentes pour l'imagerie optique *in vivo* qui seront détaillés. Enfin, en dernière partie de ce chapitre nous verrons que la fluorescence des QD peut être modulée en présence de particules d'or par un transfert d'énergie appelé NSET.

Dans le **CHAPITRE II**, un projet sur l'étude des interactions non spécifiques entre la surface des QD et des protéines est présenté. Ce projet étudie la furtivité des NP et l'importance des ligands à leur surface pour des applications biologiques. Une analyse fine portant sur l'étude des couronnes dures et dynamiques de protéines formées à la surface de QD recouverts de différents polymères zwitterioniques a été réalisée en comparant les résultats obtenus dans différentes solutions modèles et dans le cytoplasme de cellules vivantes.

Le **CHAPITRE III** présente le développement d'une nouvelle nano-sonde fluorescente sensible au pH (entre pH 5,5 et pH 7,5) pour des applications dans l'imagerie des milieux extracellulaires des tumeurs solides. Cette nano-sonde se compose de QD (visibles ou SWIR) recouverts de ligands sensibles au pH et liés de façon covalente à des nanoparticules d'or. Ces dernières peuvent moduler la fluorescence des QD en fonction de leur distance. Dans ce chapitre, l'assemblage du nano-objet est détaillé ainsi que son utilisation *in vitro* et *ex vivo* par imagerie optique dans des érythrocytes.

Le **CHAPITRE IV** porte sur une autre nanosonde de pH basée sur l'assemblage de petits agrégats de nanoparticules (que j'appellerai micelles) stabilisés par un polymère surfactant sensible au pH. Ce polymère surfactant se compose d'un bloc zwitterionique afin d'augmenter la furtivité des micelles et d'un bloc sensible au pH. L'objectif de ce projet est d'avoir des micelles totalement éteintes (non luminescentes) à pH neutre et, par une acidification du milieu ($pH < 7$) d'obtenir la dissolution des micelles permettant la libération des NP qui deviennent alors luminescentes.

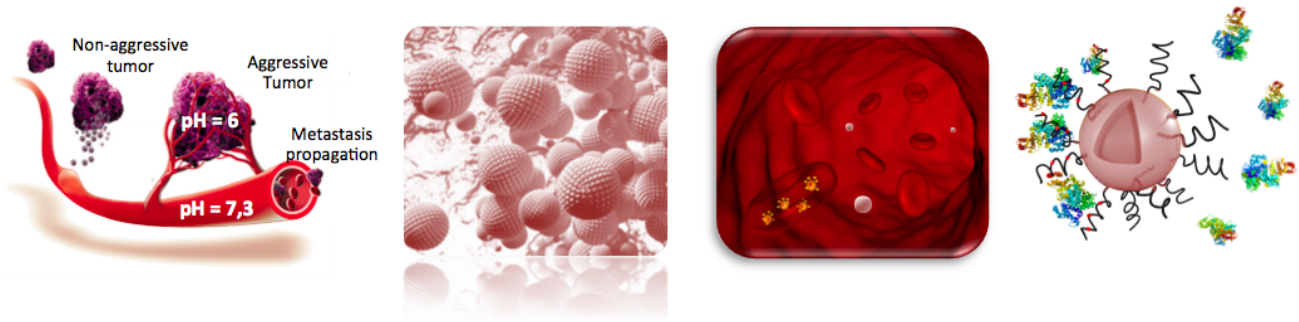
Le **CHAPITRE V** propose la détection de de l'activité enzymatique de la collagènase produite préférentiellement dans des tumeurs solides, par imagerie optique à porte temporelle. Une nano-sonde fluorescente sensible à la présence d'enzymes a été développée dans ce projet. La possibilité d'étudier l'activité enzymatique par mesure du temps de vie du nano-objet puis par imagerie optique à porte temporelle est présentée.

Chapitre I

# Généralités et contexte : nanocristaux pour l'imagerie

**Résumé du chapitre**

Ce chapitre propose de faire un résumé bibliographique sur l'utilisation de nanoparticules dans le domaine biomédical. Dans une première partie, l'emploi de nanoparticules inorganiques plutôt que de molécules organiques sera expliqué, puis nous verrons pourquoi et comment ces objets sont utiles pour l'imagerie et la thérapie, notamment en cancérologie. Dans une seconde partie sera présentée l'importance des ligands recouvrant les nanoparticules afin de pouvoir les utiliser dans le domaine biomédical. Enfin, dans les deux parties suivantes, nous nous concentrerons sur l'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs luminescents : les Quantum Dots. Une partie présentera les QD, leurs propriétés et leurs synthèses et la seconde partie détaillera pourquoi ces particules présentent un grand intérêt pour l'imagerie optique. Dans une toute dernière partie nous verrons qu'il est possible de moduler la luminescence des QD avec des NP d'or.



## Sommaire

**I.1 NP inorganiques dans le domaine biomédical . . . . . 13**
I.1.1 Des particules de taille nanométrique . . . . . 14
I.1.2 Des particules inorganiques . . . . . 14
I.1.3 Des nanoparticules comme agent d'imagerie . . . . . 15
I.1.4 Des nanoparticules pour la thérapie . . . . . 20
I.1.5 Les limites des NP pour l'*in vivo* . . . . . 23
**I.2 Importance des ligands recouvrant les NP . . . . . 24**
I.2.1 Rôle des ligands lors de la synthèse de NP en solution . . . . . 24
I.2.2 Les ligands de fonctionnalisation et la stabilité colloïdale des NP dans l'eau . . . . . 26
I.2.3 Importance des ligands dans la furtivité des NP . . . . . 27
I.2.4 Importance des ligands dans le ciblage des NP . . . . . 29
I.2.5 Fonctionnalités supplémentaires apportées par les ligands . . . . . 29
**I.3 Quantum Dots : généralités . . . . . 30**
I.3.1 Présentation et historique des QD . . . . . 30
I.3.2 Propriétés électroniques des QD . . . . . 32
I.3.3 Structures cristallines des QD . . . . . 33
I.3.4 Propriétés optiques des QD . . . . . 35
I.3.5 Des QD de type cœur/coque . . . . . 38
I.3.6 Synthèse des QD en milieu organique . . . . . 39
**I.4 Les Quantums Dots pour l'imagerie optique *in vivo* . . . . . 41**
I.4.1 Les limites de l'imagerie optique . . . . . 41
I.4.2 Avantages des QD par rapport aux sondes organiques fluorescentes . . 44
I.4.3 Chimie de surface des QD pour l'imagerie *in vivo* . . . . . 46
**I.5 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP . . . . . 49**
I.5.1 Rappels de théorie sur le FRET . . . . . 49
I.5.2 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP : le NSET . . . . . 50
I.5.3 Durée de vie de fluorescence et transfert d'énergie NSET . . . . . 53

# Introduction

Les nanomatériaux et plus généralement les nanotechnologies recouvrent un domaine de recherche et industriel en plein essor. L'intérêt majeur de ces nano-objets provient de leurs remarquables propriétés physico-chimiques inhérentes à leur très petite taille et à leur morphologie. Les nanomatériaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans de nombreux domaines comme l'optique, l'électronique, le magnétisme, la catalyse mais aussi la biologie et la médecine.

Dans le cadre de la détection précoce du cancer, de son suivi dans le temps et de la thérapie, l'édification de nouveaux matériaux pour améliorer l'imagerie ou le traitement des milieux cancéreux représente un challenge d'avenir. Plus généralement : afin d'observer des processus biologiques spécifiques *in vivo* et de mieux comprendre leur développement, les nanoparticules (NP) semblent être une toute nouvelle méthode de choix.

L'utilisation de NP *in vivo* requiert une maîtrise totale de leur synthèse, de leurs caractérisations et une évaluation finale de leur biodistribution. Le choix du matériau, de sa taille et de sa chimie de surface sont des paramètres cruciaux pour sélectionner la meilleure NP. Bien que ces dernières présentent des propriétés physico-chimiques particulièrement intéressantes, les grandes limitations dans leur utilisation *in vivo* en clinique sont leur toxicité et leur difficulté à atteindre leur cible. La chimie de surface choisie pour ces nanomatériaux est l'un des paramètres les plus importants. En effet, il faut d'une part réussir à stabiliser ces suspensions colloïdales dans des milieux physiologiques, qu'elles soient stables dans le temps, et, d'autre part qu'il y ait une adsorption non spécifique minimale afin que les NP aient un long temps de circulation dans le sang. Ces ligands doivent donc à la fois être très fortement accrochés à la surface des nanoparticules mais aussi permettre la solubilisation dans des milieux aqueux.

Au cours de cette thèse, les nanomatériaux sélectionnés sont des boîtes quantiques colloïdales ou Quantum Dots (QD) pour leurs propriétés de fluorescence exceptionnelles, notamment dans le domaine de l'infrarouge court. Des nanoparticules d'or (AuNP) sous forme de sphères et de bâtonnets seront également utilisées pour leurs propriétés d'absorption remarquables.

## I.1 NP inorganiques dans le domaine biomédical

Au cours des trente dernières années, l'intérêt porté aux nanomatériaux a pris de plus en plus d'ampleur dans le cadre d'applications diverses, notamment dans le domaine biomédical. Dans ce domaine, le dépistage précoce de maladies ou la compréhension de nouveaux processus biologiques constituent un enjeu majeur. Les nanoparticules peuvent jouer un rôle non seulement pour l'imagerie (donc le diagnostic) mais également pour la thérapie.

### I.1.1 Des particules de taille nanométrique

Les nanoparticules sont, d'après la réglementation européenne, des matériaux fabriqués intentionnellement et se caractérisent par une ou plusieurs dimensions entre 1 à 100 nm. Cependant, il n'y a pas qu'une seule définition des nanoparticules et dans le domaine scientifique toutes les particules sub-micrométriques sont appelées nanoparticules. Pour l'utilisation des NP dans le domaine biomédical, il est crucial de savoir quelle est la taille d'une nanoparticule par rapport aux différents objets biologiques du corps humain, **figure I.1**. Par exemple, les nanoparticules sont au moins 100 fois plus petites qu'une cellule ou qu'un érythrocyte, par contre elles sont du même ordre de grandeur qu'un virus et elles sont aussi souvent plus grandes qu'une protéine.

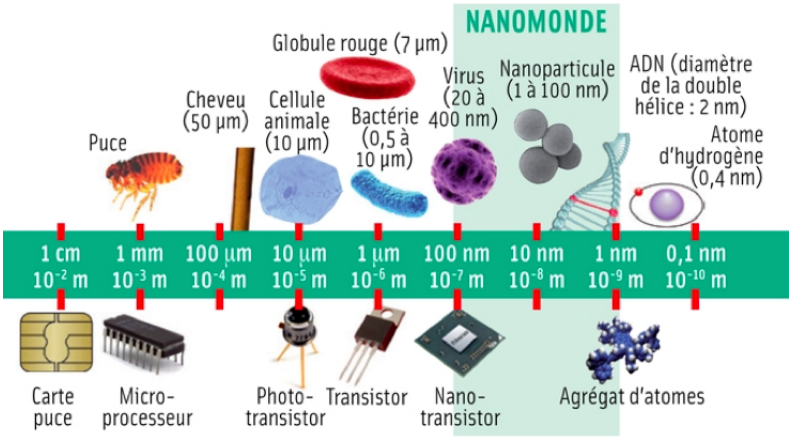



Figure I.1 – Échelle présentant la taille des nanoparticules par rapport à différents objets biologiques et électroniques. Cette image provient de la référence [1].

### I.1.2 Des particules inorganiques

On distingue deux types de nanoparticules : celles organiques et celles inorganiques. Les NP organiques sont par exemple des liposomes, des micelles ou encore des NP à base de polymères comme des polymersomes ou encore des lipides solides ou des dendrimères. Les NP inorganiques sont, eux, des nano-cristaux composés par exemple de silice ($SiO_2$), d'oxydes, de métaux ou de semi-conducteurs. Ces familles de nanoparticules sont toutes deux très intéressantes pour des applications dans le domaine biomédical. Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux nano-cristaux inorganiques.

L'intérêt des NP inorganiques provient de leur taille et de leur morphologie. En effet, leur faible taille et leur ratio élevé surface/volume leur confèrent des propriétés physiques et chimiques très intéressantes non observées à des tailles plus grandes, lorsque le matériau est massif (en "bulk"). Ces nouvelles propriétés, qui dépendent aussi de leur composition chimique, leur permettent d'être d'excellents candidats comme agents de contraste en imagerie médicale. Aug-

menter les seuils de sensibilité permet un diagnostic plus fiable et plus précoce. Par ailleurs, comme les nanoparticules sont de petites taille, elles possèdent une grande surface spécifique ce qui permet d'accrocher des agents de ciblage mais aussi des substances actives afin, par exemple, de délivrer un principe actif dans un tissu (ou un organe). Les nanoparticules, dans le domaine biomédical, peuvent donc être utilisées à la fois pour l'imagerie et la thérapie. La partie suivante propose des exemples typiques (mais non exhaustifs) de nanoparticules pour ces deux domaines d'application.

### I.1.3 Des nanoparticules comme agent d'imagerie

#### Agents d'imagerie optique de fluorescence

L'imagerie optique de fluorescence est l'une des techniques d'imagerie la plus courante dans le domaine de la recherche biomédicale. Cette technique est très fréquemment utilisée pour des tests *in vitro* comme *in vivo* de par la très grande sensibilité du signal détecté (les photons émergents) et sa facilité d'utilisation.

L'imagerie de fluorescence est, cependant, une technique qui est limitée par une mauvaise résolution spatiale et une faible profondeur de pénétration à cause de plusieurs problèmes :

— l'absorption des tissus,
— la diffusion des tissus,
— l'autofluorescence des tissus [2].

Si les tissus absorbent aux mêmes longueurs d'onde que les sondes optiques, il va être plus difficile d'exciter les molécules (ou particules) fluorescentes. Il faudra donc envoyer une puissance bien plus grande, ce qui peut risquer d'abimer les tissus. Généralement les tissus absorbent dans le visible mais beaucoup moins dans la première fenêtre de l'infrarouge, appelée proche infrarouge, (noté NIR : "Near-Infrared") entre 700 et 900 nm [3], ou la seconde fenêtre, appelée infrarouge court (noté SWIR : "Short-Wave Infrared") entre 900 et 1400 nm. Par ailleurs, la diffusion des tissus diminue aussi la résolution aux faibles longueurs d'onde. L'autofluorescence des tissus augmente aussi le bruit de cette technique d'imagerie et diminue la sensibilité. Ceci sera détaillé dans la partie I.4 de ce chapitre. Les gammes spectrales dans l'infrarouge (NIR et SWIR) sont appelées fenêtres de transparence biologique des tissus, et sont privilégiées pour l'imagerie optique *in vivo* car il est possible de pénétrer beaucoup plus profondément dans les tissus, comme montré sur la **figure I.2(a)**. Un exemple d'imagerie optique d'une souris après injection de NP servant d'agents de contraste, est présenté en **figure I.2(b)**.

Plusieurs sondes fluorescentes émettant dans le NIR et le SWIR existent : des fluorophores organiques [6], des nanoparticules dopées avec des terres rares [7,8], des nanotubes de carbone [9] et des nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents. Les molécules organiques présentent des rendements quantiques relativement faible dans le NIR ($\approx$ 15-20 %) et très faibles dans le SWIR ($<$ 2%). De plus les molécules souffrent d'un photoblanchiment rapide.
Il existe aussi des NP qui sont des sondes fluorescente dans l'IR. Les nanoparticules dopées avec des terres rares, par exemple, possèdent des rendements quantiques dans le NIR entre 5 et 15 %.

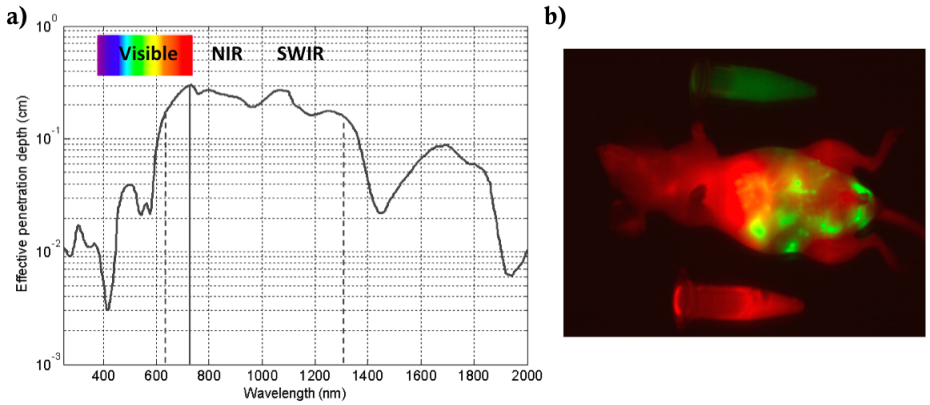



FIGURE I.2 – a) Courbe de profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus mammaires. Image provenant de [4]. b) Cette image, provenant d'une publication très récente de l'équipe de Bawendi *et al.* [5], montre par imagerie de fluorescence une souris après injection de deux populations de NP inorganiques (des Quantum Dots : QD) émettant dans le SWIR. Les couleurs verte et rouge, artificielles, représentent deux longueurs d'onde différentes dans l'IR (entre 1080 et 1300 nm). Les QD représentés en vert ont été injectés par voie intrapéritonéale et les QD en rouge par voie intraveineuse dans une souris "nude".

Les nanotubes de carbones ("SWCNT : Single-walled Carbon Nanotube) également mais ils ont des rendements quantiques extrêmement bas ($< 2\%$). Les nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents (quantum dots) sont des NP particulièrement intéressantes pour l'imagerie optique *in vivo* car elles présentent de très nombreux avantages par rapport aux molécules organiques (comme il le sera détaillé dans la suite). De plus, les QD possèdent des rendements quantiques beaucoup plus élevés dans le SWIR (de plusieurs ordres de grandeurs : jusqu'à 10-20 % selon les auteurs).

### Agents d'imagerie pour l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de faire une imagerie anatomique. L'ajout d'agents de contraste qui réagissent au champ magnétique lors d'une IRM, permet d'ajouter un contraste fonctionnel (par exemple pour révéler un tissu cancéreux, par exemple). Les agents d'imagerie sont capables de modifier la relaxation des protons de l'eau localement et donc de modifier le contraste de l'image IRM. Actuellement, les agents de contraste les plus utilisés sont les ions possédant beaucoup d'électrons non appariés. Le Gadolinium : $Gd^{3+}$ est l'ion le plus utilisé car il possède 7 électrons célibataires. Cet ion est très toxique [10,11] et doit être complexé sous forme d'un complexe stable avec des chélatants comme le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) ou bien le DTPA, ou encore le BOPTA pour éviter tout risque pour le patient [12–14]. Un exemple d'images obtenues par IRM avec différents agents de contraste est présenté en **figure I.3**, soit avec un GBCA ("Gd-Based Contrast Agent"), un complexe à base de gadolinium, qui augmente le contraste T1-positif ou bien avec des NP : les SPIO qui augmentent le contraste T2-négatif. Ici, les NP ne viennent pas remplacer les GBCA mais apportent un autre type de contraste, donc des informations complémentaires.

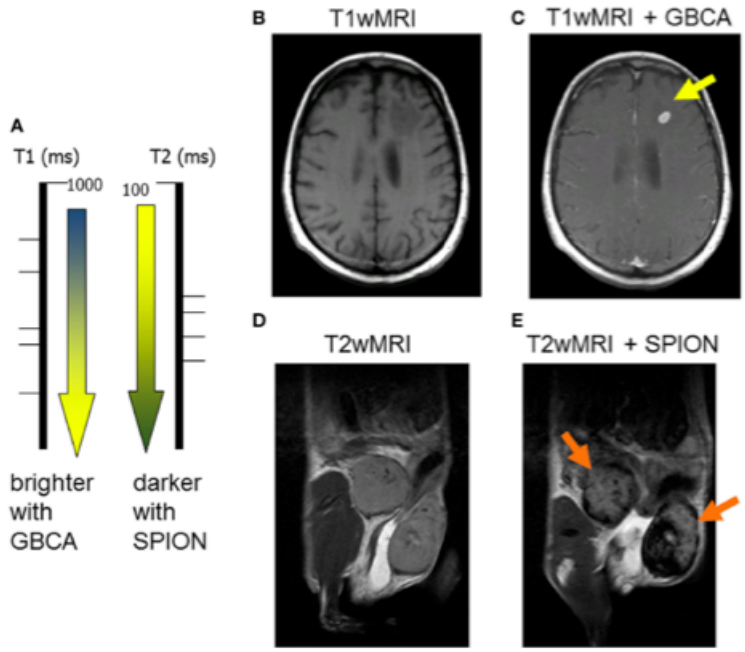



FIGURE I.3 – Présentation de deux type d'agents de contrastes majeurs en IRM. (A) Les GBCA, agents de contraste à base de gadolinium paramagnétique, considérés comme des contrastes T1 positifs ; et les SPIO, NP à base d'oxyde de fer, considérés comme des contrastes T2 négatifs. (B) Image pré- et (C) post-injection de GBCA d'un cerveau humain d'un patient ayant des métastases provenant d'un mélanome. (D) Image pré- et (E) post-injection de NP SPIO dans une tumeur enflammée des glandes mammaires d'une souris. Ces images proviennent de l'équipe de Serkova [15].

Les NP à base d'oxyde de fer sont très étudiées comme agents de contraste négatifs en IRM car elles présentent d'excellentes propriétés super-paramagnétiques permettant un fort contraste. On distingue les SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide) qui possèdent une taille comprise entre 50 nm et 3,5 µm et les USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) qui mesurent entre 3 et 50 nm [16]. Plusieurs agents de contraste sont commercialisés en France, depuis 2010 à base de NP d'oxyde de fer comme le Endorem® (pour étudier des lésions tumorales du foie) et le Sinerem® (pour étudier des ganglions métastatiques dans le cas des cancers du pelvis).

Par ailleurs, des complexes avec l'ion $Mn^{2+}$ qui possèdent 5 électrons non appariés, ont également été développés car le manganèse possède une toxicité 10 fois moins grande que le gadolinium. Une nouvelle idée émergente est d'incorporer ces ions paramagnétiques au sein de nanoparticules, évitant alors le relargage de ces ions. Des synthèses d'oxyde de Mn [17, 18], d'oxyde de Gd [19] ou encore de Mn incorporé au sein de sulfure de zinc ont été réalisées et possèdent de meilleurs valeurs de relaxivité pour une plus faible toxicité que les complexes métalliques [20]. Les NP semblent donc être de nouveaux matériaux prometteurs comme agents d'imagerie IRM.

### Agents d'imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique, en tant que modalité d'imagerie biomédicale, est basée sur l'effet photoacoustique.

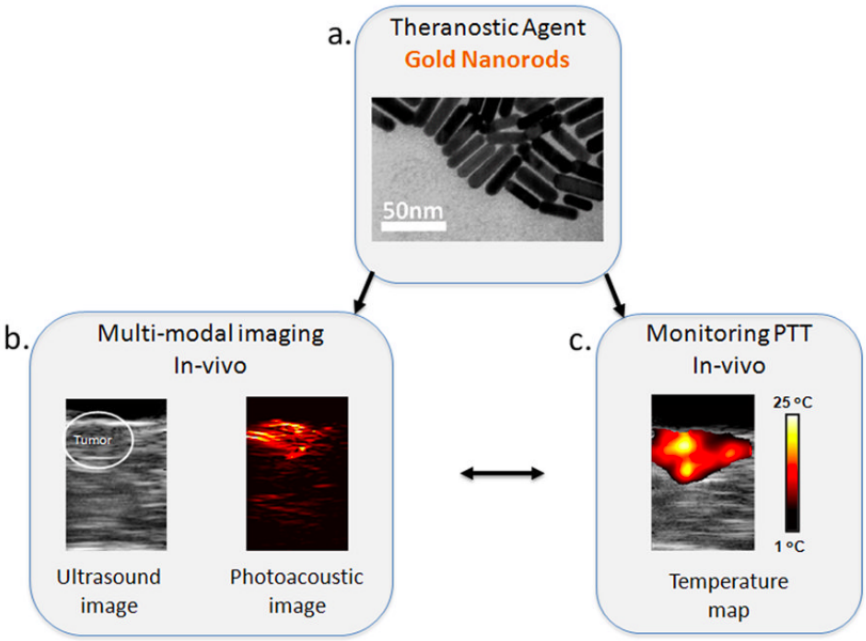



Figure I.4 – Les nanoparticules d'or sous forme de nano-bâtonnets sont de très bons agents de contraste en imagerie photoacoustique. (a) Image TEM des particules. (b) Images d'une tumeur chez une souris après injection de NP d'or vectorisées. Les images sont obtenues par ultrasons (à gauche) et par photoacoustique (à droite). La tumeur est entourée en blanc. En imagerie photoacoustique, une accumulation des NP est observée. (c) Image montrant l'augmentation de température provenant des NP d'or excitées. Ces images proviennent de l'équipe de Millini *et al.* [21].

Dans l'imagerie photoacoustique, des impulsions laser non-ionisantes sont envoyées dans les tissus biologiques. Une partie de l'énergie émise par le laser et absorbée est alors convertie en chaleur. Cette augmentation locale de la chaleur crée une dilatation des tissus. En modulant l'intensité de l'onde émise (impulsions courtes), les tissus subiront des cycles de dilatation-compression générant des ondes mécaniques qui peuvent alors être détectées par des transducteurs et analysées pour construire une image interne du patient. L'absorption optique est intimement liée aux propriétés du milieu éclairé. L'amplitude de l'émission d'ultrasons est proportionnelle à l'absorption optique. Les tissus biologiques n'ayant pas la même absorption optique, il est possible de réaliser des images 2D ou 3D de la zone ciblée.

L'absorption optique des tissus biologiques peut provenir de molécules endogènes telles que l'hémoglobine [22], la mélanine ou bien exogènes comme les agents de contrastes. Certaines nanoparticules, comme les nanobâtonnets d'or (GNR) [23, 24], sont d'excellents agents d'imagerie

pour la photoacoustique.
En effet, lorsqu'une particule métallique est soumise à un champ électromagnétique dont la longueur d'onde est beaucoup plus grande que le taille des particules : $\lambda >> \theta_{particule}$, tous les électrons libres de la bande de conduction subissent le même champ et oscillent collectivement en phase. Lorsque la fréquence de l'onde incidente correspond à la fréquence propre de ces oscillations, il se produit un phénomène de résonance, appelé plasmon de surface. Cette résonance a lieu dans le visible pour les nanosphères d'or (autour de 520 nm, en fonction de leur diamètre). Pour des particules anisotropes telles que les nanobâtonnets d'or il y a deux résonances plasmons observables : l'absorbance plasmonique transversale (vers 520 nm) et l'absorbance plasmonique longitudinale (dans le visible ou l'IR). Les GNR possèdent une très grande section efficace d'absorption à la longueur d'onde de leur résonance plasmonique longitudinale. Par conséquent, si des impulsions laser sont envoyées à cette longueur d'or les GNR vont pouvoir convertir, grâce à des processus de désexcitation non radiatifs, cette lumière incidente en chaleur. Il est alors possible de repérer par imagerie photoacoustique l'emplacement des nanobâtonnets d'or *in vivo* avec une bonne sensibilité. Un exemple d'imagerie photoacoustique pour détecter les milieux cancéreux est présenté en **figure I.4**. Afin de pouvoir atteindre les GNR *in vivo*, il est nécessaire que l'onde électromagnétique puisse pénétrer profondément dans les tissus, par conséquent le NIR et le SWIR sont les gammes d'énergies préférentielles.

### Agents d'imagerie pour la tomographie X

Les techniques d'imagerie par rayons X fonctionnement en transmission : un faisceau de photons X, émis depuis une source, vient traverser l'objet (ou l'individu) avant d'arriver sur un détecteur. Le contraste de l'image est obtenu par les atténuations relatives des différents tissus traversés. La radiographie X désigne l'imagerie X en 2D. Les images obtenues sont des projections. La tomographie X est une évolution de la radiographie X, puisqu'elle utilise plusieurs projections en 2D pour reconstruire une image en 3D grâce à un algorithme mathématique (tomographie assistée par ordinateur ou "Computed Tomography : CT").

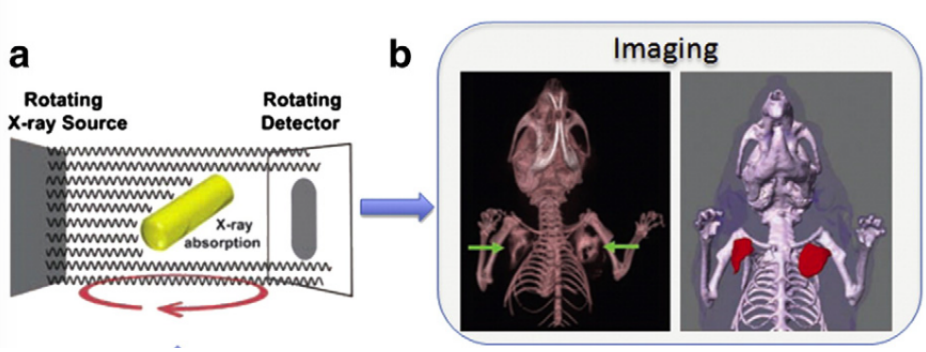



FIGURE I.5 – Utilisation des GNR comme agent de contraste en tomographie de rayon X. (a) Schéma présentant l'absorption des RX par les GNR. (b) Images de CT permettant de repérer les tumeurs marquées avec les deux flèches. Ces images sont adaptées de la publication de Maltzahn *et al.* [25].

Afin d'augmenter le signal d'atténuation des rayons X par rapport aux tissus biologiques, des éléments atomiques ayant un numéro atomique élevé sont incorporés dans l'agent de contraste. L'iode (Z=53) a toujours été l'atome de choix pour les applications de tomographie X. Cependant, les concentrations élevées lors des injections, inhérentes aux produits de contrastes ioniques, ont souvent été associées à des effets indésirables sur les patients [26]. Certains groupes de recherche essaient de développer des nanoparticules porteuses d'iode afin de diminuer la toxicité, via des nanocapsules, des nano-micelles ou encore des nano-émulsions [27]. D'autres groupes de recherches travaillent sur la synthèse de nanoparticules dopées aux lanthanides car ces dernières possèdent également des grands numéros atomiques [28]. Par ailleurs, les nanoparticules d'or représentent un produit de contraste idéal puisque l'or possède à la fois une densité et un numéro atomique élevé [29]. Les AuNP peuvent donc fortement atténuer les rayons X. Il a été montré que l'or sous forme de nanoparticules fournit environ 2,7 fois plus de contraste par unité massique par rapport à l'iode [30]. Ces nanoparticules d'or semblent prometteuses car elles ont une bonne bio-tolérabilité et sont très peu toxiques. La plus grande des limites dans l'utilisation d'agents de contraste en tomographie X est la nécessité d'une forte concentration en produit de contraste, que ce soit avec l'iode ou des NP.

#### Comparaison des imageries utilisant des NP comme agents de contrastes

Table I.1 – Comparaison des différentes techniques d'imagerie

| Technique d'imagerie | Source pour l'imagerie | Résolution spatiale | Profondeur de pénértation | Sensibilité | Type de sondes |
|---|---|---|---|---|---|
| Optique | Vis ou NIR | µm-mm | $< 2$ cm | entre nM et pM | QD, SWCNT, NP dopées terres rares |
| IRM | Ondes radio | 25-100 µm | pas de limite | mM | USPIO, SPIO, NP avec Mn ou Gd |
| Photoacoustique | Vis ou NIR | submm-mm | pls cm | entre nM et pM | AuNP |
| CT | Rayons-X | 50-200 µm | pas de limite | $>$ mM | NP avec de l'Iode AuNP |

### I.1.4 Des nanoparticules pour la thérapie

#### Les NP pour la délivrance de médicaments

Les nanoparticules sont très étudiées dans le domaine de la recherche médicale comme agent de "drug delivery" (délivrance de médicaments). Les NP peuvent être utilisées en tant que vecteur de principes actifs pour le traitement de pathologies, et sont particulièrement intéressantes dans la lutte contre le cancer. Ces nano-objets peuvent apporter de manière spécifique les substances actives dans les tissus à traiter en évitant les effets indésirables du principe actif (PA) dans le reste de l'organisme.
Ces nano-vecteurs particulaires sont de plus en plus utilisés car ils permettent d'apporter des

réponses aux difficultés rencontrées par la thérapie classique comme les nombreux effets secondaires des chimiothérapies. Les nano-vecteurs développés sont de différentes natures : organiques (comme des liposome, des billes de polymères biodégradables) ou inorganiques (comme des AuNP, de la silice poreuse...). Le nano-vecteur permet non seulement de transporter le PA à sa cible mais aussi permet de le protéger d'une dégradation biologique avant d'atteindre le tissu ciblé. Ces nanoparticules ne libèrent le PA qu'en présence d'un stimulus modifiant les propriétés physico-chimiques de la NP. Il peut s'agir d'un stimulus extérieur comme l'activation de la NP par de la lumière (visible, IR, Rayon X...) [31–33], par des ultrasons [34–36], par un champ magnétique [37–40] ou électrique [41–43], par un changement de température [44–47]... Il peut également s'agir d'un stimulus à l'intérieur du corps humain provenant d'un changement d'environnement comme un changement de pH [48–50], de potentiel rédox [51–54] ou encore la présence d'enzyme [55–58]... Ainsi, dans le milieu extracellulaire des tumeurs il y a de nombreux stimuli internes qui peuvent être utilisés par exemple : un changement de pH, l'apparition de nouvelles enzymes (ou de nouvelles concentrations d'enzymes), des changement de potentiel rédox, une diminution de la quantité d'oxygène... Ces différents facteurs sont résumés en **figure I.6**. Un exemple de NP se désassemblant pour du "drug delivery" au sein de tumeurs solides grâce à la différence de pH est schématisé en **figure I.7**.

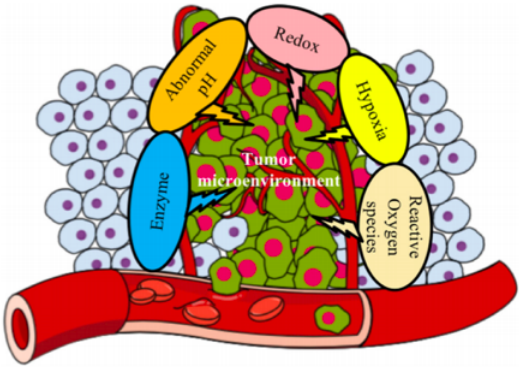



FIGURE I.6 – Résumé des stimuli internes provenant du micro-environnement tumoral. Schéma provenant de la référence [59].

### Les NP comme médicaments

Par ailleurs, certaines nanoparticules inorganiques sont elles-même le principe actif. Par exemple, les nanoparticules d'or sont très utilisées en radiothérapie, on dit que ce sont des radiosensibilisateurs. Lors de la radiothérapie, des rayonnements ionisants sont envoyés sur un patient et localisés dans les tissus cancéreux afin d'endomager l'ADN des cellules cancéreuses pour les détruire. Les AuNP augmentent cet effet : lorsque les atomes d'or absorbent les rayonnements, ils libèrent à leur tour des électrons qui donnent naissance à des espèces radicalaires ou des dérivés réactifs de l'oxygène (noté ROS, "reactive oxygen species") qui augmentent la

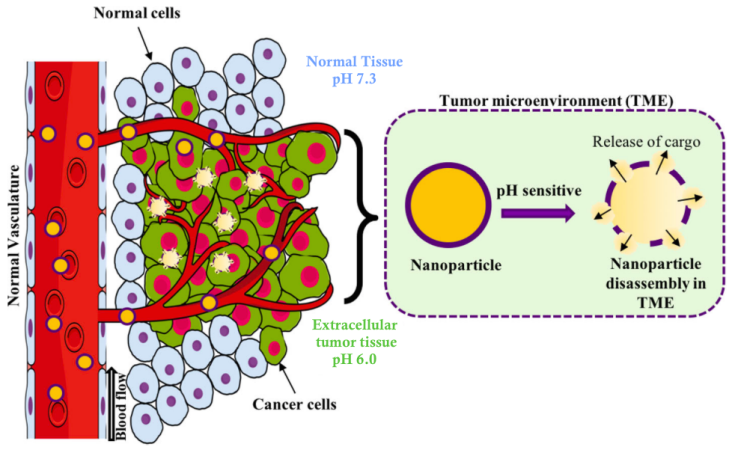



FIGURE I.7 – Illustration schématique de l'activation de nanoparticules par une différence de pH provenant, ici, de l'entrée de la NP dans le micro-environnement tumoral. Schéma provenant de [59].

destruction des tissus. Il y a, en plus, des effets plus subtils comme la diminution de la radiorésistance des cellules par des mécanismes biologiques.

Il faudra donc d'abord vectoriser les NP vers les tissus cancéreux. D'autres NP sont développées pour la radiothérapie, comme des oxydes d'hafmium ou de gadolinium [60] ou encore des nanoparticules avec du bismuth [61].

Les nanoparticules d'or sont aussi très étudiées comme agent thérapeutique en photothermie (PTT) [62]. Comme expliqué dans la partie sur l'imagerie photoacoustique, les AuNP sont capables de convertir les photons absorbés en chaleur grâce à des processus de désexcitation non radiatifs [63]. La thérapie photothermique repose sur l'absorption de la lumière par des nanoparticules et la conversion de cette énergie électromagnétique en chaleur pour détruire les tissus malins. Des études récentes ont montré que cette technique de photothérapie est encore

FIGURE I.8 – Les GNR sont d'excellents agents pour la photothermie. A gauche : un schéma présente le principe de la conversion de lumière en chaleur par les NP. A droite : imagerie de l'augmentation de température observée dans une tumeur présente chez une souris "nude" après excitation des particules dans l'IR. Ces images sont adaptées des travaux de Maltzahn *et al.* [25].

plus efficace avec des rayonnements électromagnétiques dans le domaine du proche IR sur des nanoparticules d'or [64], des nanocoquille d'or [65] ou des GNRs [66,67].

### I.1.5 Les limites des NP pour l'*in vivo*

Bien que les nanoparticules présentent des propriétés physico-chimiques exceptionnelles, il est encore nécessaire de continuer les recherches pour diminuer leur toxicité sur le corps humain. En effet, ces nanoparticules peuvent être toxiques pour un organisme vivant pour différentes raisons : leur composition chimique, leur taille, leur forme, leur chimie de surface...
La composition de la nanoparticule pouvant par exemple contenir des métaux lourds (comme le cadmium) ou des ions toxiques (comme le gadolinium) peut s'avérer extrêmement nocives si la particule se dissout en milieu biologique, c'est à dire si elle ne reste pas sous forme de nanoparticule. Pour pallier ce problème, beaucoup de chercheurs proposent des synthèses de nanoparticules stables (du point de vue de la dissolution) et recouvertes d'une coquille composée d'éléments chimiques moins toxiques.

Par ailleurs, ces particules peuvent aussi s'agréger si elles ne sont pas suffisamment stables en solution, par exemple si les ligands les recouvrant ne sont pas assez fortement ancrés à leur surface. Cela va modifier les propriétés physico-chimiques des particules puisqu'elles ne seront plus de taille nanométrique. Les particules ne pourront, alors, plus jouer leur rôle d'agent thérapeutique ou de diagnostic.

Les particules doivent aussi être le plus furtives possible afin de pouvoir aller jusqu'à leur cible. Cependant, ces particules possèdent une très grande surface spécifique ce qui augmente leurs interactions avec des biomolécules provenant de différents tissus biologiques mais aussi des différents fluides de l'organisme. Ces interactions sont de nature soit électrostatiques soit hydrophobes, soit des liaisons hydrogènes. En fonction de leur taille, les particules peuvent alors être reconnues par le système immunitaire et s'accumuleront dans les macrophages de la rate ou du foie. Cette limitation est majeure et c'est à cause de cela qu'un nombre très limité de NP est aujourd'hui en phase clinique. En effet, Waren C.W. Chan *et al.* montrent qu'aujourd'hui seulement 0,7 % de la dose de NP administrée à un patient est délivrée à une tumeur solide [68]. La chimie de surface des NP est, par conséquent, un des points majeurs à améliorer pour l'utilisation de ces particules *in vivo*.

Il existe différents types de ligands à la surface des NP qui ont des fonctions distinctes : on différencie les ligands de synthèse et les ligands de fonctionnalisation pour des applications biomédicales. Ces derniers ont un rôle primordial dans la furtivité mais aussi le ciblage de la NP *in vivo*.

## I.2 Importance des ligands recouvrant les NP

### I.2.1 Rôle des ligands lors de la synthèse de NP en solution

#### Synthèse colloïdale de NP

Il existe plusieurs techniques de synthèse de NP très différentes. On différencie la méthode dite ascendante ("bottom-up") et la méthode descendante ("top-down"). La méthode ascendante consiste à construire les nano-objets atome par atome, molécule par molécule ou agrégat par agrégat. L'assemblage des atomes, des molécules ou des agrégats s'effectue de façon précise et contrôlée, permettant ainsi l'élaboration de matériaux dont la structure est complètement maîtrisée. La méthode descendante consiste à miniaturiser des objets déjà existants de taille micro ou macrométrique pour se rapprocher des dimensions nanométriques. Ces deux méthodes permettent d'obtenir des nanoparticules, cependant, la méthode ascendante est la technique favorisée par les chimistes car elle permet un bien meilleur contrôle de l'architecture et des tailles de nanoparticules synthétisées.

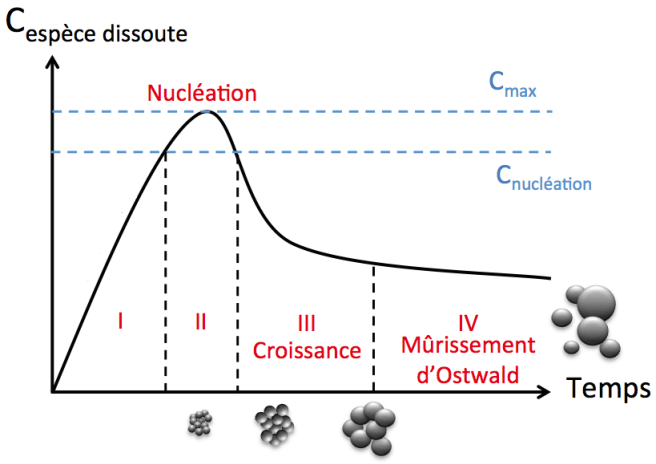



Figure I.9 – Diagramme de La Mer

La synthèse de nanoparticules en phase liquide par voie colloïdale est une technique extrêmement utilisée aujourd'hui et fait partie des techniques dites ascendantes. Elle consiste, tout d'abord, à former des germes solides puis à réussir, par la suite, à contrôler leur croissance. Le diagramme de La Mer (**figure I.9**) illustre le processus de nucléation et de croissance [69]. Dans une première partie (étape I), il y aura la formation de précurseurs de charge nulle qui sont des précurseurs du solide (même composition) mais se trouvent dissouts en solution. Cette concentration en espèces dissoutes va augmenter au cours du temps jusqu'à atteindre une concentration critique, concentration de nucléation, qui correspond à la concentration minimum à partir de laquelle les premiers solides vont pouvoir se former de manière stable. L'étape II correspond à l'étape de nucléation. La sursaturation en espèces dissoutes entraine la formation de germes

aussi appelés nucléi, nanoparticules très petites de 1 à 2 nm. En dessous de cette concentration, les nucléi ne peuvent pas se former de manière stable. L'étape III est la croissance des germes. Au cours de cette étape, les espèces dissoutes vont faire grossir les germes sans en créer de nouveaux. Dans un dernier temps, il peut se produire une étape indésirable appelée mûrissement d'Ostwald, qui correspond à la dissolution des petites NP (ayant une énergie de surface très élevée) puis dépôt à la surface des NP plus grandes, entraînant leur croissance. Cette dernière étape entraine un grossissement inhomogène des nanoparticules et ces dernières auront alors toutes des tailles différentes. Afin d'obtenir des nanoparticules uniformes en taille, il est nécessaire de bien séparer les étapes de nucléation et de croissance. L'étape de nucléation doit être brève et l'étape de croissance doit être vraiment contrôlée afin que toutes les particules grossissent simultanément.

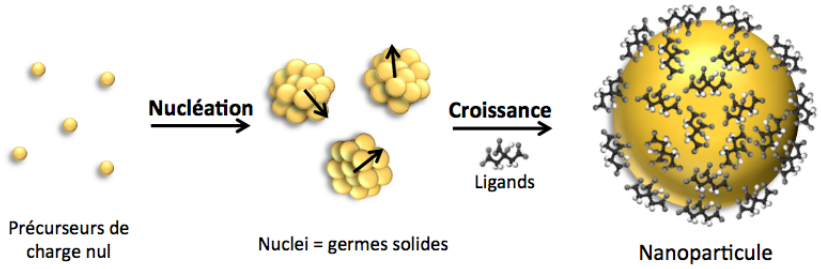



FIGURE I.10 – Schéma de synthèse des nanoparticules avec des ligands contrôlant à la fois l'étape de croissance mais aussi permettant la suspension colloïdale des NP.

### Les ligands de synthèse

Lors de la synthèse de NP par voie colloïdale, il y a aussi très souvent la présence de ligands organiques qui jouent un rôle fondamental dans l'étape de croissance des germes mais aussi dans la stabilité colloïdale des NP (sauf dans le cas de certains oxydes). Ces ligands sont appelés les ligands de synthèse. En effet, les NP sont attirées entre elles par des forces de Van der Waals ce qui peut entraîner l'agrégation des NP entre elles. Il est nécessaire d'ajouter des ligands adéquats de synthèse qui vont se fixer à la surface des NP, ce qui crée une répulsion stérique ou électrostatique entre NP et empêche leur agrégation.

Ces ligands de synthèse sont impliqués dans le contrôle de l'étape de croissance des particules pendant la synthèse. Ces ligands représentent une barrière stérique lors de la croissance de couches monoatomiques que les précurseurs de charge nulle doivent franchir pour se déposer à la surface des NP. Cette barrière va ralentir, voire stopper la croissance des cristaux [70]. Le type de ligands, ainsi que sa concentration lors de la synthèse des NP seront donc déterminants pour la taille des NP formées et aussi pour leur forme [71]. Un exemple de synthèse de NP avec un schéma montrant le contrôle de la croissance par les ligands est présenté en schéma sur la

figure **I.10**.

Après la synthèse, les ligands protègent les NP de l'agrégation des particules entre elles en créant des forces de répulsion stériques interparticulaires. Il est nécessaire que les ligands soient relativement bien ancrés à la surface des NP, car s'ils se décrochent de la surface, les particules perdent leur stabilité colloïdale.

### I.2.2 Les ligands de fonctionnalisation et la stabilité colloïdale des NP dans l'eau

La chimie de surface des nanoparticules doit être totalement compatible avec le milieu dans lequel se trouvent les NP, par exemple biocompatible, furtive et non toxique pour des applications *in vivo*. En général, les ligands de synthèse ne sont pas adaptés et il est nécessaire de modifier cette chimie de surface. Plusieurs stratégie peuvent être employées :

— une encapsulation de la NP avec une couche inorganique,
— une encapsulation de la NP avec une couche de molécules organiques,
— un échange de ligands avec des ligands fonctionnels.

L'encapsulation de NP avec une couche inorganique telle que de la silice est une méthode très souvent employée car elle peut permettre de transférer les NP d'un milieu organique (si la synthèse n'est pas faite dans l'eau) à un milieu aqueux. Par ailleurs, la silice ne va modifier ni les propriétés optiques, ni magnétiques, ni électroniques des NP. Elle forme une surface biocompatible relativement stable en milieu aqueux et peut être fonctionnalisée par la suite. Par exemple, l'équipe de Li *et al.* développe des coquilles de silice autour de NP d'oxyde de fer [72], ou encore Dabandi *et al.* ont encapsulé des quantum dots dans de la silice via une microémulsion. En présence de tensioactifs, des gouttelettes de QDs sont formées afin de faire une hydrolyse puis une condensation d'alkoxysilane à l'interface pour créer une capsule de silice autour des QD [73].

Une autre technique qui permet de transférer des NP dans l'eau, si celles-ci se trouvent initialement en milieu organique, est l'encapsulation par des molécules amphiphiles. La partie hydrophobe joue le rôle de fonction qui interagit avec la couche de ligands hydrophobes présents à la surface de la nanoparticule par interactions de Van Der Waals. La partie hydrophile permet, quant à elle, la bonne dispersion dans l'eau des nanoparticules. L'encapsulation par des molécules amphiphiles est cependant une technique peu stable.

La dernière technique est directement un échange entre les ligands de synthèse et des ligands fonctionnels. Cette technique sera favorisée dans cette thèse car elle est plus versatile et plus robuste ce qui augmentera la stabilité des NP. Ces ligands fonctionnels se composent de deux parties : la première est une fonction d'ancrage à la surface de la NP et la seconde est une partie hydrophile afin de solubiliser et de stabiliser les NP dans l'eau. En fonction du type de

NP inorganique, différentes fonctions d'accroche sont utilisées. Par exemple, les surfaces d'or ont beaucoup d'affinité pour les thiols [74] ou les carbènes N-hétérocycliques [75] ; les surfaces d'oxydes de fer être peuvent chélatées par les phosphonates [76] ou les catéchols [77], ou encore les Quantum Dots peuvent être recouvert par des thiols ou des imidazoles (cela sera détaillé en partie I.4.3. de ce chapitre).
Dans la suite de cette thèse, à chaque fois que nous parlerons de ligands, il s'agira des ligands de fonctionnalisation.

### I.2.3 Importance des ligands dans la furtivité des NP

Lorsque l'on souhaite développer des nanoparticules pour l'imagerie ou la thérapie, il est nécessaire de faire très attention à la chimie de surface des NP utilisées. Il faut que les NP soient hydrophiles mais aussi qu'elles soient le plus furtives possible dans le milieu dans lequel elles se trouvent. C'est à dire que les ligands de surface doivent avoir un minimum d'interactions non spécifiques avec l'ensemble des biomolécules présentes dans le milieu (protéines, peptides, lipides...). Ceci est un pré-requis fondamental pour l'utilisation *in vivo* ou *ex vivo* des particules. Afin d'utiliser des nanoparticules dans des milieux biologiques, il est primordial de mieux comprendre ces interactions. Actuellement, une des grandes limitations pour leur utilisation est l'adsorption non spécifique de protéines à la surface des nanoparticules [78–82]. En effet, il y a très fréquemment apparition d'une couronne de protéines à la surface des nanoparticules lorsque celles-ci se trouvent dans des fluides biologiques tels que du sang, du plasma, un milieu intracellulaire... Les conséquences de l'apparition d'une couronne de protéines autour des NP sont les suivantes :

- masquer les fonctions de ciblage
- entrainer une agrégation et/ou une immobilisation des particules
- les particules vont finalement se faire capturer dans les macrophages par opsonisation (processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane de la NP pour favoriser sa phagocytose).

Deux types de ligands différents sont principalement utilisés dans la littérature pour réduire ces interactions non spécifiques : les polymères PEG (polyéthylène glycol) et les zwitterions.

#### Les ligands à base de PEG

Le polymère PEG (PolyEthylène Glycol) est un polymère linéaire qui appartient à la famille des polyéthers. Il est hydrophile et peut être facilement solubilisé dans l'eau et aussi dans différents solvants organiques (DMSO, alcools, chloroforme, toluène). Des nanoparticules recouvertes de PEG sont dites PEGylées. Le PEG permet une bonne suspension colloïdale des particules et permet de réduire leur agrégation. Beaucoup d'équipes de recherches travaillent sur des NP PEGylées car il a été observé que ce type de chimie de surface permet une réduction des interactions non spécifiques avec des éléments biologiques [83]. Cela est certainement dû à

deux phénomènes : la répulsion stérique du polymère avec les biomolécules et une barrière créée par l'hydratation de la couche de PEG, renforcée par des liaisons hydrogènes. Il a été montré que plus la chaine de PEG est dense et longue plus les NP PEGylées sont furtives [84, 85]. De nombreuses groupes de recherche utilisent ces ligands pour leur propriétés de furtivité. Bien que cette chimie de surface réduise l'adsorption non spécifique, elle ne l'élimine pas complètement. De nombreuses équipes travaillent sur des analyses protéomiques afin d'être capable de savoir exactement quelles protéines s'adsorbent à la surface des NP [86]. *In vivo*, comme les surfaces PEGylées sont furtives, elles allongent le temps de circulation des NP en empêchant leur opsonisation, ce qui aurait entraîné la phagocytose et leur capture par des macrophages de l'organisme. L'utilisation du PEG a permis aussi une meilleure stabilité des NP sur une grande gamme de pH. Il a été montré qu'une forte densité de PEG et qu'une longueur de chaine entre 600 et 1000 g/mol est nécessaire pour obtenir une bonne stabilité des NP [87]. Par ailleurs, le PEG est un peu moins hydrophile à température physiologique et en milieu très salin qu'à température ambiante dans de l'eau pure.

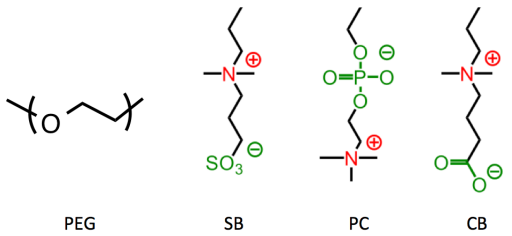



Figure I.11 – Schéma des fonctions chimiques PEG et de trois zwitterions (SB, PC et CB).

### Les ligands à base de Zwitterions

Les zwitterions sont des espèces chimiques possédant à la fois une charge positive et une charge négative séparées uniquement par quelques atomes de carbone, en général 3 ou 4. Ces espèces sont donc globalement neutres. Les zwitterions semblent être une alternative intéressante au PEG de par leur taille plus compacte. En effet, certaines études montrent que des substrats recouverts de zwitterions présentent des propriétés de furtivité similaire aux surfaces recouvertes de PEG [88, 89]. Les zwitterions sont aussi très stables en milieu salin. Trois zwitterions sont principalement utilisés : le carboxybétaine (CB), le phosphorylcholine (PC) et le sulfobétaine (SB). Ces zwitterions sont tous composés d'un ammonium quaternaire, chargé positivement, et ils diffèrent de par leur charge négative, respectivement : un ion carboxylate, un phosphonate et un sulfonate. Le PC et le SB sont neutres, donc sous forme zwitterionique sur une très grande gamme de pH grâce aux pKa très faibles correspondant à l'acidité des phosphates et des sulfonates. Le CB, en revanche, devient moins stable à pH acide à cause de l'ion carboxylate qui possède un pKa plus élevé (autour de 4), ce qui lui confère un caractère polyélectrolyte.
Des ligands zwitterioniques ont été testés sur différents types de NP. L'équipe de Bawendi a

recouvert des particules d'oxyde de fer (les SPIO) avec des ligands zwitterioniques pour des applications biologiques d'agent de contraste en IRM [90]. L'équipe de Schlenoff propose de stabiliser des nanoparticules de silice avec un ligand zwitterionique organosiloxane. Ils montrent que ces particules ne s'agrègent pas, même dans des conditions de salinité extrême ([NaCl] = 3 M) ou en présence de sérum de veau fœtal [91]. L'équipe de Shen montre qu'en présence de ligands phosphorylcholines, la stabilité de NP d'or est augmentée [92]. Notre laboratoire a aussi beaucoup travaillé sur les ligands zwitterioniques comme détaillé dans la dernière partie de ce chapitre.

### I.2.4 Importance des ligands dans le ciblage des NP

Le ciblage des NP est un point clé pour l'imagerie ou pour la thérapie. Les NP doivent aller le plus rapidement possible vers leur cible. Pour cela il est nécessaire que leur chimie de surface soit totalement maîtrisée. Cela nécessite d'avoir des ligands furtifs qui permettent un long temps de circulation, afin que la NP ait le temps d'atteindre sa cible ; mais aussi un ou des ligands qui permettent la reconnaissance de la cible, également appelée bioconjugaison. Il existe plusieurs stratégies de ciblage basées soit sur des interactions faibles (liaisons hydrogène, forces de van Der Waals...) soit sur des interactions fortes via des liaisons covalentes. Ces stratégies impliquent la présence, sur la surface de la NP, d'une fonction capable de reconnaitre la cible, il s'agit souvent d'une biomolécule. Il existe principalement trois types de biomolécules :

- Des peptides ou protéines (enzyme ou anticorps). Par exemple, la RGD peut être greffé à la surface de NP car sur une grande variété de cellules cancéreuses des récepteurs intégrine $\alpha_v B_3$ sont sur-exprimés [93].
- Des petites molécules organiques ayant une forte affinité pour un élément complémentaire. Par exemple, le couplage biotine-streptavidine est très employé car leur assemblage est très favorisé. La réaction d'assemblage de ces deux molécules possède une constante d'affinité $\mathrm{K}_{aff} = \mathrm{k}_{on}/\mathrm{k}_{off} = 10^{14}\ \mathrm{M}^{-1}$ !
- Le couplage avec un brin ADN est aussi très utilisé. La reconnaissance avec un brin complémentaire possède une affinité exceptionnelle, ce qui en fait une biomolécule de reconnaissance de choix.

### I.2.5 Fonctionnalités supplémentaires apportées par les ligands

Il est aussi possible d'utiliser les ligands pour rendre les NP sensibles à leur environnement. Des ligands peuvent, par exemple, permettre l'assemblage de la NP et, sous un stimulus externe, libérer les NP pour les utiliser comme agents thérapeutiques, comme nous l'avons détaillé dans la première partie de ce chapitre.

Les ligands peuvent aussi permettre d'ajouter de nouvelles fonctionnalités aux NP utilisées pour créer alors des particules multi-fonctionnelles. Par exemple, les équipes de Mulder et Bakalova fonctionnalisent des NP fluorescentes avec des ligands organiques paramagnétiques,

permettant d'avoir une sonde bimodale pour faire de l'IRM et de l'imagerie optique [94, 95]. Certaines équipes font l'inverse : greffer une sonde fluorescente organique via des ligands à la surface de particules magnétiques, comme l'équipe de Bertorelle [96]. Il est aussi possible d'utiliser les ligands à la surface des NP pour assembler de façon covalente plusieurs types de NP. L'équipe de Wang propose d'assembler des oxydes de fer avec des quantum dots. Leur stratégie est d'accrocher les QD à des fonctions thiols présentes sur les ligands à la surface des oxydes de fer [97].

Les ligands peuvent aussi moduler les propriétés physico-chimiques des NP. En effet, il est possible, par exemple, de modifier la fluorescence de quantum dots ou de NP à luminescence persistante par transfert d'énergie avec un accepteur [98]. Beaucoup de chercheurs travaillent sur l'excitation de molécules organiques fluorescentes grâce à un transfert d'énergie avec des quantum dots excités [99, 100].

En conclusion, il y a deux types de ligands de surface des NP : les ligands de synthèse et les ligands de fonctionnalisation. Ces derniers sont extrêmement importants car ils permettent une bonne suspension colloïdale des NP dans l'eau, ils peuvent rendre les particules plus ou moins furtives et c'est aussi eux qui permettent de faire du ciblage contrôlé ! Ils peuvent aussi jouer un rôle fonctionnel en modulant les propriétés physico-chimiques des NP.

Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons à un type particulier de NP inorganique : les Quantum Dots, car ce sont des nanocristaux fluorescents prometteurs pour l'imagerie optique de fluorescence *in vivo*.

## I.3 Quantum Dots : généralités

### I.3.1 Présentation et historique des QD

Les Quantums Dots sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. Ces nanocristaux fluorescents artificiels sont, pour la plupart, constitués d'un coeur cristallin nanométrique (quelques nanomètres de diamètre) recouvert d'une ou de plusieurs coquilles d'autres matériaux semi-conducteurs, comme représenté sur la **figure I.12(A)**. Ces Quantum Dots présentent des propriétés physiques et chimiques intéressantes dépendant de leur taille dues à deux effets. Le premier effet est le ratio surface/volume qui augmente lorsque la taille diminue. Les atomes situés sur les faces, arêtes ou sommets ont alors des environnements différents des atomes de coeur, ce qui va conférer aux nanoparticules une réactivité chimique bien particulière. Le second effet se produit à partir d'une taille suffisamment petite, il s'agit d'un effet de confinement quantique [101] décrit par la suite. Ces nanocristaux inorganiques, recouverts d'une couche de molécules organiques permettant la suspension colloïdale, possèdent des propriétés physiques modulables en fonction de leur taille, de leur composition et de leur chimie de surface. Ces nanoparticules ont, notamment des propriétés de luminescence très intéressantes car, après ex-

citation, elles peuvent émettre de la lumière sur une grande gamme d'énergie en fonction de la taille de la nanoparticule. Par exemple, sur la **figure I.12(B)** se trouvent des QD de CdSe qui peuvent émettre des photons sur toute la gamme du visible. Comme nous le verrons dans la suite, les QD peuvent aussi émettre dans l'infrarouge (IR), c'est pourquoi ces particules présentent un grand intérêt pour l'imagerie biomédicale.

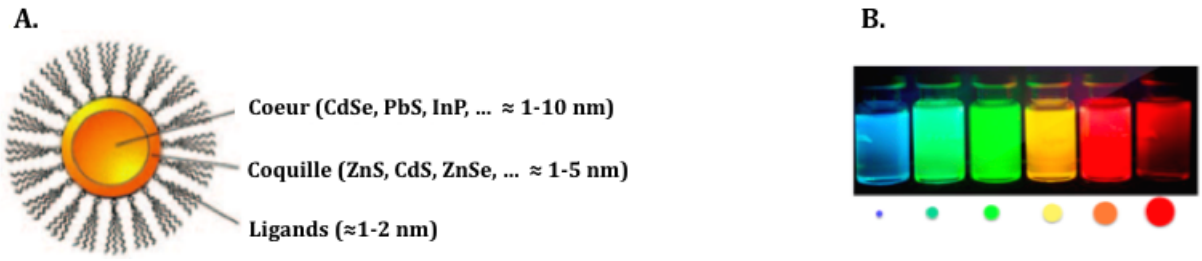



FIGURE I.12 – **A.** Structure schématique d'un nanocristal semi-conducteur fluorescent colloïdal coeur-coquille [102], **B.** Image de Quantum dots montrant la variation de leur émission de fluorescence en fonction de leur taille

Depuis les années 80, des chercheurs travaillent sur l'amélioration ou la découverte de nouvelles synthèses de QD. Ces matériaux diffèrent entre eux de par leur forme, leur composition, leur structure cristalline, leur taille [103]. Les semi-conducteurs peuvent être, par exemple, composés d'éléments de la colonne II et VI du tableau périodique, ces matériaux sont nommés QD de type II-VI (CdS, CdSe, CdTe, ZnS) [104]. Il existe aussi les QD de type III-V (GaAs, GaP, InP, InSb, InAs) [105], de type I-III-$VI_2$ ($CuInS_2$ et $CuInSe_2$) [106] et enfin de type IV-VI (PbS, PbSe) [107].

La première synthèse de nanocristaux fluorescents a été effectuée par l'équipe d'Ekimov en 1981, en faisant croitre des cristallites de sulfure de cadmium CdS dans une matrice de verre soumise à un gradient de température [108]. Ainsi, les cristallites possèdent une taille dépendant de leur position dans la matrice de verre, et fluorescent à une énergie d'autant plus grande que leur taille est petite. Peu de temps après, cette équipe a également été la première à remarquer la corrélation entre la taille des particules et les propriétés optiques. L'équipe de Brus en 1984, confirme cette observation sur les QD synthétisés par voie colloïdale [109]. Par la suite, dans les années 90, Bawendi, Norris et Murray ont publié les premiers résultats sur les synthèses de tout nouveaux nanocristaux colloïdaux : CdSe, CdS, CdTe. Ils proposent aussi des synthèses de QD plus monodisperses et ils commencent à caractériser les structures cristallines [70]. Depuis, de très nombreuses équipes de recherche essaient de développer de nouvelles synthèses ou d'améliorer celles déjà existantes. Les challenges sont multiples : améliorer la monodispersité de la synthèse, augmenter le rendement de synthèse, augmenter la brillance des particules (le rendement quantique), diminuer leur toxicité mais aussi améliorer la compréhension des propriétés optiques.

### I.3.2 Propriétés électroniques des QD

Les propriétés électroniques d'un semi-conducteur, d'un métal ou d'un isolant sont décrits selon la théorie des bandes. Dans un matériau conducteur, la dernière bande d'énergie complètement remplie d'électrons (bande de valence) et la bande permise suivante (bande de conduction) se chevauchent, ce qui permet aux électrons de circuler dans tout le solide. Dans un isolant, ces bandes sont séparées par une bande interdite tellement grande que les électrons ne peuvent passer de la bande de valence (BV) à la bande de conduction (BC).
A l'état massif, la structure électronique d'un semi-conducteur massif non dopé présente une BV pleine et une BC vide, séparées par une bande interdite, "gap", de largeur $E_g$. Après excitation laser avec des photons d'énergie $h\nu \geq E_g$, on peut transférer un électron de la BV à la BC, créant ainsi un trou dans la BV. Il existe une interaction coulombienne entre l'électron et le trou. Cet appariement électron-trou est appelé exciton. Dans un cristal de taille nanométrique, les bandes se séparent en niveaux discrets à cause des conditions aux limites imposées par la petite taille du nanocristal, comme présenté sur la **figure I.13**. Un nanocristal peut être

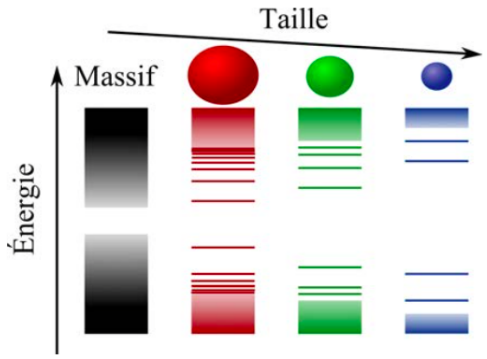



FIGURE I.13 – Structure schématique du confinement quantique des Quantum Dots. Figure tirée de la réf [102]

considéré comme un puits de potentiel de taille nanométrique où sont confinés les électrons. Cette taille étant du même ordre de grandeur que celle de la longueur d'onde associée aux électrons (principe d'équivalence particules ⇔ onde de Broglie), cela joue un rôle sur la structure électronique et tend à écarter les niveaux électroniques les uns des autres, d'autant plus que le rayon du nanocristal est faible : c'est le phénomène de "confinement quantique". Donc plus la taille du nanocristal est faible, plus l'énergie du gap augmente (i.e. la longueur d'onde diminue) comme représenté sur la **figure I.13**.

Alivisatos *et al.* montrent que le confinement quantique dépend de la taille et de la composition du matériau [110]. La distance moyenne entre les porteurs de charges (l'électron et le trou) au sein de l'exciton est appelé rayon excitonique. Il est l'analogue du rayon de Bohr défini pour l'hydrogène, c'est pourquoi on parle de rayon de Bohr excitonique : $a_0$. Lorsque l'une des dimensions d'un nanocristal est inférieure à $2a_0$ alors il y aura présence de confinement quantique. Dans le cas des nanocristaux sphériques de semi-conducteur (QD), les porteurs de charges sont

confinés dans les 3 directions de l'espace. Il existe aussi des nanocristaux de semi-conducteurs dont les porteurs de charges ne sont confinés que dans 2 dimensions (les nano-bâtonnets) [111] ou même dans une seule dimension (les nanoplaquettes : NPLs) [112]. Des schémas de ces différents types de nanocristaux sont présents en **figure I.14**. Au cours de cette thèse, seuls les QD seront utilisés.

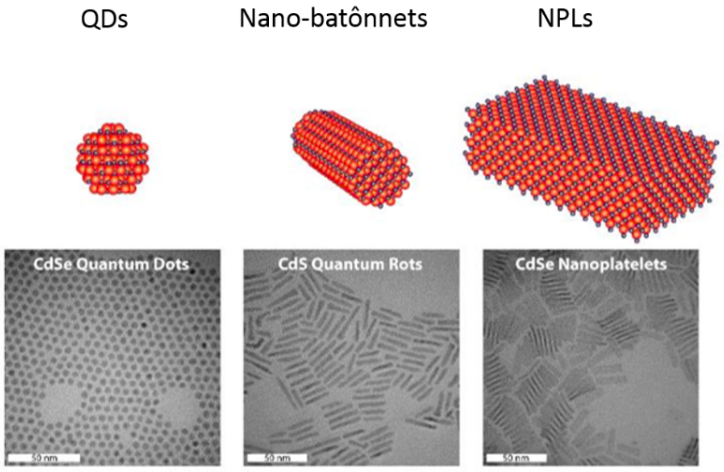



FIGURE I.14 – Représentation schématique des trois types de confinements des porteurs de charges dans les nanocristaux de semi-conducteurs. Les images de microscopie électronique en transmission proviennent de [102].

La composition des nanocristaux peut aussi influencer les propriétés de confinement quantique. Par exemple, le rayon de Bohr excitonique de QD CdSe (zinc blende) vaut $a_0$ = 5,4 nm [113], alors que celui de QD ZnS (zinc blende) vaut $a_0$ = 2,5 nm [114].

Ce confinement quantique modifie la valeur du gap entre la bande de valence (BV) et la bande de conduction (BC). Plus les nanocristaux sont petits plus le confinement quantique est fort et plus l'énergie du gap $E_g$ augmente. Ce dernier est exprimé avec l'équation I.1, avec $E_{\text{massif}}$ la valeur du gap du matériau massif, $E_{\text{confinement}}$ l'énergie due au confinement quantique et $E_{\text{coulomb}}$ l'énergie liée à l'interaction Coulombienne de l'exciton.

$$E_g = E_{\text{massif}} + E_{\text{confinement}} + E_{\text{coulomb}} \tag{I.1}$$

### I.3.3 Structures cristallines des QD

Les nanocristaux de semi-conducteurs sont des empilements d'atomes extrêmement ordonnés. Ils forment un monocristal au sein duquel les atomes se trouvent dans des mailles. Dans cette thèse, nous avons eu recours à des nanocristaux de semi-conducteurs de type II-VI tels que les CdSe mais aussi des I-III-VI tels que les $CuInSe_2$ et encore des IV-VI tels que les PbS. Les CdSe présentent principalement des structures zinc blende et wurtzite, telles que présentées en **figure I.15**. La cristallisation en zinc blende correspond à un empilement cubique face centrée

des ions $Se^{2-}$ dont la moitié des sites tétraédriques est occupée par les $Zn^{2+}$. La maille de type wurtzite, quant à elle, correspond à un empilement hexagonal compact. La différence de cristallinité entre deux QD de même composition chimique induit une différence sur la valeur de l'énergie du gap à l'état massif [115] : CdSe wurtzite $E_{massif}$ = 1,74 eV et CdSe zinc blende $E_{massif}$ = 1,66 eV.

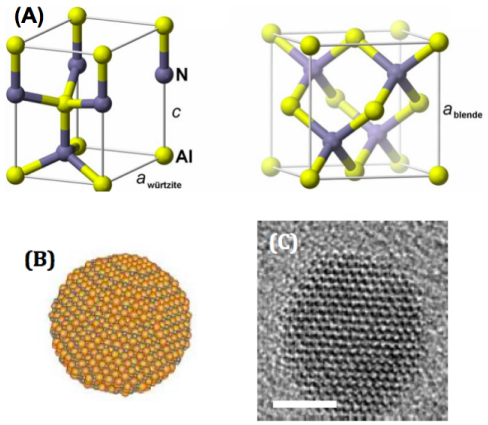



FIGURE I.15 – (A) Représentation des structures cristallines wurtizte et zinc blende dans le cas des CdSe avec en gris les ions $Cd^{2+}$ et en jaune les $Se^{2-}$. (B) Modélisation d'un QD. (C) Microscopie TEM d'un QD, l'échelle correspond à 5 nm.

Les QD de chalcogénures de cuivre et d'indium (comme $CuInSe_2$) existent sous trois formes cristallines qui sont présentées en **figure I.16** : la structure chalcopyrite (quadratique), sphalérite (cubique) et wurtzite (hexagonale). Dans ces trois cas, les quatre cations forment des tétraèdres autour d'un atome de soufre, c'est la façon dont se font les enchaînements de plans contenant les cations qui vont déterminer si nous avons une structure quadratique/cubique (ABC) ou hexagonal (ABAB). Donc ces différentes structures traduisent le type d'empilement des anions et l'organisation des cations dans les sites tétraédriques.

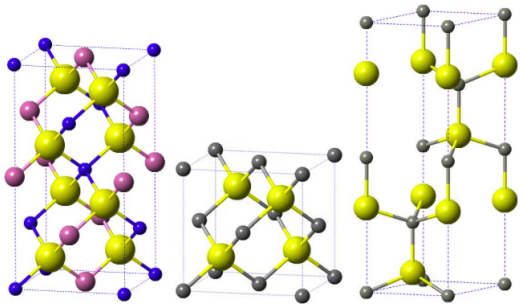


FIGURE I.16 – Schéma des structures cristallines existantes pour les chalcogénures de cuivre et d'indium. En jaune : les anions ($Se^{2-}$). Les cations sont représentés en gris pour les structures wurtzite (au milieu) et sphalérite (à droite) et en rose ($In^{3+}$) et en bleu ($Cu^{+}$) dans le cas de la chalcopyrite (à gauche).

Les QD à base de PbS cristallisent sous forme de rocksalt (type NaCl) donc cubique faces

centrées avec les ions $S^{2-}$ sur les sommets du cube et au centre de chaque face et les ions $Pb^{2+}$ occupent tous les sites octaédriques comme représenté sur la **figure I.17**.

Dans le tableau suivant I.2, se trouvent les valeurs caractéristiques des QD utilisés au cours de cette thèse : CdSe (wurtzite), $CuInSe_2$ (sphalérite) et PbS (rocksalt). Les valeurs de "band-gap" sont données dans le cas du matériau massif et un intervalle est donné dans le cas de nanocristaux avec les longueurs d'ondes correspondantes qui dépendent de la taille des NP. Les valeurs des rayons de Bohr excitoniques sont également fournies.

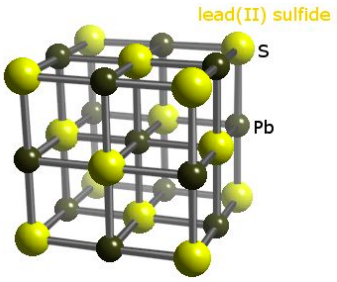



FIGURE I.17 – Schéma de la structure cristalline rocksalt de PbS. En jaune sont représentés les ions $S^{2-}$ et en gris les ions $Pb^{2+}$.

TABLE I.2 – Valeurs caractéristiques des QD utilisés au cours de cette thèse : CdSe (wurtzite), $CuInSe_2$ (sphalérite) et PbS (rocksalt). $E_{Massif}$ est la valeur de l'énergie de la bande interdite dans le cas du matériau massif ; $E_g$ correspond aux valeurs de "band-gap" possible dans le cas d'un nanomatériaux avec $\lambda_{NP}$ la correspondance en longueur d'onde ; et $a_0$ correspond au rayon de Bohr de chacun de ces matériaux.

| | $E_{Massif}$ | $E_g$ | $\lambda_{NP}$ | $a_0$ |
|---|---|---|---|---|
| CdSe (würtzite) | 1,74 eV | 1,77 - 2,48 eV | 700 - 500 nm | 5,6 nm |
| $CuInSe_2$ (sphalérite) | 1,04 eV | 1,2 - 2,4 eV | 1030 - 520 nm | 10,6 nm |
| PbS (rocksalt) | 0,41 eV | 0,71 - 1,28 eV | 1740 - 900 nm | 18 nm |

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons faire l'hypothèse que ces QD sont sphériques bien qu'en réalité ils puissent être plus ou moins facettés.

### I.3.4 Propriétés optiques des QD

#### Absorption et émission de fluorescence

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des QD permettent de caractériser les propriétés optiques de ces matériaux. La **figure I.18** présente les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence de solutions colloïdales de CdSe de différentes tailles.

En absorbance, il est possible d'observer plusieurs pic excitoniques, qui correspondent aux transitions de différentes énergies entre la BV vers la BC et témoignent de la discrétisation

des niveaux d'énergie dans la particule [113]. Le pic excitonique ayant la plus grande longueur d'onde (appelé premier pic excitonique) correspond à l'énergie du "band-gap" donc à $E_g$. Au fur et à mesure que le diamètre des particules diminue, le confinement quantique est de plus en plus fort donc $E_g$ augmente, par conséquent la longueur d'onde du premier pic excitonique diminue. Il est très intéressant de remarquer que le rapprochement des niveaux d'énergie loin des bords de bandes dans les QD engendre un continuum énergétique aux basses longueurs d'onde, donc aux énergies bien supérieures à l'énergie du premier pic excitonique.

Au niveau expérimental, le spectre d'absorption d'une synthèse de QD permet de remonter à la taille des particules, à la polydispersité de la synthèse et aussi à la concentration. Par exemple, dans le cas de synthèses de CdSe, Yu *et al.* proposent la formule I.2 pour obtenir le diamètre moyen, $d$ en nm, des QD en fonction de la longueur d'onde du premier pic excitonique $\lambda$ en nm.

$$d = 9,8127.10^{-7}\lambda^3 - 1,7147.10^{-3}\lambda^2 + 1,006\lambda - 194,84 \tag{I.2}$$

Leatherdale *et al.* proposent aussi de relier le coefficient d'absorption molaire à 350 nm, $\epsilon_{350}$ en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, des QD CdSe en fonction de leur diamètre, selon l'équation I.3 avec $d$ exprimé en cm. Avec la loi de Beer-Lambert, il est ensuite possible de remonter à la concentration.

$$\epsilon_{350} = 1,438.10^{26}(d/2)^3 \tag{I.3}$$

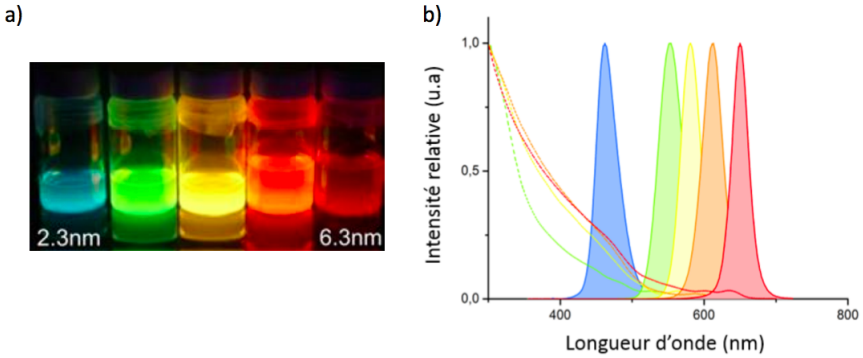



FIGURE I.18 – a) Image de la fluorescence de solutions colloïdales de CdSe de tailles différentes. b) Superposition des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des CdSe de différentes tailles.

Après avoir absorbé un photon d'énergie supérieur au "band-gap", la paire électron-trou est formée, le QD est dans un état excité. Cette paire va ensuite se recombiner (plus ou moins vite en fonction du type de QD) et émettre un photon dont l'énergie est égale (ou légèrement inférieure) à celle de la bande interdite, le QD se désexcite pour revenir à son état fondamental. Il y a une différence d'énergie, donc de longueur d'onde, entre l'absorption du premier exciton et l'émission de fluorescence. Il s'agit du déplacement de Stokes, qui est aussi présent dans le cas de molécules fluorescentes organiques. L'émission de fluorescence est donc caractérisée par une

longueur d'onde qui dépend de la taille du nanocristal, mais aussi d'une largeur à mi-hauteur qui traduit la dispersité de la synthèse dans l'échantillon. Par exemple, pour les QD visibles, une synthèse est considérée comme monodisperse si la largeur à mi-hauteur est inférieur à ≈ 30 nm (valable pour une longueur d'onde d'émission $\lambda_{Em} \approx 600$nm).

Les trois matériaux présentés dans la partie précédente (CdSe (würtzite), $CuInSe_2$ (sphalérite) et PbS (rocksalt)) sont tous trois fluorescents mais dans des domaines d'énergie différents, voir **figure I.19** : les CdSe dans le visible (≈ 560 - 650 nm), les $CuInSe_2$ dans le proche infrarouge (≈ 600 - 1000 nm) et les PbS dans l'infrarouge court (≈ 900 - 1650 nm).

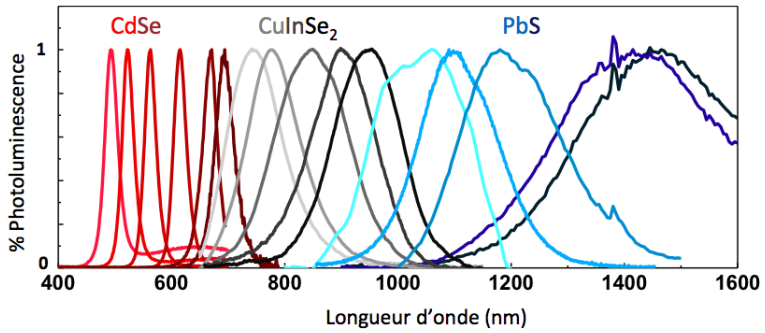



FIGURE I.19 – Spectres d'émission de fluorescence de différentes tailles de CdSe (en nuance de rouge), de $CuInSe_2$ (en nuance de gris) et de PbS (en nuance de bleu).

### Rendement quantique de fluorescence

Les QD peuvent aussi être caractérisés par leur rendement quantique de fluorescence. Il s'agit du rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés. Ce rendement peut être calculé en effectuant une comparaison avec une sonde fluorescente de référence ayant un rendement quantique connu. Le calcul du rendement quantique se fait à l'aide des spectres d'absorption et de fluorescence pour la référence et le QD, ainsi qu'à l'aide de la formule I.4 ; $QY$ signifie rendement quantique (Quantum Yield). Le symbole $\int I$ correspond à l'intégrale du signal de fluorescence, $n$ est l'indice de réfraction et $OD$ est relié à l'absorbance : il s'agit de la densité optique.

$$QY_{QD} = QY_{ref} \cdot \frac{\int I_{QD}}{\int I_{ref}} \cdot \frac{OD_{ref}}{OD_{QD}} \cdot \frac{n_{QD}^2}{n_{ref}^2} \tag{I.4}$$

La valeur du rendement quantique permet de connaître la proportion de désexcitation par la voie radiative par rapport aux autres voies de désexcitation dans un QD. Il peut y avoir, comme dans des molécules organiques, des recombinaisons non radiatives par dissipation de l'énergie par effet Joule. Par ailleurs, dans des nanocristaux il y a un très grand rapport surface sur volume or la présence de défauts de structure cristalline ou une mauvaise passivation à la surface ou

encore la présence d'impuretés, peuvent créer des pièges de surface entraînant de nouvelles désexcitations non radiatives [116, 117]. Ces phénomènes secondaires nuisent aux rendements quantiques c'est pourquoi ces QD sont la plupart du temps sous forme de coeur/coquille (ou coeur/coque).

### I.3.5 Des QD de type cœur/coque

Pour la plupart des QD, il est nécessaire de faire croitre une coque afin d'augmenter le rendement quantique des particules mais aussi de les protéger contre des conditions extérieures pouvant entrainer leur oxydation [111]. La coque va permettre de passiver les liaisons pendantes présentes en surface.
La croissance d'une coque peut aussi moduler les propriétés optiques du nanocristal, elle peut élargir la fenêtre d'émission spectrale au delà de celle de chaque cœur [118]. Il va être possible de jouer sur la délocalisation de la fonction d'onde de chaque porteur de charge (l'électron et le trou). La coque est forcément constituée d'un matériau semi-conducteur différent du cœur [118, 119]. Il existe plusieurs types de cœur/coque en fonction du type d'alignement des bandes BV et BC de la coque par rapport au cœur, **figure I.20**, ce qui peut délocaliser les porteurs de charge et donc moduler l'énergie de l'émission de fluorescence. Une coque qui présente un "band gap" plus grand que celui du cœur et encadrant les BC et BV du cœur, (structure de type I) permettra de confiner les porteurs de charges dans le cœur. Dans le cas d'une structure de type II, les porteurs de charge ne sont pas confinés dans le même matériau. L'exciton se recombinera alors à l'interface des deux matériaux, ce qui produit un décalage vers le rouge de la photoluminescence. De plus, le temps de vie est plus long en raison du faible recouvrement entre les fonctions d'onde de l'électron et du trou. Un quasi-type II présente une faible différence entre les bandes de conduction (ou de valence), ce qui signifie que l'un des porteurs de charge est délocalisé dans les deux matériaux (le cœur et la coque) tandis que l'autre est localisé dans un seul des deux matériaux.

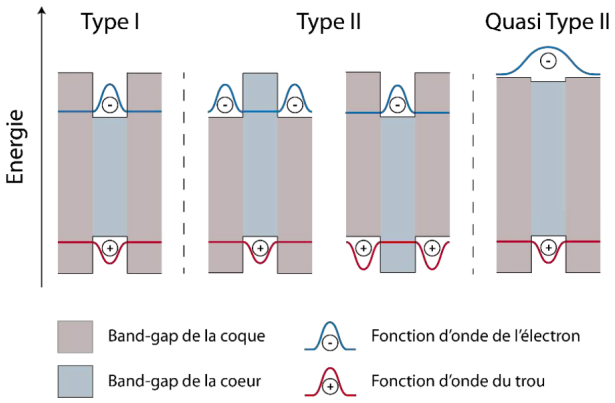



Figure I.20 – Représentation schématique des différents alignements de bandes pour les QD de structure cœur/coque.

Un autre facteur déterminant lors de la synthèse d'une coque à la surface de QD est la cristallinité de la coque par rapport au cœur [118]. L'objectif est de minimiser les défauts qui pourraient se créer à l'interface. Pour cela, il est nécessaire que les paramètres de maille soient les plus proches possibles entre le cœur et la coque.
Un autre facteur à prendre en compte pour l'utilisation de QD dans le domaine de l'imagerie est la toxicité de la coque. En effet, il est nécessaire de recouvrir les cœurs de QD avec des matériaux biocompatibles car ils seront en contact direct avec le milieu biologique. Les coques à base de ZnS sont pour cela privilégiées car très faiblement toxiques à court terme, biocompatibles et possèdent une énergie de bande interdite relativement grande (3,54 eV) ce qui permettra d'obtenir des structure de type I. Dans cette thèse, les matériaux utilisés sont les cœurs cités précédemment recouverts de coque :

- $CuInSe_2$/ZnS, la coque de ZnS croît facilement sur ces coeurs car ZnS possède la même structure cristalline et il a un paramètre de maille proche des coeurs, permettant une croissance épitaxiée ;
- CdSe/CdS/ZnS, il est nécessaire de développer une coque en gradient (d'abord du CdS puis du ZnS) car les paramètres de maille de CdSe et de ZnS sont trop éloignés, CdS possède un paramètre de maille intermédiaire ;
- PbS/CdS, bien que PbS et CdS aient des structures cristallines différentes, ils partagent un soufre en commun et des paramètres de maille relativement proches et compatibles. Ici pas il n'y a pas de coque de ZnS mais cela représente une des perspectives de cette thèse.

Ces trois matériaux coeur/coque(s) sont de type I.

### I.3.6 Synthèse des QD en milieu organique

#### Synthèse des coeurs

Le schéma du montage nécessaire lors d'une synthèse classique de QD est représenté en **figure I.21(a)**. La synthèse est réalisée sous atmosphère inerte (argon) à haute température (jusqu'à 300°C) dans un solvant organique tel que l'octadécène. Il s'agit d'un solvant non coordinant et qui possède une température d'ébullition élevée permettant de travailler à de hautes températures. Les précurseurs d'ions métalliques peuvent être des poudres métalliques (comme par exemple le sélénium ou le soufre) ou des sels (comme par exemple le myristate de cadmimum, le chlorure de cuivre, de plomb, ou d'indium). Lors de la synthèse, les nanoparticules grossissent, entraînant un déplacement vers les grandes longueurs d'onde de leur signal d'émission de fluorescence, comme observé en **figure I.21(c)**. Une fois les nanocristaux formés, la réaction est arrêtée par refroidissement. Les particules de taille nanométrique restent stables en milieu organique en suspension colloïdale grâce à des ligands organiques tels que l'acide oléique ou l'oleylamine, présents initialement dans la solution, schématisé en **figure I.21(b)**.

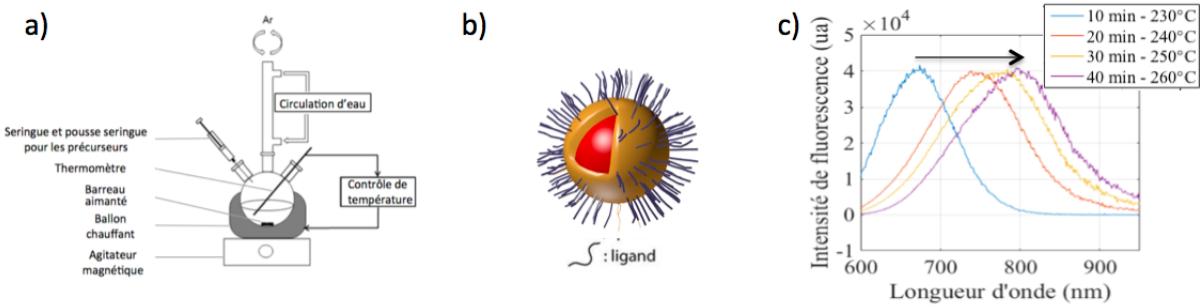



FIGURE I.21 – a) Schéma d'un montage expérimental pour la synthèse de QD. b) Dessin d'un QD coeur/coque recouvert de ligands à sa surface. c) Exemple de spectres d'émission de fluorescence obtenus lors de la synthèse de cœurs.

### Synthèse des coques

Les synthèses de coques peuvent être réalisées suivant différents types de protocoles. Ici, nous nous intéressons plus particulièrement à quatre protocoles :

- injection de précurseurs à chaud en goutte à goutte ;
- échange cationique partiel à chaud ;
- méthode SILAR à chaud ("Successive Ion Layer Adsorption and Reaction") ;
- la méthode cALD à froid ("Colloidal Addition Layer Deposition").

Ces croissances de coques s'effectuent toutes sur des coeurs ayant été au préalable purifiées des précurseurs qui n'ont pas réagi ou des produits secondaires indésirables.
La croissance en goutte à goutte consiste à injecter les précurseurs très lentement et en continu à l'aide d'un pousse seringue. La vitesse d'injection et la température sont les paramètres clés lors de cette réaction. L'objectif est que la croissance soit lente afin de limiter la nucléation secondaire. Cette synthèse de coque souffre, cependant, d'un mauvais contrôle de dispersité et est une synthèse très lente [120].

La méthode SILAR permet une synthèse de coque beaucoup plus contrôlée et monodisperse bien que cette technique soit également lente. La croissance de la coque se fait par déposition de couches atomiques successives, en alternant dépôt d'anions et de cations. Entre chaque dépôt il est nécessaire d'attendre plusieurs minutes à quelques heures. Lors de cette synthèse, il faut calculer exactement la quantité des précurseurs à injecter pour la formation de chaque monocouche [121]. Cette technique permet aussi de faire croître plusieurs coques différentes ou de faire un gradient de plusieurs coques [122].

L'échange cationique partiel à chaud consiste à échanger des cations de la partie externe du cœur des nanocristaux par de nouveaux cations en conservant la structure du réseau anionique. L'échange cationique se fait par diffusion des nouveaux cations au sein de la structure cristalline, ce qui permet de déplacer les cations initialement en place. Cet échange n'est pas possible pour

tous les matériaux, de nombreuses conditions doivent être réunies comme : un paramètre de maille similaire avant et après échange, l'échange doit être énergétiquement favorable, les rayons ioniques des cations entrant et sortant doivent être proches... Cette technique a été réalisée les premières fois par les équipes de Son *et al.* [123] et aussi de Talapin *et al.* [124].

La troisième technique consiste à faire croître une coque à température ambiante : il s'agit de la croissance par cALD. Cette technique a été créée par Ithurria *et al.* [125] et consiste à faire grossir une coque monocouche par monocouche en mélange biphasique (Hexane/Formamide) ce qui permet d'enlever les précurseurs en excès entre chaque monocouche.

Les cœurs de CdSe de structure wurtzite, synthétisés et utilisés dans cette thèse, se basent sur les tout premiers protocoles de l'équipe de Murray *et al.* [70] mais dont le précurseur de cadmium, trop toxique et pas assez stable : le $Cd(Me)_2$, a été remplacé par de l'oléate de cadmium dans le protocole de Peng *et al.* [126]. Les synthèses de coeur/coques : CdSe/CdS/ZnS proviennent de Smith *et al.* [122] avec une synthèse de la coque par méthode SILAR.

Les cœur/coques de $CuInSe_2$/ZnS synthétisés ont été développés au sein de notre laboratoire par Pons *et al.* [106, 127]. La coque est synthétisée en goutte à goutte à chaud.

Les cœurs de PbS proviennent de synthèses proposées par l'équipe de Hens *et al.* [107]. Cette même équipe a proposé deux protocoles de synthèse de coques de CdS soit par échange cationique partiel à froid [128, 129] soit par cALD à température ambiante [130].

Après chaque synthèse (de coeurs ou de coques), les NP sont caractérisées par un spectre d'absorption, un spectre de PL (photoluminescence), un diffractogramme de DRX (Diffraction des Rayons X), des images TEM (Microscopie Electronique en Transmission), un spectre EDX (analyse dispersive en énergie) et une mesure de leur rendement quantique de fluorescence si nécessaire.

## I.4 Les Quantums Dots pour l'imagerie optique *in vivo*

### I.4.1 Les limites de l'imagerie optique

L'imagerie optique est une technique d'imagerie qui se développe de plus en plus en raison de son très faible coût. Il s'agit d'une technique d'imagerie non invasive et peu toxique pour le patient (en fonction du produit de contraste). L'imagerie optique est aussi très prometteuse pour la chirurgie guidée par fluorescence [131]. Les grandes limites de l'imagerie optique sont : (i) sa faible profondeur de pénétration à cause de l'absorbance des tissus biologiques, (ii) sa faible résolution due à la diffusion de la lumière par les tissus et enfin (iii) la diminution du rapport signal sur bruit à cause de l'autofluorescence des tissus.

### Absorbance des tissus biologiques

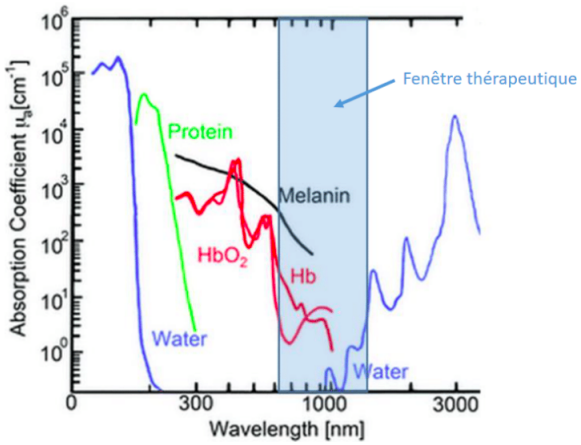



FIGURE I.22 – Spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques : eau, mélanine, protéine, hémoglobine (Hb), oxyhémoglobine ($HbO_2$) [132].

Certains tissus et fluides biologiques absorbent fortement dans le domaine du visible. Leur coefficient d'absorption sont présentés en **figure I.22** en fonction de la longueur d'onde. Dans les gammes d'énergie où de nombreux constituants biologiques absorbent la lumière, la sensibilité en profondeur de l'imagerie optique sera affaiblie. Dans le domaine du visible, par exemple, les protéines, l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine ou encore la mélanine peuvent absorber la lumière. En revanche, l'absorbance de ces constituants est minimale dans les gammes de 700-950 nm puis de 1050-1400 nm : c'est ce qu'on appelle la première et la seconde "fenêtre de transparence biologique des tissus".

### Autofluorescence des tissus biologiques

L'autofluorescence correspond à la fluorescence naturelle des tissus biologiques. Cette autofluorescence est problématique car elle va apporter un signal supplémentaire parasite qui sera considéré comme du bruit. Le rapport signal/bruit sera donc diminué. La **figure I.23** présente cette autofluorescence des organes vitaux d'une souris en fonction des gammes d'énergie pour l'excitation et l'émission. Il peut être observé que ce signal d'autofluorescence est plus fort lorsqu'on excite/détecte dans le visible : bleu/vert qu'à des plus grandes longueurs d'onde : vert/rouge. Ce n'est que dans le domaine de l'infrarouge pour l'excitation et l'émission qu'il est possible de s'affranchir de manière importante de l'autofluorescence des tissus.

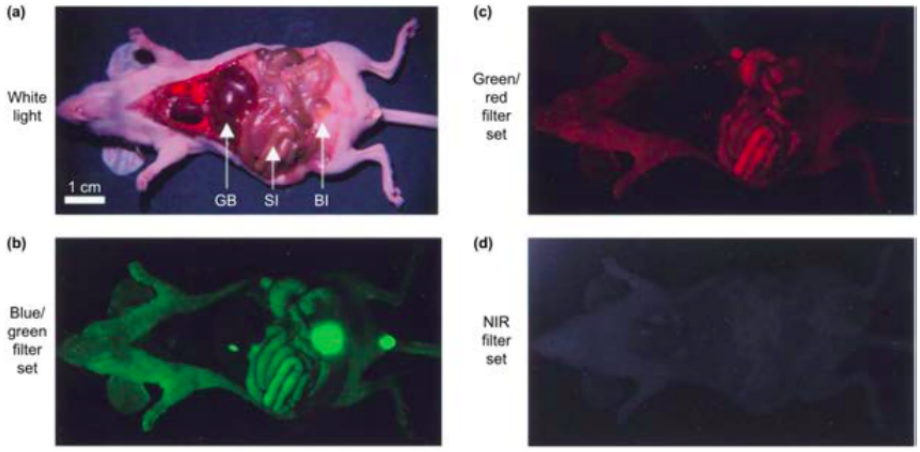



FIGURE I.23 – Autofluorescence d'organes et de fluides corporels. (a) Image d'une souris sacrifiée. GB = vésicule biliaire ; SI = intestin grêle ; Bl = vessie. L'autofluorescence peut être visualisée dans trois fenêtres spectrales en utilisant des spectres passe-bandes à l'excitation/visualisation : (b) bleu (460-500 nm)/vert (505-560 nm) ; (c) vert (525-555 nm)/rouge (590-650 nm) ; et rouge (725-775 nm)/proche infra-rouge (790-830 nm) [133].

### Diffusion de la lumière par les tissus

Par ailleurs, la diffusion des photons par les tissus peut aussi diminuer l'intensité du signal que ce soit lors de l'excitation ou de l'émission. A cause de la diffusion de la lumière par les tissus, on va perdre de la résolution. La diffusion des tissus évolue en $1/\lambda^n$ (n variant avec les tissus rencontrés). La diffusion induite par les tissus est donc beaucoup plus faible dans l'IR que dans le visible. Sur la **figure I.24** il peut être observé le gain de résolution spatial en profondeur dans des tissus biologiques entre une sonde fluorescente dans la première et la deuxième fenêtre de l'infrarouge [134].

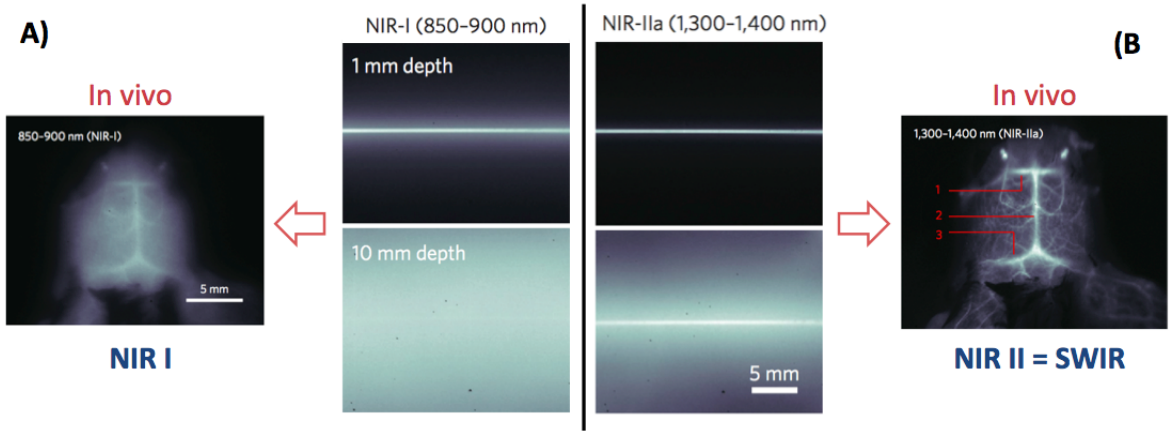



FIGURE I.24 – Différence de résolution spatiale en profondeur dans une souris ou dans un tube entre un agent fluorescent dans le domaine du proche infrarouge (850-900 nm) et dans l'infrarouge court (1300-1400 nm). [134].

### L'IR : domaine de choix pour l'imagerie optique *in vivo*

L'imagerie optique de fluorescence est donc vraiment limitée par l'absorption et l'auto-fluorescence des tissus ainsi que par la diffusion dans le domaine du visible, cependant, il est possible de pallier ces difficultés en utilisant une sonde pouvant absorber et émettre dans l'IR. Ainsi, l'imagerie de fluorescence passe de 1 mm de profondeur de pénétration (dans le visible) à quelques centimètres (pour l'IR court), et il permet aussi d'améliorer la résolution spatiale.

## I.4.2 Avantages des QD par rapport aux sondes organiques fluorescentes

Les fluorophores (ou colorants) organiques sont des molécules possédant un système $\pi$ conjugué important. Ces molécules présentent souvent l'avantage d'être faiblement toxiques et peuvent être éliminées rapidement. Cependant ces molécules présentent des inconvénients par rapport aux QD comme un spectre d'absorption restreint, une émission fixe, un temps de vie court, un faible photostabilité et surtout de faibles rendements quantiques dans les gammes d'énergies intéressantes pour l'imagerie optique.

### Absorbance et fluorescence

Les spectres d'absorption et de fluorescence des QD et d'un fluorophore (ici : la Rhodamine) sont présentés sur la **figure I.25**. Les QD absorbent au niveau du pic excitonique (comme expliqué précédemment) mais ils absorbent aussi à toutes les longueurs d'onde inférieures. Il est donc possible d'exciter ces particules sur une très grande gamme d'énergie contrairement aux molécules organiques (les plus utilisées sont les rhodamines, les fluoresceines et les cyanines) qui ne peuvent être excitées, en général, que sur une plage restreinte de longueurs d'ondes [135]. Par

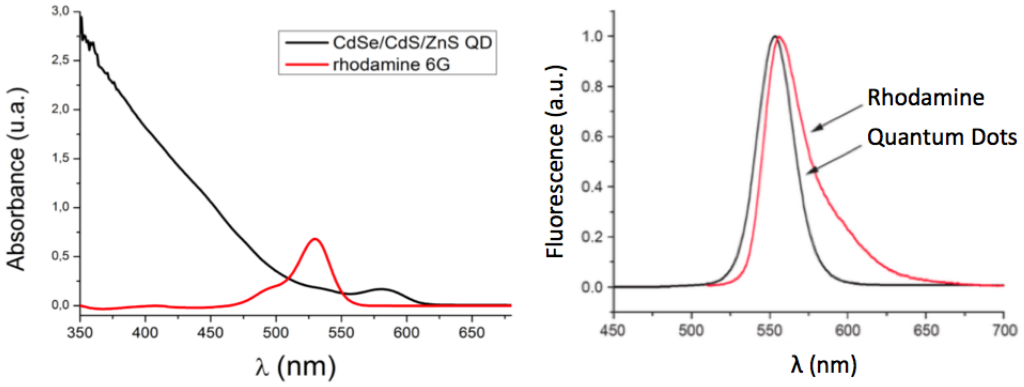



FIGURE I.25 – Spectres d'absorbance (à gauche) et de fluorescence (à droite) de QD et de la Rhodamine.

ailleurs, les spectres d'émission de fluorescence des QD sont plus fins que ceux des molécules organiques ce qui permet les détections simultanées de différentes couleurs, d'autant plus que différents types de QD peuvent se faire exciter simultanément grâce à leur grande plage possible d'excitation.

### Photoblanchiment

Le photoblanchimenent est la perte de fluorescence en fonction du temps sous illumination. Les QD montrent une bien meilleure résistance au phénomène de photoblanchiment que les molécules organiques comme le prouve la **figure I.26** [136].

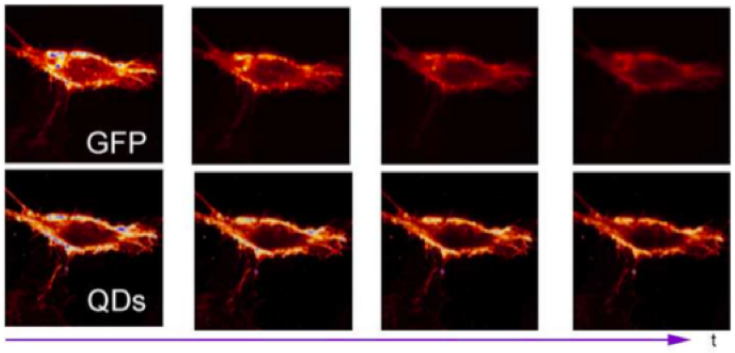



FIGURE I.26 – Photoblanchiment au cours du temps de la GFP en comparaison avec des QDs CdSe/CdS/ZnS sous illumination dans l'UV.

### Temps de vie

A l'exception des colorants à base d'acridone, le temps de vie de fluorescence des colorants organiques est très court : à peine quelques nanosecondes. Les QD ont des temps de vie beaucoup plus longs. D'ailleurs ce temps de vie dépend des matériaux composant le coeur et la coque, de la délocalisation des fonctions d'onde, des porteurs de charge lors de la création de l'exciton et dépend aussi des ligands accrochés à la surface des NP. Globalement, les QD utilisés dans cette thèse possèdent les temps de vie caractéristiques moyens suivants :

— QD visible (CdSe/CdS/ZnS) entre 10-100 ns ;
— QD IR proche ($CuInSe_2$/ZnS) entre 100-1000 ns ;
— QD IR court (PbS/CdS) entre 1-10 µs.

Cette grande différence de temps de vie entre les molécules organiques et les QD peut être mis à profit car il existe des montages d'optique qui permettent de n'imager que des particules à long temps de vie au sein d'un milieu biologique, cette technique s'appelle l'imagerie à fenêtre temporelle [137].

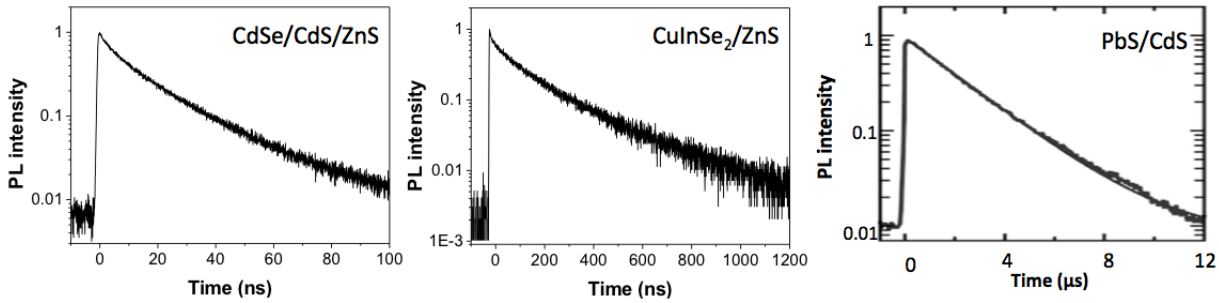



FIGURE I.27 – Intensité de photoluminescence (PL) résolue en temps pour les 3 types de QD utilisés dans cette thèse : QD visibles (CdSe/CdS/Zns), QD IR courts NIR ($CuInSe_2$/ZnS) et QD IR proches SWIR (PbS/CdS). La dernière courbe provient de la référence [128].

#### Rendements quantiques d'émission

Globalement, les rendements quantiques d'émission des QD et des sondes organiques sont très bons dans le domaine de visible. En revanche, le plus grand avantage des QD par rapport aux sondes organiques est leur rendement quantique dans le domaine du proche IR ou de l'IR court. En effet, les première et deuxième fenêtres de transparence biologique des tissus se trouvent dans l'IR (comme expliqué précédement) car il y a moins d'absorbance, d'autofluorescence et de diffusion des tissus. Or les sondes organiques possèdent des rendements quantiques très bas dans le proche IR (NIR) et vraiment déplorables dans l'IR court (SWIR). Dans le domaine du proche IR, le vert d'indocyanine (ICG) et le bleu de méthylène sont autorisés à être utilisés sur l'être humain pour des applications biomédicales. Cependant, le bleu de méthylène n'est pas utilisé pour ses propriétés de fluorescence car son rendement quantique est bien trop faible et l'ICG qui émet à $\lambda_{max}$=870 nm [138] possède un rendement quantique de 13 % dans le DMSO et seulement de $\approx$ 1 % en milieu aqueux [139]. Seule la sonde fluorescente ZW800 possède un rendement quantique relativement haut $\approx$ 15%. Globalement, très peu de molécules organiques fluorescentes dans le proche IR possèdent un rendement quantique $>$ 10% et aucune ne dépasse les 20%. Dans le domaine de l'IR court (SWIR), il n'y a quasiment pas de molécules organiques fluorescentes et celles qui existent possèdent des rendements quantiques très faibles $<$ 1 % [140].

Les QD possèdent des rendements quantiques légèrement meilleurs dans le domaine du NIR : entre 20 et 30 % et dans le domaine du SWIR, par contre, ils sont plus hauts d'au moins un ordre de grandeur : entre 10 et 20 %.

### I.4.3 Chimie de surface des QD pour l'imagerie *in vivo*

Afin d'utiliser les QD dans des milieux biologiques pour l'imagerie *in vivo*, il est nécessaire de les rendre biocompatibles, stables en milieu aqueux et relativement peu toxiques. Pour cela, nous utilisons au sein de notre laboratoire la technique d'échange de ligands. Cette technique consiste à remplacer les ligands hydrophobes présents à la surface des NP par des ligands hy-

drophiles. Ces ligands possèdent deux fonctions : la première permet l'accroche sur le QD et la seconde permet la dispersion de la particule en suspension colloïdale dans l'eau comme discuté précédemment.

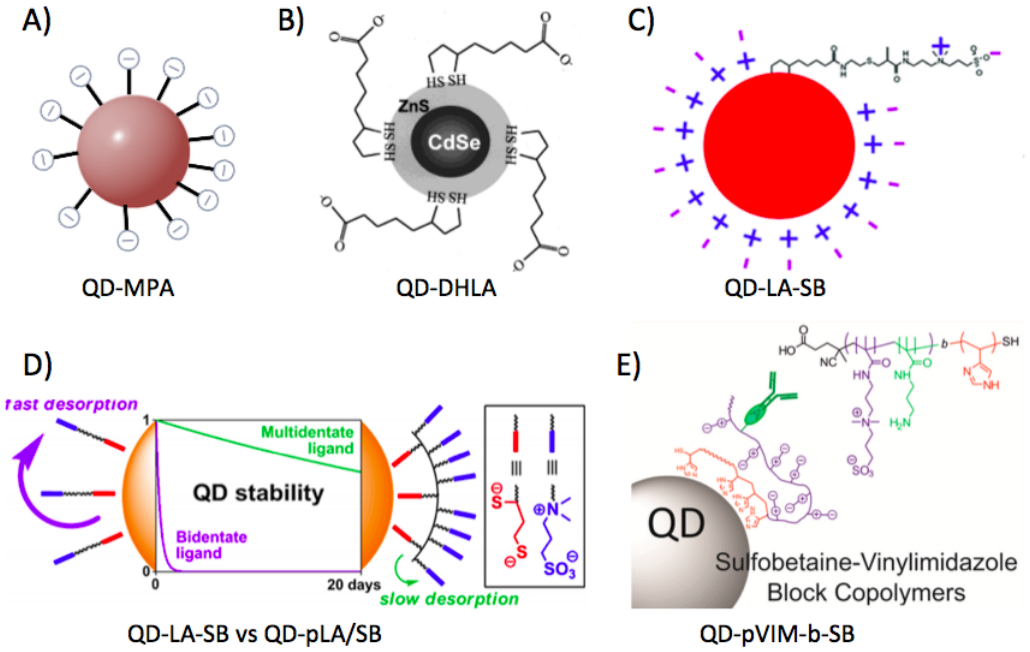



FIGURE I.28 – Différentes chimies de surface des QD. A) QD-MPA (acide mercapopropionique) [141]. B) QD-DHLA : acide dihydrolipoïque, figure provenant de la ref [142]. C) QD-LA-SB : dihydrolipoamide (LA) couplé à une fonction zwitterionique, ici le sulfobetaine (SB), figure provenant de la ref [143]. D) QD-LA-SB vs QD-pLA/SB : polymère statistique de LA/SB, figure provenant de la ref [144]. E) QD-pVIM-b-SB : polymère di-blocs : vinylimidazole et SB, figure provenant de la ref [145].

Pour les QD recouverts d'une couche de sulfure de zinc, la fonction d'accroche la plus utilisée est la fonction thiol en raison de sa forte affinité avec ce type de surface [146]. En 1998, Chan *et al.* ont proposé d'utiliser l'acide 2-mercaptoacétique pour solubiliser les QD CdSe/Zns [147]. Depuis, de nombreuses équipes utilisent d'autres ligands monodentates comme l'acide 3-mercaptopropionique [141], la cystéine [148], des thiols couplés à des brins d'ADN [149], des sucres [150]...

Avec ces chimies de surface, les QD souffrent, cependant, d'une mauvaise stabilité en fonction du temps [151]. Pong *et al.* ont montré que les thiols sont plus fermement accrochés à la surface lorsqu'ils sont déprotonés, les ligands vont donc plus facilement se désorber à de faible pH. Pour pallier ces problèmes, l'équipe de Mikulec, Mattoussi *et al.* a eu l'idée de remplacer le mono-thiol par une fonction dithiol, en passant ainsi d'un ligand monodentate à un ligand bidentate : l'acide dihydrolipoïque (noté DHLA) qui se termine par une fonction acide carboxylique [142]. La stabilité des particules a, en effet, été ainsi vraiment améliorée. Malheureusement, il est, ici, nécessaire de garder les particules dans une solution de pH $>$ 7-8 car l'acide carboxylique doit

être déprotoné pour que les QD restent solubles dans l'eau. Le carboxylate va générer de nombreuses charges négatives à la surface des particules entrainant des interactions non spécifiques avec des biomolécules chargées positivement, ce qui n'est pas souhaité. Le groupe de Susumu *et al.* ont couplé du DHLA avec du PEG pour résoudre ce problème [152]. De même, dans notre équipe au laboratoire, Muro *et al.* , ont couplé du DHLA avec un zwitterion [143]. Le PEG et les zwitterions sont particulièrement hydrophiles et sont globalement neutres, ce qui limite l'adsorption non spécifique comme expliqué précédemment [153].

Par la suite, notre équipe de recherche et d'autres ont proposé d'augmenter encore la stabilité des QD en proposant des ligands multidentates, par exemple Matoussi *et al.* ont développé de nouveaux ligands oligomères présentant plusieurs acides lipoïque (LA) [154] puis Raymo *et al.* utilisent aussi des polymères avec plusieurs fonctions dithiols comme ligands à la surface des QD [155]. Par la suite, Giovanelli *et al.* proposent de nouveaux polymères statistiques contenant plusieurs fonctions LA et des fonctions zwitterioniques [144]. Le poly-ancrage de fonctions thiols permet d'augmenter sur un très long terme la stabilité des particules. Toutefois, les fonctions thiols sont sensibles à l'oxydation, ce qui peut diminuer la stabilité en fonction du milieu dans lequel se trouvent les QD. De plus, les thiols peuvent être source de réactions parasites si l'on souhaite faire de la bioconjugaison.

En 2009, l'équipe de Bawendi suggère d'utiliser des imidazoles à la place des thiols, car ils ont une bonne affinité avec la surface inorganique des QD et ils augmentent leur rendement quantique car les thiols sont des pièges à trous [156]. Plus récemment, Susumu *et al.* choisissent d'utiliser des pyridines comme fonction d'ancrage sur les QD [157]. Par ailleurs, l'équipe de Greytak *et al.* compare des QD recouverts de polymères blocs et statistiques (avec la même composition et même masse molaire) ayant des imidazoles comme fonction d'ancrage, et montre que les polymères blocs sont plus fortement ancrés à la surface des QD [158].

Notre équipe a proposé, dans la publication de Tasso *et al.* d'accrocher à la surface des QD des polymères blocs avec un bloc de fonctions imidazole permettant toujours un ancrage multiple [145] et un bloc zwitterionique. Pour réussir à accrocher ces polymères à la surface des QD, nous procédons en deux étapes : tout d'abord il y a un transfert dans l'eau des particules grâce au MPA (l'acide mercaptopropionique) puis, un échange de ligands entre le MPA (n'ayant qu'une seule fonction d'accroche) et le polymère (en ayant de multiples).

Toutes ces optimisations sur les ligands à la surface des QD ont permis d'envisager l'utilisation des QD pour l'imagerie optique de fluorescence, bien qu'il soit nécessaire de poursuivre les recherches pour améliorer encore la furtivité de ces NP.

Dans cette thèse, les QD seront utilisés comme sondes fluorescentes mais nous n'allons pas fonctionnaliser les QD pour qu'ils aillent spécifiquement reconnaître une cible ; nous allons plu-

tôt utiliser leur chimie de surface pour moduler cette intensité de fluorescence. Il est possible, d'observer des transferts d'énergie entre QD et sonde organique par FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mais aussi entre QD et NP d'or par NSET (Nanometal Surface Energy Transfert) comme nous allons le détailler dans la partie suivante.

## I.5 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP

### I.5.1 Rappels de théorie sur le FRET

Les RET (Resonance Energy Transfert) mettent en jeu des couplages dipolaires à travers l'espace qui permettent des transferts d'énergie entre un donneur excité (D*) et un accepteur dans son état fondamental (A) [159]. L'équation est représentée en **figure I.29**. Lors du transfert d'énergie, il n'y a pas d'échange ni de photon, ni d'électron ni de contact entre D* et A.

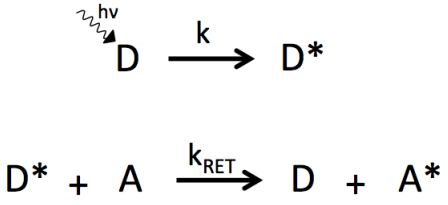



FIGURE I.29 – Schéma du transfert d'énergie entre un donneur excité et un accepteur.

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfert) est un des transferts d'énergie possibles non radiatifs entre deux molécules organiques : un donneur d'énergie (D) et un accepteur (A). Cette théorie a été observée par Jean Perrin pour la première fois au début du XX$^{ime}$ mais décrite pour la première fois par M. Förster. Avec un diagramme simplifié du phénomène de FRET, **figure I.30**, il est facile de voir toutes les situations possibles de désexcitation de D* : soit désexcitation radiative par fluorescence, par émission d'un photon ; soit désexcitation non radiative (en général par des phénomènes vibratoires) ; soit transfert d'énergie avec un accepteur.

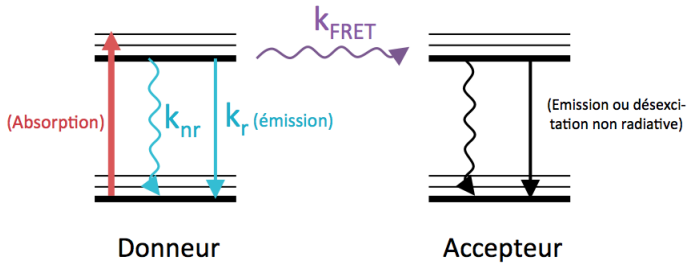



FIGURE I.30 – Diagramme simplifié du phénomène de FRET.

La vitesse de désexcitation du donneur dépend donc de sa constante de vitesse radiative intrinsèque (noté $k_D{}^r$), de sa constante de vitesse non radiative en absence d'accepteur (noté

${k_D}^{nr}$), et de la constante de vitesse du transfert d'énergie (noté $k_{\mathrm{FRET}}$). Les temps de vie de l'état excité de D peuvent s'écrire $\tau_D$ et $\tau_{DA}$ respectivement en l'absence et en présence de A, suivant l'équation VII.9.

$$\tau_D = \frac{1}{{k_D}^{nr} + {k_D}^{r}} \qquad \tau_{DA} = \frac{1}{{k_D}^{nr} + {k_D}^{r} + k_{\mathrm{FRET}}} \tag{I.5}$$

Le FRET est un transfert d'énergie qui provient d'une interaction dipôle-dipôle résonante entre A et D et on fait l'hypothèse qu'il s'agit de dipôles ponctuels. Cette interaction s'écrit alors comme une interaction coulombienne. Ce transfert d'énergie a lieu lorsque les deux dipôles rentrent en résonance, se trouvant alors mutuellement perturbés. Cette interaction dipôle-dipôle décroit en fonction du cube de la distance entre les dipôles et dépend de leur orientation relative. La probabilité de transfert étant proportionnelle au carré de l'énergie d'interaction coulombienne, le $k_{\mathrm{FRET}}$ décroit en $1/r^6$, avec $r$ la distance entre D et A. Ce transfert d'énergie n'a lieu, en général, que lorsque A et D sont très proches : entre 1 et 10 nm. Toutes les équations de la théorie du FRET sont détaillées et expliquées en annexe de cette thèse.

Notons juste que dans sa théorie, M. Förster propose de simplifier les équations en incorporant une distance, notée $R_0$, appelée rayon de Förster, qui caractérise la distance où il y a 50 % d'efficacité de transfert d'énergie. Dans ce cas, on a alors $k_{\mathrm{FRET}} = {k_D}^{nr} + {k_D}^{r}$ puisque 50 % des désexcitations se font par FRET. On obtient donc que $k_{\mathrm{FRET}} = {\tau_D}^{-1}$.

Il est alors possible de déterminer l'efficacité de ce transfert, notée $E_{\mathrm{FRET}}$ qui peut être définie comme un rendement quantique du phénomène de transfert d'énergie. Par analogie avec le rendement quantique de fluorescence, ce rendement de transfert correspond au nombre de molécules qui se désexcitent par transfert d'énergie sur le nombre total de molécules excitées. Ainsi, cette efficacité de transfert s'écrit selon l'équation VII.16.

$$E_{\mathrm{FRET}} = \frac{k_{\mathrm{FRET}}}{k_{\mathrm{FRET}} + {k_D}^{nr} + {k_D}^{r}} = \frac{1}{1 + \dfrac{{k_D}^{nr} + {k_D}^{r}}{k_{\mathrm{FRET}}}} \tag{I.6}$$

En combinant les équations VII.16 et la définition de $\mathrm{R_0}$ (détaillée en annexe) on peut simplifier cette efficacité de transfert sous l'écriture de l'équation VII.17.

$$E_{\mathrm{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\dfrac{r}{R_0}\right)^6} \tag{I.7}$$

### I.5.2 Transfert d'énergie entre un QD et des AuNP : le NSET

#### Théorie du NSET

Un autre type de transfert d'énergie intitulé NSET (pour Nanometal Surface Energy Transfert) et ressemblant fortement au FRET peut se produire lorsqu'une sonde fluorescente est proche de la surface d'un métal. En effet, quand un dipôle oscillant excité est mis dans un champ électrique proche d'un métal en bulk ou d'une nanoparticule métallique, l'oscillateur va

interagir avec ce champ à travers un couplage qui modifie ses désexcitations radiatives et non radiatives [160]. La désexcitation non radiative peut-être amplifiée par un transfert d'énergie de la sonde fluorescente au métal qui va absorber l'énergie puis se désexciter par effet Joule. La désexcitation radiative peut-être modifiée en raison de l'effet Purcell par réflexion du champ vers la sonde émettrice. Dans le cas de nanoparticules d'or de taille inférieure à 20 nm, c'est principalement de la désexcitation non radiative qui est modifiée chez le donneur [161].

Ce nouveau type de transfert d'énergie ne peut être décrit par la théorie FRET car celle-ci représente un transfert d'énergie qui se modélise en $r^{-6}$ alors qu'expérimentalement le transfert d'énergie qui se produit entre une sonde fluorescente et des nanoparticules d'or de petites tailles ($< 20$ nm) semble être en $r^{-4}$. De plus dans le cas de la théorie du FRET, le donneur et l'accepteur sont considérés comme des dipôles de 0 dimension, ce qui ne peut plus être le cas avec les nanoparticules d'or. Deux autres modèles ont ensuite été développés : le modèle G-N et le modèle CPS-Khun.
Le modèle G-N (pour Gerstein-Nitzan) [162–165] a été développé pour des particules sphériques et se base sur les propriétés optiques de l'or correspondant à des particules de diamètre supérieur à 20 nm. Les AuNP sont considérés comme des dipôles ponctuels et leur champ électrique influence les désexcitations radiatives et non radiatives de la sonde fluorescente. Ce modèle prédit une dépendance de $k_{ET}$ en $r^{-6}$.

Le modèle de CPS-Khun [166–168] est l'un des premiers modèles qui modélise le transfert d'énergie entre une sonde fluorescente et des nanoparticules d'or de petite taille (environ 2 nm). Ce modèle fait l'approximation que les particules d'or sont comme des miroirs minces métalliques en interaction avec l'oscillateur à l'état excité. Ce modèle est en $r^{-4}$ et pour la première fois, il prend en compte l'absorption et la constante diélectrique de l'or en supposant que c'est un miroir mince. Ce modèle ne fonctionne pourtant pas dans de nombreuses situations, en changeant la taille des particules notamment.

Bien que la théorie du NSET ne soit pas encore parfaitement bien comprise dans la communauté scientifique, l'équipe de Strouse *et al.* [169] a proposé une théorie qui semble bien représenter les données expérimentales obtenues jusqu'alors. Cette théorie se base sur le modèle de CPS-Khun mais ils proposent d'y ajouter les propriétés électroniques dépendant de la taille des AuNP. Cette théorie reprend la même formule de $d_0$ que dans la théorie de CPS-Khun. La distance $d_0$ est l'analogue de la distance de Förster $R_0$ mais dans le cas du NSET, *i.e.* la distance à laquelle l'efficacité de transfert est égale à 50%. Cette distance est écrite en équation I.8 avec $\alpha$ le vecteur d'orientation du donneur vers le plasmon du métal, $\lambda$ la longueur d'onde d'émission maximale du donneur, $n_m$ l'indice de réfraction du solvant, $n_r$ l'indice de réfraction du métal, $A$ l'absorbance du miroir mince métallique (cette absorbance correspond au modèle de CPS-Khun et sera modifiée dans la théorie de Strouse), $\phi_D$ le rendement quantique, $\epsilon_1$ la

constante diélectrique du solvant et $\epsilon_2$ la fonction complexe diélectrique du métal.

$$d_0 = \frac{\alpha\lambda}{n_m}(A\phi_D)^{1/4}\left(\frac{n_r}{2n_m}\left(1+\frac{{\epsilon_1}^2}{|\epsilon_2|^2}\right)\right)^{1/4} \tag{I.8}$$

Dans le cas du NSET les AuNP sont sphériques et non des films fins donc l'absorbance va varier et dépendra du rayon de la nanosphère, noté $r$. Strouse *et al.* définissent une nouvelle absorbance des particules, $A_{NP}$, écrite en équation I.9 avec $\epsilon_\lambda$ le coefficient d'extinction molaire des AuNP à la longueur d'onde d'émission du donneur, $\delta_{skin}$ l'épaisseur de peau, $N_a$ le nombre d'Avogadro, $r$ le rayon des AuNP en centimètre et $V$ le volume de la particule en $cm^3$.

$$A_{NP} = 10^3 ln(10)\left(\frac{\epsilon_\lambda 4r^2}{N_a V \delta_{skin}}\right) \tag{I.9}$$

Dans le cas d'un transfert d'énergie par NSET, l'efficacité de ce transfert peut s'écrire selon l'équation I.10.

$$E_{\text{NSET}} = \frac{k_{\text{NSET}}}{k_{\text{NSET}} + {k_D}^{nr} + {k_D}^{r}} = \frac{1}{1+\dfrac{{k_D}^{nr}+{k_D}^{r}}{k_{\text{NSET}}}} \tag{I.10}$$

En combinant les équations I.8 et I.10 il est possible d'obtenir I.11.

$$E_{\text{NSET}} = \frac{1}{1+\left(\dfrac{d}{d_0}\right)^4} \tag{I.11}$$

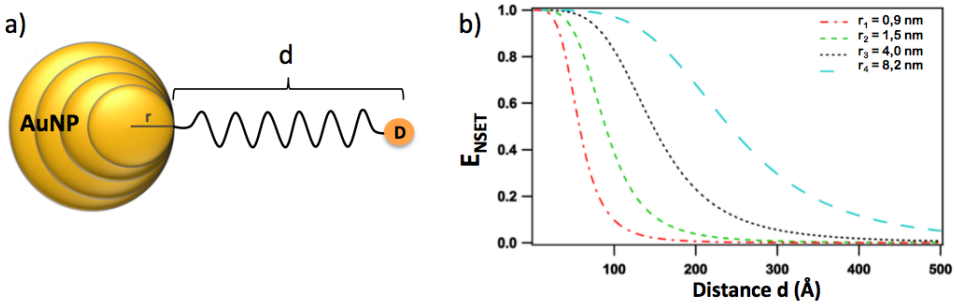



FIGURE I.31 – a) Schéma de la distance d entre un donneur et des AuNP de différents rayons r. b) Courbes d'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance d pour différents rayons r de AuNP obtenues par la méthode de Strouse *et al.* [169].

Plus les particules d'or absorbent à la longueur d'onde de l'émission du donneur plus le $d_0$ est grand, donc plus le transfert d'énergie est efficace. Sur la **figure I.31**, on peut observer un exemple de courbe représentant le transfert d'énergie entre une sonde fluorescente et des AuNP de différentes tailles [169].

Plusieurs groupes de recherche, notamment Pons *et al.* et Wu *et al.* ont montré que la théorie du NSET semble plutôt bien expliquer le transfert d'énergie qui s'observe expérimentalement entre un QD et des AuNP [170, 171].

**Cas où il y a plusieurs AuNP par QD**

Si il y a plusieurs AuNP par QD, le transfert d'énergie va augmenter. L'efficacité de ce transfert d'énergie est modifiée comme écrite en équation I.12, avec $N$ étant le nombre d'accepteurs par QD.

$$E_{\mathrm{NSET}} = \frac{N{d_0}^4}{N{d_0}^4 + d^4} = \frac{1}{1 + \left(\frac{d}{d_0 N^{1/4}}\right)^4} \tag{I.12}$$

Les QD sont des nanoparticules dont la fluorescence peut être modulée par la présence de particules d'or à la proximité de sa surface. Nous verrons dans cette thèse que ce transfert d'énergie peut s'avérer extrêmement utile pour détecter la présence d'enzyme (chapitre V de cette thèse) ou encore pour créer des sondes de pH (chapitre III et IV).

### I.5.3 Durée de vie de fluorescence et transfert d'énergie NSET

**Durée de vie de fluorescence**

La durée de vie d'un état excité se définit comme le temps moyen pendant lequel un fluorophore (molécule ou particule) est excité. Dans le cas d'une population de fluorophores, la durée de vie de fluorescence correspond au temps moyen de décroissance de la population de fluorophores excités simultanément. Ce temps de vie moyen peut s'écrire sous la forme de l'équation I.13. On définit $N(t)$ le nombre de fluorophores encore excités au temps $t$ et $N_0$ la population initialement excitée.

$$< t > = \frac{\int t\ N(t)dt}{\int N(t)dt} \tag{I.13}$$

La vitesse de désexcitation d'une population N(t) en fonction du temps peut s'écrire à partir des constantes cinétiques avec une loi de vitesse d'ordre 1, d'après I.14.

$$dN(t) = -(k_r + k_{nr})N(t)dt \tag{I.14}$$

En intégrant cette loi de vitesse on obtient l'équation I.15.

$$N(t) = N_0\ e^{-(k_r + k_{nr})t} = N_0\ e^{-t/\tau_D} \tag{I.15}$$

Dans ce cas, l'équation I.13 peut-être simplifiée en utilisant I.15, puis en intégrant par partie on remarque que ce temps moyen $< t >$ correspond, en fait, à $\tau_D$, la durée de vie de fluorescence de la molécule ayant un déclin mono-exponentiel, équation I.16.

$$< t > = \frac{\int_0^\infty t\ e^{-t/\tau_D} dt}{\int_0^\infty e^{-t/\tau_D} dt} = \tau_D \tag{I.16}$$

Il n'est pas possible de mesurer directement le nombre de molécules excitées, en revanche, il est possible de mesurer le déclin de l'intensité de fluorescence $i(t)$ après une brève excitation laser, en fonction du temps $t$. Par définition, le rendement quantique de fluorescence $\phi_D$ correspond

au rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Pendant un intervalle de temps t, ce rendement peut s'écrire selon I.17.

$$\phi_D = \frac{i(t).dt}{-dN(t)} \tag{I.17}$$

En dérivant $dN(t)/dt$ avec l'expression de $N(t)$ de l'équation I.15, et sachant que $\phi_D = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r.\tau_D$, on obtient l'équation I.18.

$$i(t) = k_r N_0 e^{-t/\tau_D} = i_0.e^{-t/\tau_D} \tag{I.18}$$

La forme du déclin d'intensité de fluorescence en fonction du temps est donc une exponentielle décroissante, qui peut aussi être tracée en échelle logarithmique, comme représenté sur la **figure I.32**. La pente du déclin, en échelle logarithmique, est donc proportionnelle à l'inverse de la durée de vie de fluorescence.

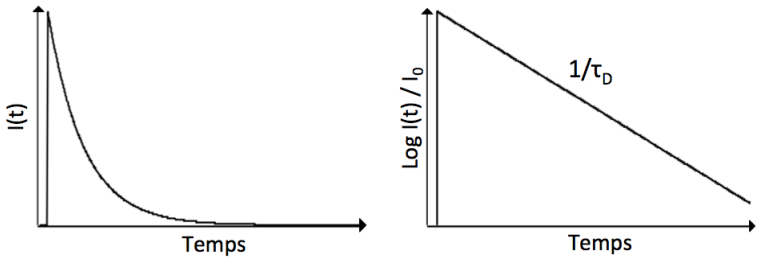



FIGURE I.32 – Déclin de fluorescence mono-exponentiel représenté selon une échelle linéaire et logarithmique.

Par ailleurs, si l'intensité $i(t)$ est normalisée par $i_0$, alors l'intégrale de $i(t)$ entre l'instant 0 et l'infini est directement égale à $\tau_D$, i.e. au temps de vie de fluorescence moyen.

### Mesures de $E_{\mathrm{NSET}}$ grâce à la fluorescence et à la durée de vie de fluorescence

Expérimentalement, il est possible de mesurer le transfert d'énergie NSET entre un QD et des AuNP : soit à l'aide de la fluorescence soit à l'aide de mesure de durée de vie de fluorescence.

Grâce à l'intensité des spectres de PL (photoluminescence) *i.e.* : $i_D$ et $i_{DA}$ sans et avec particule d'or (respectivement D et DA), il est possible de remonter à l'efficacité de transfert d'énergie entre un QD et une ou plusieurs particules d'or, comme écrit dans l'équation I.19.

$$E_{\mathrm{FRET}} = 1 - \frac{i_{DA}}{i_D} \tag{I.19}$$

Il est aussi possible de mesurer cette efficacité de NSET grâce aux mesures expérimentales d'intensité de PL résolue en temps. En effet, lorsqu'il y a du NSET, ce phénomène vient s'ajouter aux autres processus de désexcitations non radiatifs. $k_{\mathrm{NR'}}=k_{\mathrm{NR}}+k_{\mathrm{NSET}}$, donc la durée de vie de fluorescence diminue. Les mesures du temps de vie en l'absence puis en présence de l'accepteur

(respectivement $\tau_D$ et $\tau_{DA}$) permettent de réaliser une mesure du FRET et de quantifier ce transfert d'énergie via l'équation I.20.

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \tag{I.20}$$

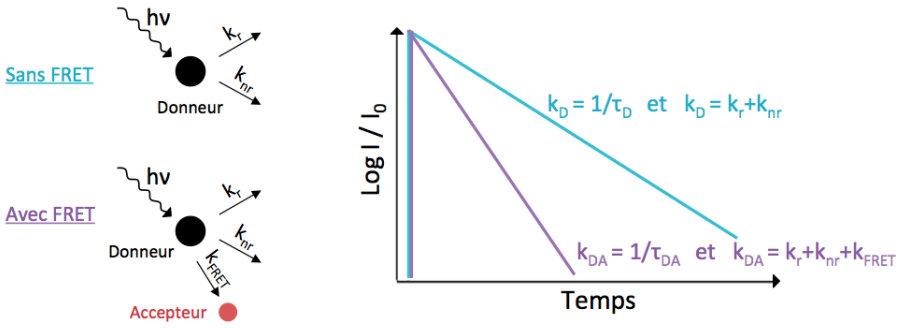



FIGURE I.33 – Comparaison de déclin de fluorescence en absence et présence d'accepteur donc respectivement sans ou avec FRET.

Il est cependant nécessaire de préciser que le déclin de fluorescence des QDs n'est pas purement mono-exponentiel. En effet, même si la synthèse des QDs semble être relativement monodisperse, chaque QD est différent. Il y a donc une certaine distribution en taille des coeurs et en épaisseur des coques. De plus, même pour un QD unique, le temps de vie fluctue dans le temps à cause des changements d'environnement, de charge... ce qui modifie les différents processus de désexcitation [172].

Ces deux mesures vont tout de même nous permettre dans cette thèse d'obtenir une estimation des transferts d'énergie entre QD et AuNP.

## Conclusion du chapitre I

Ce chapitre souligne l'intérêt que peuvent présenter les nanoparticules inorganiques dans le domaine biomédical, que ce soit pour faire de l'imagerie ou de la thérapie. Différents types de nanoparticules semblent très prometteurs que ce soit pour l'imagerie optique, pour l'IRM, pour l'imagerie photoacoustique ou encore pour l'imagerie par tomographie X. Les propriétés physico-chimiques exceptionnelles des NP en font de nouveaux agents de contrastes potentiels pour toutes ces techniques d'imagerie. Les NP présentent des avantages et inconvénients différents de ceux des molécules organiques. L'utilisation de ces NP permet d'augmenter le contraste ou la résolution spatiales de ces techniques d'imagerie. Néanmoins, les plus grandes limites des NP sont leur manque de stabilité et leur toxicité pour des applications en clinique.

Les ligands à la surface des NP jouent un rôle crucial pour l'utilisation de NP *in vivo*. Ces molécules organiques permettent aux nanocristaux non seulement d'être en bonne suspension colloïdale mais elles influent aussi sur leur furtivité. Par ailleurs, les ligands à la surface des NP peuvent permettre un ciblage de certains organes, tissus, protéines...

Les Quantum Dots (QD) sont des nanoparticules particulièrement intéressantes car elles possèdent des propriétés optiques remarquables, ce qui permet de les envisager comme agents d'imagerie optique. Le plus grand avantage des QD par rapport aux molécules organiques est leurs bien meilleurs rendements quantiques dans l'IR court (SWIR). Ceci permet de faire de l'imagerie dans la seconde fenêtre de transparence biologique des tissus, d'avoir moins d'autofluorescence des tissus mais aussi de diminuer fortement la diffusion. Cette nouvelle gamme d'énergie permet de faire de l'imagerie optique en profondeur dans les tissus avec une bien meilleure résolution spatiale.

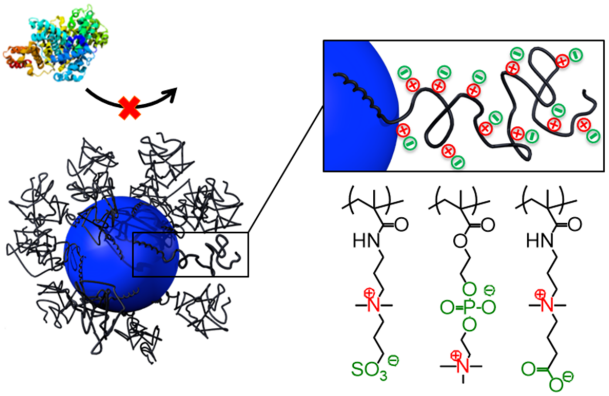
Par ailleurs, il est possible de moduler l'intensité de fluorescence des QD à l'aide de particules d'or qui peuvent, si celles-ci sont suffisamment proche spatialement des QD, inhiber leur fluorescence par transfert d'énergie non radiatif. Cette modulation pourrait trouver de nombreuses applications : la détection d'enzymes mais aussi la création de sondes sensibles au pH, à la température, à la quantité de dioxygène, à un potentiel rédox...

Chapitre II

# Adsorption non spécifique de protéines sur des QD-Zwitterioniques

**Résumé du chapitre**

Ce chapitre traite de l'importance des ligands à la surface des nanoparticules pour des applications biologiques. Les polymères zwitterioniques semblent être de bons candidats pour réduire l'adsorption non spécifique de protéines une fois les particules injectées dans des milieux biologiques, cependant aucune étude ne montre l'absence totale de couronne protéique. Dans ce chapitre, une étude fine portant sur la formation de couronne dure (irréversible) et de couronne dynamique (réversible) de protéines a été réalisée sur des nanocristaux recouverts de différents polymères zwitterioniques. L'objectif a été de comparer plusieurs zwitterions et d'étudier l'influence de l'ajout de quelques charges positives ou négatives modifiant ainsi la neutralité du zwitterion.



## Sommaire

**II.1 Synthèse des différentes particules zwitterioniques . . . . . 61**
II.1.1 Synthèse des QD . . . . . 61
II.1.2 Synthèse des polymères zwitterioniques et caractérisations . . . . . 62
II.1.3 Synthèse des polymères dibloc zwitterion-imidazole . . . . . 62
II.1.4 Échange de ligands à la surface des Quantum Dots . . . . . 65
II.1.5 Comparaison des différentes chimies de surface . . . . . 67
**II.2 Quantification des interactions non spécifiques . . . . . 69**
II.2.1 Mesures *in vitro* de la couronne dure de protéines : dosage à la fluorescamine . . . . . 70
II.2.2 Mesures *in vitro* de la couronne dynamique de protéines : mesures par FCS . . . . . 71
II.2.3 Mesures dans des cellules vivantes de la couronne de protéines : suivi de QD unique dans le cytoplasme . . . . . 74
**II.3 Résultats et discussion . . . . . 75**
II.3.1 Comparaison des différents QD-zwitterions . . . . . 75
II.3.2 Influence de l'ajout de fonctions chimiques chargées . . . . . 81
II.3.3 Influence de la fonction d'ancrage des polymères à la surface des QD . 84
II.3.4 Importance de la pureté des polymères . . . . . 85
II.3.5 Imagerie *in vivo* dans les cellules et marquage biologique . . . . . 88

# Introduction et objectifs du projet

## Introduction

Les nanoparticules ont un avenir prometteur dans les domaines du diagnostic, de l'imagerie biologique et médicale et de la thérapie grâce à leurs propriétés physico-chimiques uniques. Toutefois, à l'heure actuelle, leur utilisation en biologie reste limitée pour diverses raisons comme leur manque de stabilité colloïdale, leur toxicité, leur perte de fonctionnalité ou encore à cause d'adsorptions non spécifiques. La plupart de ces inconvénients proviennent d'une chimie de surface imparfaite. En effet, les ligands organiques accrochés à ces nanoparticules, également appelés chimie de surface, jouent un rôle central pour leur utilisation *in vitro* ou *in vivo*. Cette chimie de surface va déterminer la stabilité colloïdale des nanoparticules dans différents milieux biologiques mais va aussi induire différentes interactions désirées ou non avec les constituants chimiques et biologiques du milieu dans lequel elles se trouvent [173]. Afin d'utiliser des nanoparticules dans des milieux biologiques, il est primordial de mieux comprendre ces interactions. Actuellement, une des grandes limitations pour leur utilisation est l'adsorption non spécifique de protéines à la surface des nanoparticules [78–82]. En effet, il y a très fréquemment apparition d'une couronne de protéines à la surface des nanoparticules lorsque celles-ci se trouvent dans des fluides biologiques tels que du sang, du plasma, un milieu intracellulaire... On distingue la couronne dure de la couronne dynamique de protéines en fonction du type d'interactions (respectivement fortes ou faibles) et de la réversibilité de la liaison protéine-nanoparticule (respectivement irréversible ou réversible). Cette couronne de protéines va jouer un rôle très important car elle peut entrainer l'agrégation des nanoparticules, modifier leur ciblage (marquage non-spécifique) et leur biodistribution ou encore être reconnue par le système immunitaire et diminuer le temps de circulation des particules dans le sang [174, 175].

La recherche scientifique s'est d'abord beaucoup intéressée au polymère PEG : poly(éthylène glycol) comme fonction hydrophile car il peut disperser et stabiliser les nanoparticules dans l'eau sur une grande gamme de pH. De plus, il y a peu d'adsorption non spécifique de protéines sur le PEG ce qui augmente le temps de circulation des nanoparticules et améliore le ciblage [176]. Cependant, bien que ce polymère diminue la couronne de protéines à la surface des nanoparticules, il ne la supprime pas entièrement [177–180]. Par ailleurs, le PEG n'est pas biodégradable et son accumulation *in vivo* peut causer des effets indésirables. Il a aussi été montré que ce polymère peut déclencher des réponses immunitaires qui limiteraient le ciblage de la nanoparticule chez le patient [181]. Plus récemment, plusieurs polymères hydrophiles ont été proposés comme alternatives au PEG, par exemple les polysaccharides ou les polybétaïnes. Les bétaïnes sont des composés zwitterioniques présentant une charge positive (un ammonium quaternaire) et une charge négative séparées par peu de carbones (en général 2, 3 ou 4). Les zwitterions sont donc globalement neutres et présentent une nature super-hydrophile grâce à la forte hydratation de leurs fonctions chimiques chargées [182, 183]. Récemment, des ligands zwitterioniques ou

polyzwitterioniques ont été utilisés pour solubiliser de nombreuses nanoparticules telles que des billes de silices [184–187], de l'or [188–196], des quantum dots [197–211], des SPION [212–216] et encore beaucoup d'autres... De plus, des études annoncent qu'il y aurait une plus faible réponse immunitaire après injection de protéines encapsulées dans des zwitterions par rapport à des protéines recouvertes avec du PEG [217, 218]. Les zwitterions semblent donc être d'excellents candidats pour réduire ces interactions nanoparticules - protéines.

Contrairement aux études sur des nanoparticules PEGylées (recouvertes de PEG), il y a très peu d'études sur les interactions non spécifiques entre des biomolécules et des nanoparticules recouvertes de polymères zwitterioniques. Seule une étude montre par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) qu'il y a peu d'adsorption non spécifique avec un petit ligand sulfobétaïne (zwitterion avec un sulfonate comme charge négative) dans une solution d'albumine humaine (protéine très présente dans le sang) par rapport à des ligands chargés à la surface de QD [219]. Aucune étude n'a été réalisée sur des nanoparticules pour étudier l'influence de la fonction chimique négative des zwitterions sur la couronne de protéines bien que la nature de cette charge influence beaucoup l'hydratation. De plus, aucune étude n'a été réalisée dans des milieux biologiques complexes tels que du sérum humain ou à l'interieur du cytoplasme cellulaire.

### Objectifs

Dans ce projet, une analyse fine des couronnes dures et dynamiques de protéines a été réalisée sur des nanoparticules recouvertes de différents polymères zwitterioniques. En tant que nanoparticules modèles, les quantum dots (nanocristaux de semiconducteurs) ont été sélectionnés car leurs propriétés optiques de fluorescence vont permettre d'atteindre un seuil de détection ultra-sensible de nos particules (jusqu'au suivi de particules individuelles même dans des milieux biologiques complexes).

Pour caractériser ces couronnes de protéines, des analyses *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées. Deux analyses *in vitro* portant sur les couronnes dures et dynamiques ont été effectuées respectivement par dosage fluorimétrique et par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) après incubation des QD-zwitterioniques dans une solution d'albumine ou du serum humain pur. La troisième analyse est une mesure de dynamique de diffusion des QD-zwitterioniques dans le cytoplasme de cellules vivantes. Au cours de ce projet, j'ai réalisé les synthèses de QD, les polymères, les échanges de ligands, les caractérisations des particules ainsi que la mise en place des deux techniques d'analyse *in vitro*. Les analyses de RMN DOSY ont été réalisées en collaboration avec François Ribot, au LCMCP. La dernière technique d'analyse de nos particules dans des cellules a été réalisée par nos collaborateurs à l'Institut Curie dans l'équipe de Maxime Dahan avec en particulier le doctorant Elie Balloul. J'ai également effectué toutes les

interprétations des résultats ainsi que l'analyse de la dégradation du polymère carboxybétaïne (analyses RMN incluses).

Dans ce projet, différentes études ont été menées à l'aide de ces trois techniques d'analyse. Une première étude porte sur l'influence de la fonction chimique négative du zwitterion sur l'adsorption non spécifique de protéines. Trois polymères zwitterions bétaines, ayant tous un ammonium quaternaire (charge positive = $R_4N^+$) mais chacun une fonction chimique négative différente, ont été sélectionnés : phosphorylcholine (phosphate = $RPO_4^-R$), carboxybétaïne (carboxylate = $RCO_2^-$) et sulfobétaïne (sulfonate = $RSO_3^-$).
Une seconde étude a été réalisée sur l'influence de la taille des polymères à la surface des nanoparticules ainsi que sur l'influence du vieillissement dans le temps des particules. Les nanoparticules-zwitterioniques ont-elles toujours le même comportement ?
La dernière étude de ce projet porte sur l'influence de l'ajout très faible de charges négatives ou positives sur les polymères zwitterioniques initialement globalement neutres. Cette étude prouve l'importance de synthétiser des polymères très purs avant de les accrocher à la surface des nanoparticules comme il le sera démontré dans une dernière partie.

## II.1 Synthèse des différentes particules zwitterioniques

### II.1.1 Synthèse des QD

Pour ce projet, les nanoparticules utilisées sont des Quantum Dots car leur propriétés optiques de fluorescence permettront d'analyser la couronne de protéines avec une bonne sensibilité. Cependant, nous pensons que les résultats de ce projet dépendent principalement de la chimie de surface plutôt que du type de nanoparticule (pour des tailles et densités de greffage identiques). D'ailleurs, très récemment, des études au sein de notre laboratoire montrent qu'avec la même chimie de surface des NP d'oxyde de fer ont un comportement similaire aux QD.
Les QD utilisés pour ce projet sont des QD développés depuis plusieurs années [122, 220]. Leur synthèse est très bien maîtrisée et leurs propriétés optiques déjà caractérisées. Ces particules sont robustes et ont un vieillissement lent (possibilité de les utiliser pendant plusieurs années). Les QD de ce projet sont des semi-conducteurs coeurs/coques : CdSe/CdS/ZnS. La synthèse a déjà été expliquée dans le chapitre introductif : la première étape est la synthèse du coeur de CdSe, puis après lavages par précipitation dans l'éthanol, les coeurs sont re-suspendus dans l'hexane. La synthèse de la coque est effectuée par la méthode SILAR (technique expliquée dans le chapitre I). Les coeurs-coques sont à nouveau lavés par précipitation dans l'éthanol et suspendus dans l'hexane. Ces nanoparticules font environ 7 nm de diamètre et leur longueur d'onde d'émission maximale est à 610 nm dans le visible comme observé sur la **figure II.1**, ils émettent donc dans le rouge. Comme la synthèse est effectuée en milieu organique, il est nécessaire ensuite de transférer les particules dans l'eau. Comme expliqué dans le premier

chapitre, un échange avec l'Acide Mercaptopropionique (MPA) est effectué dans une première étape. Les QD sont alors recouverts de MPA, un petit ligand, accroché par un monothiolate. Ces ligands sont très labiles et pourront se désorber de la surface lors de l'ajout du polymère contenant plusieurs fonctions d'accroche. Les rendements quantiques de fluorescence de ces QD sont typiquement de 70% en milieu organique et d'environ 50% dans l'eau.

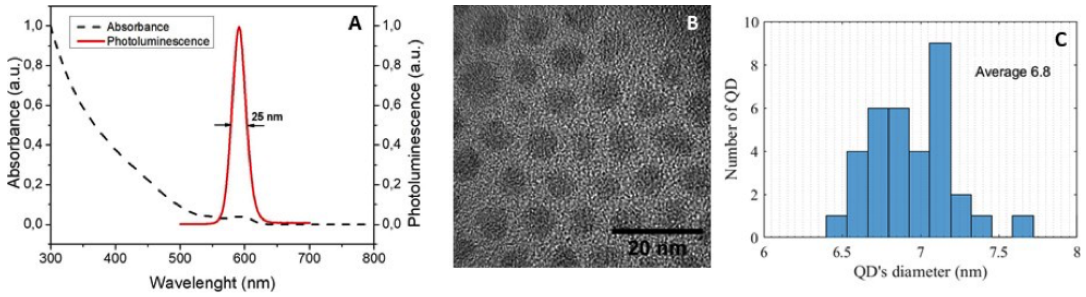



FIGURE II.1 – (A) Spectre d'absorption et d'émission de photoluminescence des QD dans l'hexane ; (B) Image TEM des QD ; (C) Distribution en taille des QD.

### II.1.2 Synthèse des polymères zwitterioniques et caractérisations

### II.1.3 Synthèse des polymères dibloc zwitterion-imidazole

Les polymères utilisés dans cette étude sont composés de deux blocs : un bloc permettant l'accroche du polymère sur la nanoparticule et un bloc hydrophile permettant de solubiliser les particules. Il est possible de s'inspirer des travaux de Mattoussi *et al.* [142] et d'utiliser un polymère à base d'acide dihydrolipoïque (DHLA), molécule contenant une fonction dithiol, qui permet au polymère d'être mieux ancré à la surface du QD par rapport au MPA qui ne présente qu'une fonction monothiol [206]. Toutefois, les fonctions thiols sont sensibles à long terme à l'oxydation, ce qui diminue leur stabilité dans le temps. Ils peuvent aussi être le siège de réactions parasites si l'on souhaite faire de la bioconjugaison. Afin d'éviter ces problèmes, a été développé dans notre laboratoire un nouveau type de polymère à base d'imidazole multidentate [145]. Les imidazoles ont une bonne affinité avec la surface inorganique des QD, ils ne sont pas sensibles à l'oxydation et n'interfèrent pas dans des réactions de bioconjugaison.

Les ligands développés, ici, sont des polymères diblocs zwitterion-imidazole. Les trois zwitterions étudiés dans ce projet sont le sulfobétaïne (SB), le phosphorylcholine (PC) et le carboxybétaïne (CB) comme représenté en **figure II.2**. Ces polymères ont été synthétisés par polymérisation RAFT à partir de monomères soit méthacrylamides soit méthacrylates. La polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT (expliquée en annexe) permet de maîtriser la masse molaire du polymère, d'avoir une faible polydispersité et de synthétiser différents types de polymères (bloc, statistique...) [221]. Pour ce projet, des polymérisations en blocs sont sélectionnées afin qu'un maximum d'imidazole s'accroche à la surface du QD. Cette architecture

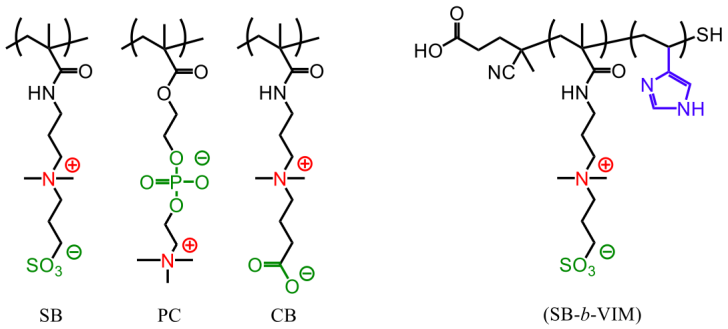



FIGURE II.2 – Polyzwitterions : sulfobétaïne (SB), phosphorylcholine (PC) et carboxybétaïne (CB) utilisés dans ce projet. Polymère dibloc suflobétaïne-vinylimidazole (SB-b-VIM).

en bloc devrait aussi éviter que des fonctions d'ancrage ne soient exposées à l'environnement extérieur ce qui induirait des interactions non-spécifiques. Par ailleurs, l'équipe de Greytak *et al.* compare des QD recouverts de polymères blocs et statistiques avec la même composition et la même masse molaire, et montre que les polymères blocs sont plus fortement ancrés à la surface des QD [158].

L'agent RAFT utilisé est l'acide 4-cyano-4-(thiobenzoylthio)pentanoïc (appelé CTA pour "chain transfer agent") et l'amorceur de radicaux est soit l'azobisisobutyronitrile (AIBN) soit le 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride (V50), représentés **figure II.3.** Lors

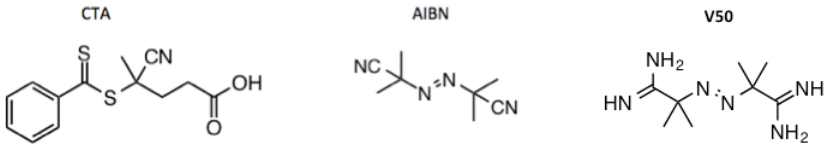



FIGURE II.3 – Molécules utilisées pour faire de la polymérisation RAFT. A gauche l'agent RAFT : CTA. Au centre : l'amorceur de radicaux : AIBN. A droite : l'amorceur de radicaux : V50

d'une polymérisation de type RAFT, il est possible de contrôler la masse molaire du polymère en fonction des quantités d'agent RAFT et d'amorceur de radicaux incorporées lors de la synthèse. La relation est indiquée en équation **(II.1)** avec $Y$ la quantité de matière (en mol) de monomères, $N$ le nombre de monomères par polymère que l'on souhaite et $X$ la quantité de matière (en mol) d'agents de transfert à ajouter. En général, le rapport Amorceur/Agent RAFT est de X/5.

$$N \approx \frac{Y}{X} \tag{II.1}$$

La synthèse se déroule en deux étapes : la synthèse du premier bloc zwitterionique puis celle du second bloc vinylimidazole. Lors de la première étape le monomère zwitterionique, l'agent RAFT et le V50 sont dissous dans un tampon acétate (pH=5,2). Le mélange est mis à buller sous argon pendant 60 min puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C. Au bout

de 80 min la réaction est stoppée net en plaçant le ballon dans un bain de diazote liquide. Le polymère est ensuite précipité goutte à goutte dans de l'acétone. Les monomères zwitterioniques sont solubles dans l'acétone, contrairement au polymère. Le surnageant est incolore alors que le polymère est rose (couleur de l'agent RAFT). Le surnageant est éliminé par centrifugation. Le polymère est lavé par trois cycles de dissolution dans un minimum d'eau et de précipitation dans l'éthanol. Le polymère est ensuite séché sous cloche à vide pendant une nuit. Pour chaque polymère, le taux de conversion (% de monomères convertis en polymère) est obtenu par RMN $^1$H du polymère brut (avant lavage), un rendement massique est également obtenu et de la chromatographie par perméation de Gel (GPC) a été effectuée par Mohamed Hanafi du laboratoire SIMM à l'ESPCI, ce qui permet d'obtenir la masse molaire du polymère et son indice de polydispersité. Sur la **figure II.4** se trouvent les spectres RMN $^1$H du monomère zwitterionique sulfobétaïne (SB) ainsi que le spectre du polymère correspondant. Un élargissement des pics est observé lors de la formation du polymère.

Les synthèses exactes de tous les premiers blocs zwitterioniques sont détaillées en annexe. Les

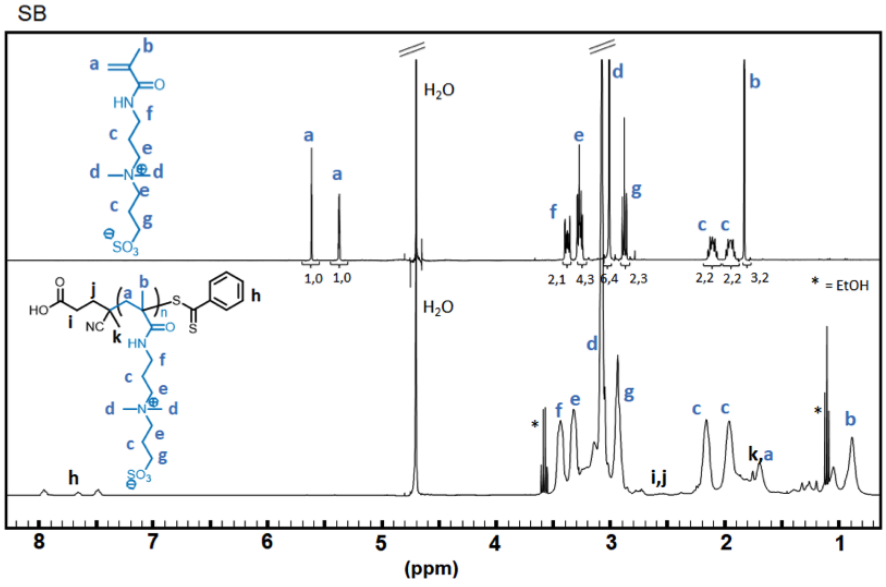



FIGURE II.4 – Spectre RMN $^1$H (D2O, 400 MHz) du monomère SB (haut) et premier bloc du polymère zwitterionique SB (bas).

premiers blocs se composent soit de fonctions sulfobétaïne (SB), phosphorylcholine (PC) ou carboxybétaïne (CB). Différentes masses molaires de polymères SB et PC ont été synthétisés pour pouvoir par la suite étudier l'influence de la taille des polymères. De plus, différents polymères à base de monomère SB méthacrylate ou méthacrylamide ont été synthétisés afin d'étudier aussi l'influence de la fonction chimique de polymérisation. Ces premiers blocs ont des masses molaires moyennes en nombre comprises entre 3 000 et 20 000 g.mol$^{-1}$ et des indices de polydispersité entre 1,07 et 1,1.

Tous ces polymères zwitterioniques vont dans une deuxième étape être réamorcés et agir comme des macro-agents RAFT pour que la polymérisation continue afin de former un second bloc avec du vinylimidazole noté VIM (avec environ 10 VIM par polymère). Pour la synthèse de ce second bloc, le polyzwitterion est dissous dans une solution d'acide acétique et d'eau salée (NaCl). Le monomère VIM est ajouté ainsi que de l'amorceur AIBN pour former à nouveau des radicaux permettant l'étape d'initiation lors de la polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon pendant 1h puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 6h. Le polymère est ensuite lavé par 3 cycles de précipitation dans l'éthanol puis redispersion dans l'eau et finalement séché sous cloche à vide pendant une nuit. Le polymère obtenu est un solide de couleur rose (provenant du goupement dithio-benzénique de l'agent RAFT). Ce groupement benzénique peut être éliminé en présence de tétrahydroborure de sodium $NaBH_4$. Les polymères obtenus sont des poudres blanches et se terminent par un groupe thiol. Les différentes étapes de la polymérisation sont représentées en **figure II.5**. Les taux de polymérisation atteignent 90% pour cette seconde étape. Des spectres RMN $^1$H ont été effectués pour chaque polymère afin de confirmer le taux de polymérisation et de quantifier le nombre de fonctions zwitterioniques par rapport aux fonctions imidazoles. Le spectre RMN $^1$H du polymère dibloc SB est représenté en **figure II.6**.

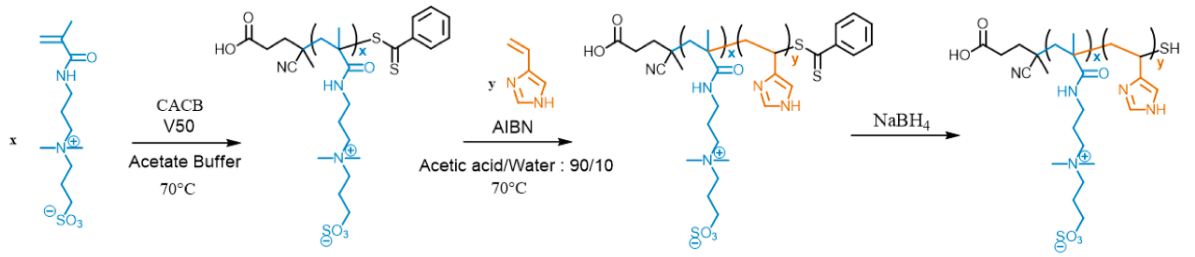



FIGURE II.5 – Les différentes étapes de synthèse du copolymère SB-VIM.

## II.1.4 Échange de ligands à la surface des Quantum Dots

Les QD sont tout d'abord transférés dans l'eau en deux étapes 1) substitution des ligands organiques oléates présents initialement après synthèse des QD par l'acide mercaptopropionique (MPA) ; puis 2) une étape d'échange de ligands à la surface des Quantum Dots est nécessaire afin de remplacer le MPA par les polymères dibloc zwitterion-imidazole. Ces différentes étapes sont schématisées sur la **figure II.7**.

Après synthèse, les QD dans l'hexane sont précipités dans l'éthanol, qui est un mauvais solvant, puis centrifugés. Les QD sont ensuite repris dans du MPA pur et laissés pendant 4h à 60°C afin d'accélérer la cinétique de l'échange. Puis, les QD-MPA sont précipités et centrifugés dans du chloroforme afin d'éliminer le MPA en excès. Les QD sont ensuite re-dispersé en bon solvant dans du dimethylformamide (DMF) et du tert-butoxide de potassium (pKa=17) est ensuite

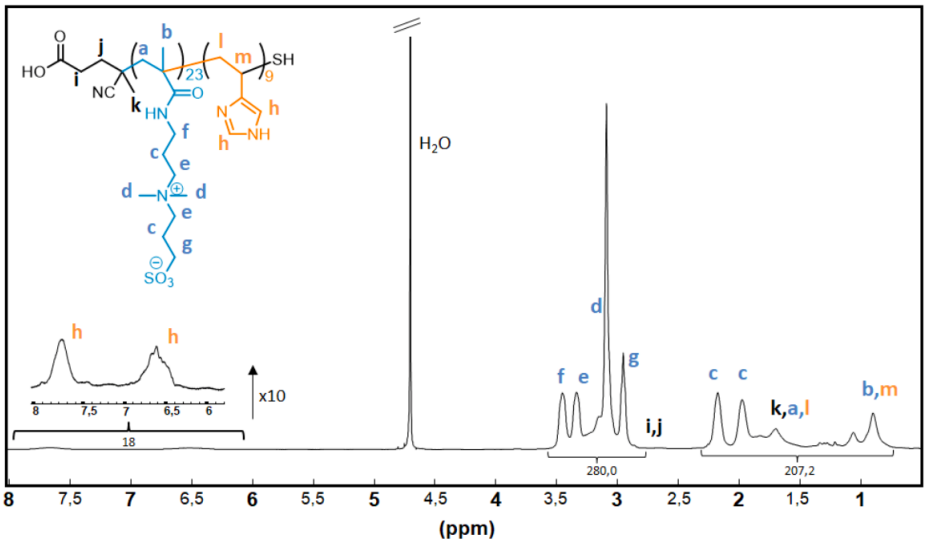



FIGURE II.6 – Spectre RMN $^{1}$H (D2O, 400 MHz) du copolymère SB.

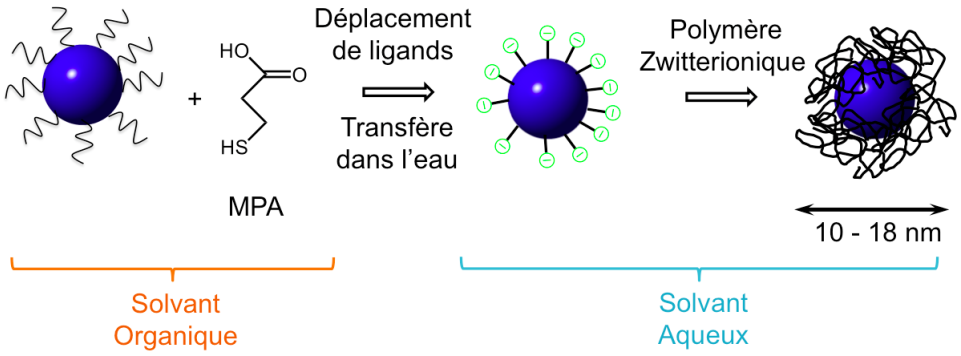



FIGURE II.7 – Schéma représentant les différentes étapes d'échange de ligands à la surface des QD.

ajouté afin de déprotonner la fonction acide carboxylique du MPA. Les QD-MPA sont désormais chargés négativement et ne sont plus en bon solvant dans le DMF donc ils précipitent. Après centrifugation, les QD sont lavés avec de l'éthanol. Après une dernière centrifugation les QD peuvent être re-dispersés dans l'eau tamponnée à pH=9 afin de ne pas reprotoner les fonctions carboxylates du MPA.

En parallèle, le copolymère zwitterion-imidazole qui sera utilisé comme ligand est dissous dans un tampon bicarbonate (pH basique). Puis le polymère et la solution de nanoparticules sont mélangés et laissés une nuit à température ambiante. Le lendemain, les nanoparticules sont essorées et lavées avec de l'eau salée (150 mM en NaCl) sur une membrane de Vivaspin 100KDa. Théoriquement les polymères peuvent donc passer à travers la membrane alors que les QD sont retenus par cette dernière. Cependant, notre équipe a observé que le lavage uniquement par Vivaspin n'est pas optimal. Il reste du polymère libre. Une seconde étape de lavage est donc nécessaire. Celle-ci est effectuée par ultracentrifugation (268 000 g pendant 25 min) sur gradient

de sucrose, permettant un gradient de viscosité. Ce lavage permet de séparer par tailles et densité les différents composés présents en solution : polymères libres, les QD-zwitterions et les QD agrégés si l'échange ne s'est pas bien déroulé. Les QD-Zwitterions sont ensuite récupérés et lavés afin d'éliminer l'excès de sucrose. Les particules sont finalement resuspendues dans un tampon HEPES/Na à pH=7,5 et à 150 mM de sel NaCl. Ces QD-zwitterions sont alors très stables et peuvent être conservés plusieurs mois à 4°C.

### II.1.5 Comparaison des différentes chimies de surface

Afin de pouvoir étudier les interactions protéines-QD en fonction des différents zwitterions, il est tout d'abord nécessaire de s'assurer que les chimies de surface sont toutes comparables. Il est impératif de vérifier à la fois que le nombre de fonctions d'ancrage par QD est proche mais aussi que la densité surfacique de recouvrement des polymères à la surface des QD est similaire. Il faut bien s'assurer qu'il n'y ait pas de "trou" à la surface de la nanoparticule car cela induirait beaucoup d'adsorption non spécifique comme cela a été montré par Walkey *et al.* [222].

Après une première analyse par RMN $^{1}$H, il est possible d'évaluer approximativement le nombre de vinylimidazole (VIM) par polymère. Pour chacun des polymères synthétisés, il semble qu'il y ait entre 7 et 10 VIM, ce qui est totalement comparable et devrait permettre une bonne accroche du polymère sur les QD.

Des analyses par RMN $^{1}$H en solution et RMN DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) ont été effectuées sur chacun de nos échantillons QD-Zwitterion afin de pouvoir remonter à un nombre de polymères par QD et donc à une densité surfacique de polymères. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec François Ribot au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP). (Le principe de la RMN 2D DOSY et les conditions expérimentales utilisées sont données en annexe.) La première étape a été de vérifier par RMN DOSY que les

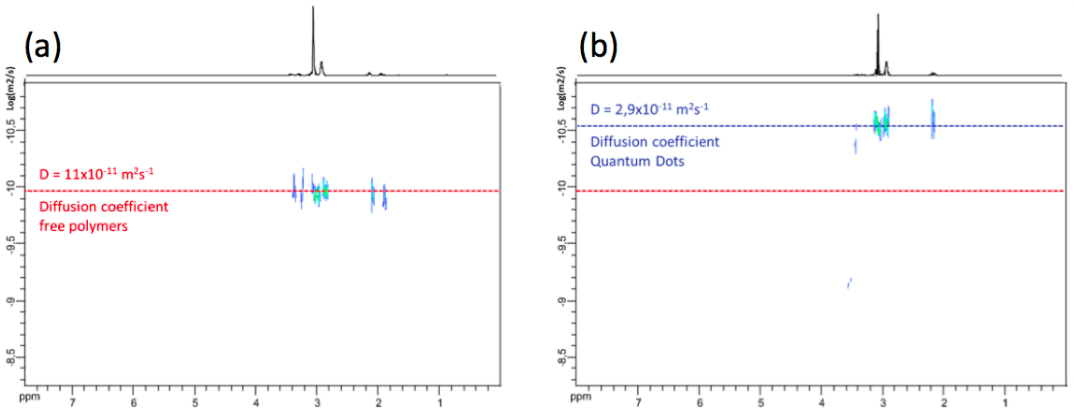



FIGURE II.8 – Spectres RMN 2D DOSY (a) du polymère libre SB dans $D_2O$ (b) d'une solution de QD-SB dans $D_2O$.

ligands ne se désorbent pas de la surface des QD. La RMN DOSY est une expérience de RMN à deux dimensions. Une dimension correspond classiquement aux déplacements chimiques RMN des $^1$H et l'autre dimension aux coefficients de diffusion. Grâce à la RMN DOSY, dans notre expérience, il est possible de distinguer les pics provenant des polymères zwitterions libres et les pics provenant des zwitterions attachés à la surface des QD. Comme il peut être observé sur le spectre de la **figure II.8(a)**, le polymère libre SB seul possède un coefficient de diffusion de $D = 11.10^{-11}$ m$^2$.s$^{-1}$. Grâce au spectre de la figure **II.8(b)**, il est possible d'obtenir le signal des protons de l'échantillon QD-SB et le coefficient de diffusion $D = 2,9.10^{-11}$ m$^2$.s$^{-1}$ obtenu correspond bien à celui de nanoparticules. Ce coefficient est plus faible car les QD-zwitterions sont beaucoup plus gros que le polymère libre or le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la taille. Le polymère zwitterion accroché à la surface des QD possède le même coefficient de diffusion que celui des particules. Aucun polymère libre n'est détecté dans l'échantillon de QD purifiés ce qui prouve i) que les étapes de purification lors de l'échange de ligands sont efficaces et ii) que le polymère une fois accroché à la surface des QD ne se désorbent pas (pour des concentrations en QD de l'ordre du µM).

Dans un deuxième temps, il a été possible de quantifier le nombre de ligands par QD grâce à des mesures de RMN $^1$H. Pour chaque ligand polymère zwitterionique, un spectre RMN $^1$H du polymère libre a été utilisé comme référence (avec [polymère] = 10 µM connue) puis un second spectre du QD-zwittérions a été réalisé (avec [QD] = 2 µM connue) exactement avec les mêmes conditions expérimentales. Afin d'estimer le nombre de ligands accrochés par QD, une comparaison de l'intégrale de chacun des signaux a été effectuée deux à deux. Ceci permet d'obtenir le nombre de polymères accroché par QD (noté Nb). Par la suite, en connaissant la masse molaire de chaque polymère (M) et le rayon (R) des QD, il est possible de remonter à la densité (D) de polymères par QD d'après le calcul II.2.

$$\text{Densité de polymères / QD} = \frac{M.Nb}{4.\pi.R^2.Na} \tag{II.2}$$

Tous ces résultats sont présentés dans la table II.1. Il est intéressant de remarquer que, si le nombre de ligands par QD est différent en fonction de chaque échantillon QD-zwitterion, en revanche, la densité surfacique de recouvrement des nanoparticules reste la même, autour de 1 mg.m$^{-2}$, indépendamment de la taille du polymère ou du type de zwitterions. Il sera donc possible de comparer ces différentes particules entre elles lors des analyses d'interactions non spécifiques.

Par ailleurs, des mesures de potentiel Zéta (détail des conditions expérimentales en annexe) montrent que tous les QD-zwitterions sont globalement neutres à pH physiologique. Des analyses de taille en FCS (Fluorescence Correlation Spectrocopy) ont aussi été effectuées pour chaque QD-zwitterion.

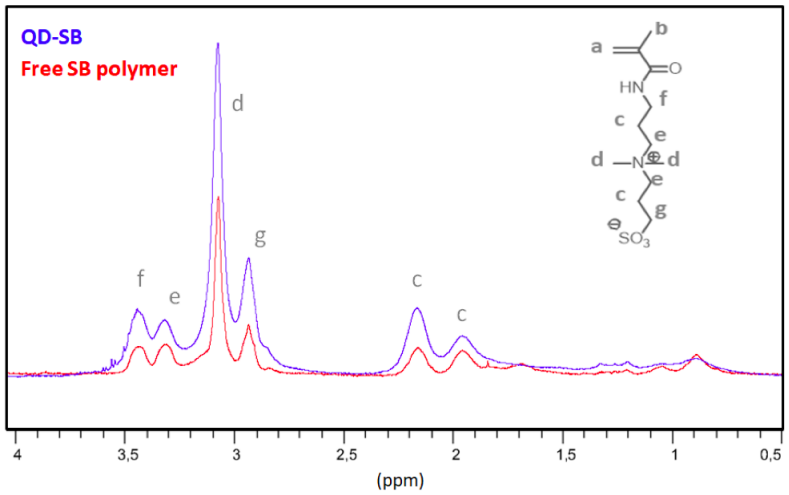



FIGURE II.9 – Comparaison du spectre RMN $^{1}$H des QD-SB (concentration [QD] = 2 µM et [polymère] = 37 µM, bleu) et du polymère libre SB (concentration [polymère] = 10 µM,rouge) dans D2O.

TABLE II.1 – Caractérisation des QD-zwitterions : masse molaire en nombre du polymère (Mn) ; indice de polydispersité IP ; potentiel Zeta sur 1 µM de QD ; rayon hydrodynamique obtenu par FCS ; nombre de polymères en moyenne par QD et densité surfacique de recouvrement.

| QD-Zwitterion | Mn (g.mol$^{-1}$) | IP | Potentiel Zeta (mV) | Rh (FCS) (nm) | Nb polymères / QD | Densité surfacique (mg.m$^{2}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| QD-SB | 3 400 | 1,12 | | 5,6 ± 0,5 | 27,5 | 1,0 ± 0,3 |
| QD-SB | 6 900 | 1,07 | -10 ± 3,4 | 6,3 ± 0,3 | 18,5 | 1,4 ± 0,3 |
| QD-CB | 4 500 | 1,08 | -4,7 ± 2,5 | 6,5 ± 0,3 | 21,5 | 1,0 ± 0,3 |
| QD-PC | 8 200 | 1,07 | -6,7 ± 2,8 | 7,3 ± 0,4 | 13,3 | 1,2 ± 0,2 |

## II.2 Quantification des interactions non spécifiques

Dans cette partie, trois techniques d'analyse permettant l'étude de la couronne de protéines formées autour des nanoparticules sont présentées. Deux analyse *in vitro* et une analyse *in vivo* ont été réalisées. La première méthode est une quantification directe de la couronne dure par dosage fluorimétrique, la deuxième est une mesure indirecte de la couronne dynamique qui étudie l'augmentation du rayon hydrodynamique des nanoparticules en présence de protéines et, enfin, la troisième est une mesure du coefficient de diffusion des nanoparticules à l'intérieur du cytoplasme des cellules. La couronne dure représente toutes les protéines adsorbées de façon irréversible sur les QD, contrairement à la couronne dynamique qui correspond à des adsorptions réversibles, comme représenté sur la **figure II.10**.

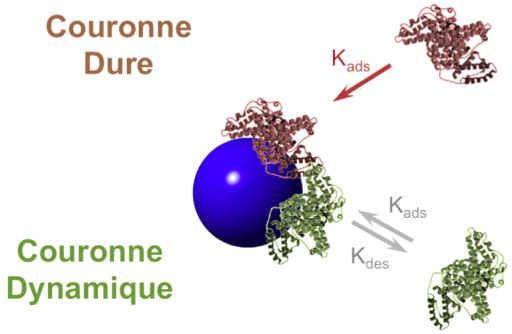



FIGURE II.10 – Adsorption de protéines à la surface de NP formant les couronnes dures et la couronnes dynamique, respectivement par adsorption irréversible ou réversible.

### II.2.1 Mesures *in vitro* de la couronne dure de protéines : dosage à la fluorescamine

Afin d'étudier les propriétés de furtivité des différentes chimies de surface zwitterioniques, une quantification de l'adsorption de protéines à la surface des QD a été effectuée après incubation des nanoparticules dans du Sérum Humain (HS = Human Serum) ou à une concentration millimolaire en albumine (BSA = Bovine Serum Albumin) qui est la protéine modèle la plus présente dans le sang (à 0,75 mM). Cette technique dose la couronne dure correspondant aux protéines attachées de façon irréversible. Cette analyse nécessite de laver de nombreuses fois les particules afin de ne doser que les protéines accrochées à la surface des particules et non celles restantes en solution, comme représenté sur la **figure II.11**.

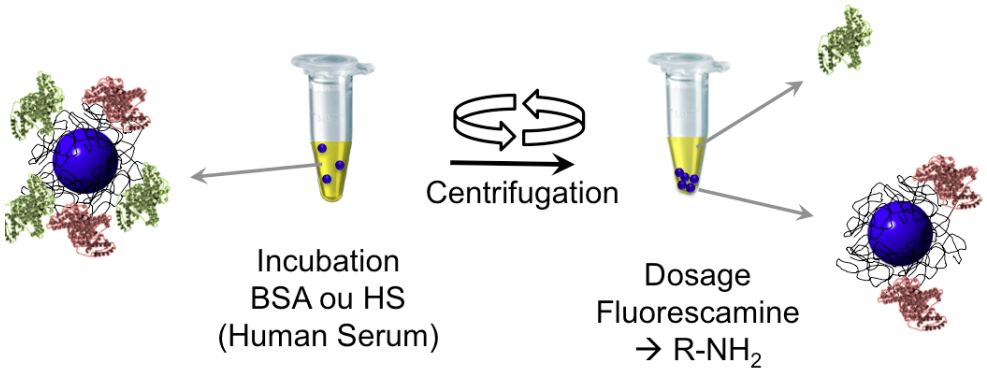



FIGURE II.11 – Principe de l'expérience de dosage *in vitro* de la couronne dure de protéines.

Les QD-zwitterion (1 µM) ont été incubés avec de la BSA (1 mM) ou du HS pendant 1 h, puis isolés des protéines libres ou faiblement liées par plusieurs cycles d'ultracentrifugation. Sept cycles à 268 000 g pendant 25 min sont nécessaires pour éliminer toutes les protéines. Dans chaque surnageant la quantité de protéines a été dosée afin de s'assurer que le nombre d'ultracentrifugations était suffisant. Les protéines fortement liées formant la couronne dure ont

été quantifiées par dosage à la fluorescamine après dissolution des QD inorganiques en solution acide (afin que les QD ne modifient pas le signal de fluorescence). La fluorescamine réagit avec les amines libres des protéines comme schématisé en **figure II.12**. Après obtention d'une droite de calibration avec des concentration connues en BSA, ce dosage permet d'obtenir le nombre moyen de protéines BSA par QD, ou bien un équivalent en BSA dans le cas de l'incubation dans le HS (1 éq. BSA correspondant à l'adsorption d'environ 66 000 g de protéines par mole de QD). Chaque mesure de fluorescence a été effectuée exactement 10 min après avoir mélangé les QD (dissous) et la fluorescamine en milieu tamponné à pH=8.5, évitant ainsi tout problème lié à l'hydrolyse éventuelle de la fluorescamine. Le protocole expérimental de cette analyse est détaillé en annexe. Ces dosages ont été réalisés 2 ou 3 fois par type de QD-zwitterions différents, avec une répétabilité de l'ordre de 10%.

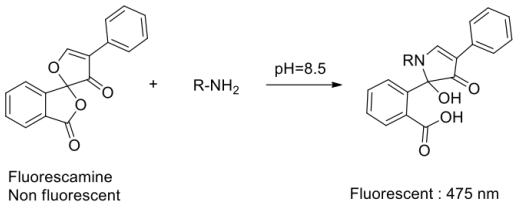



FIGURE II.12 – Réaction entre la fluorescamine et les amines primaires.

### II.2.2 Mesures *in vitro* de la couronne dynamique de protéines : mesures par FCS

Une analyse fine de la couronne dynamique de protéines a été réalisée par Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS = Fluorescence Correlation Spectroscopy). L'avantage de cette technique est de permettre une étude des interactions non spécifiques in situ entre protéines et QD dans un milieu concentré en protéines. Aucun lavage n'est necessaire ce qui permet donc d'étudier à la fois les couronnes dures et dynamiques de protéines adsorbées. Cette technique d'analyse est proche de la DLS (Dynamic Light Scattering) mais elle se base sur la fluorescence des particules plutôt que sur la diffusion de la lumière. Les protéines libres en solution n'étant pas fluorescentes (autour de 610 nm), elles ne seront pas détectées.

Le montage optique de cette expérience de FCS est présenté en **figure II.13**. Un laser Ti-Saphir émettant à 488 nm est réfléchi par un miroir dichroïque puis focalisé par un objectif à immersion (dans l'huile) à l'intérieur d'une gouttelette de solution de QD, 50 µm au dessus de la surface de la lamelle. Ceci permet de venir exciter tous les QD se trouvant dans le volume confocal du laser. Les photons provenant de la fluorescence des QD sont alors collectés par l'objectif, transmis à travers le miroir dichroïque (qui est un filtre passe haut, donc il ne réfléchit que les photons de longueur d'onde inférieurs à 500 nm et laisse passer ceux au dessus), puis la lumière est refocalisée en passant à travers un diaphragme et enfin couplée à deux photodiodes

à avalanche.

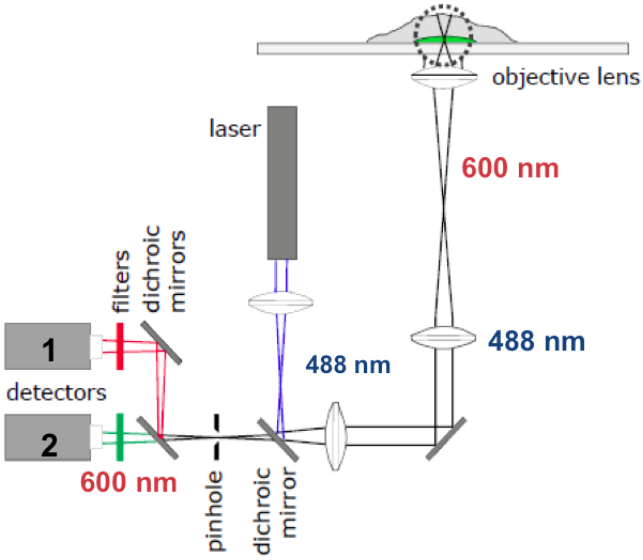



FIGURE II.13 – Montage optique de l'expérience de FCS.

Ensuite, l'analyse par FCS porte sur le calcul de la fonction mathématique de corrélation temporelle de l'intensité de fluorescence détectée par les deux photodiodes. L'objectif est de faire une mesure du temps moyen de circulation (temps de diffusion) des QD à travers le volume confocal. Les QD sont en solution aqueuse donc mobiles grâce au mouvement Brownien. L'intérêt est que ce temps moyen de circulation peut être relié au coefficient de diffusion de la particule et donc à son rayon hydrodynamique. Plus une nanoparticule sera grande, plus son temps moyen de diffusion sera élevé. Cette mesure, d'une précision nanométrique, permet d'étudier les adsorptions non spécifiques de protéines à la surface des QD car cela entrainera une augmentation de leur rayon hydrodynamique et donc du temps moyen de diffusion à travers le volume confocal. Un schéma du principe de la mesure est présenté en **figure II.14**.
Dans cette expérience, des QD ont été mis en solution tout d'abord avec différentes concentrations en BSA, afin de connaitre la concentration minimale d'apparition de la couronne protéique, puis directement dans une solution à 100 % de sérum humain (HS).

Dix minutes avant d'effectuer une mesure de FCS, les QD et la BSA ont été mélangés dans une solution tamponnée et salée d'HEPES/Na à pH=7,5. La concentration en QD a été fixée à 50 nM et celle en BSA varie de 0 µM à 1100 µM. Les QD (50 nM) ont aussi été incubés dans du HS non dilué pendant 1 h avant la mesure. La température d'incubation et de mesure a été fixée à 20°C. Une goutte de 100 µL de mélange protéines-QD est déposée sur une lamelle juste avant de réaliser la mesure. Pour chaque mesure, sont détectés les photons émis par les QD illuminés avec le laser pendant 2 min consécutives à 0,7 µW. La fonction d'autocorrélation, $G$, a été calculée à partir des fluctuations d'intensité, $I$, des photons provenant de l'émission des

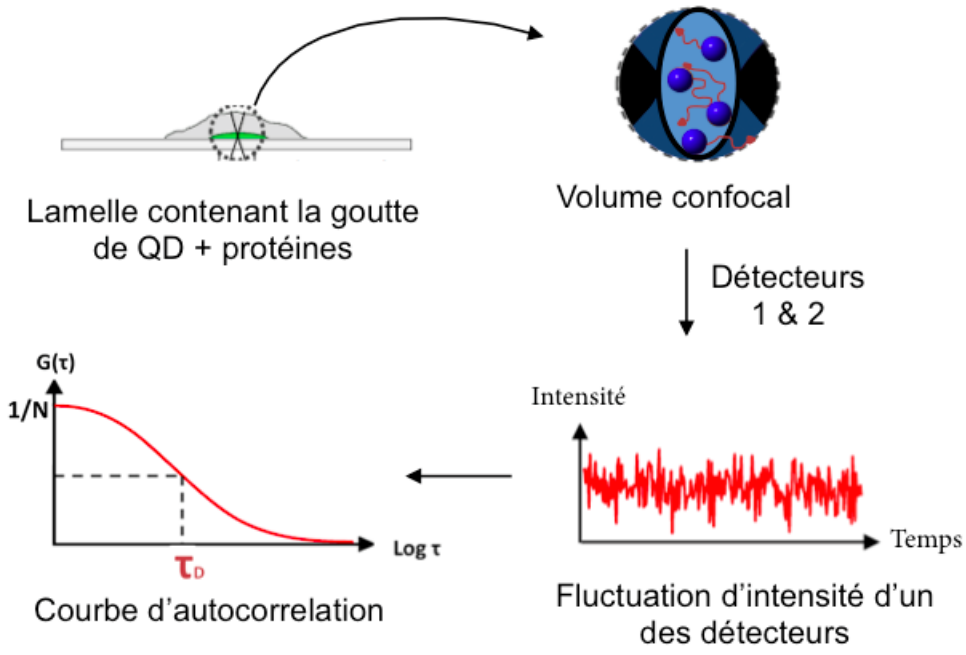



FIGURE II.14 – Schéma du principe de la mesure de FCS.

QD, selon l'équation II.3.

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)I(t)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} - 1 \tag{II.3}$$

A partir de cette équation II.3, en résolvant l'équation de diffusion (loi de Fick) en 3D et en faisant également l'hypothèse que le volume confocal est une gaussienne en 3D, on peut démontrer II.4. Une calibration préalable permet de connaitre le volume confocal avec $w_0$ et $z_0$ les dimensions radiale et axiale (respectivement). $\langle N\rangle$ correspond au nombre moyen de particules fluorescentes dans le volume confocal, relié à la concentration $C_N$ et au volume d'après II.5.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N\rangle}\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}\left(1+\left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \tag{II.4}$$

$$\langle N\rangle = C_N \pi^{3/2} w_0^2 z_0 \tag{II.5}$$

Le temps moyen de circulation des nanoparticules dans le volume confocal $\tau_D$ est obtenu à partir de l'ajustement de la courbe d'autocorrélation. Le coefficient de diffusion est calculé à l'aide de l'équation II.6.

$$D = \frac{w_0^2}{4\tau_D} \tag{II.6}$$

Finalement, le rayon hydrodynamique de la particule est obtenu avec la relation de Stokes-Einstein II.7. Avec $T$ la température et $\eta$ la viscosité.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \tag{II.7}$$

Des mesures de viscosité ont été réalisées et sont présentées en annexe. Des exemples de courbes expérimentales d'autocorrélation sont également présentes en annexe.

### II.2.3 Mesures dans des cellules vivantes de la couronne de protéines : suivi de QD unique dans le cytoplasme

Le comportement des QD-Zwitterioniques a également été étudié dans des milieux biologiques encore plus complexes tel que l'environnement intracellulaire. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Maxime Dahan à l'Institut Curie et en particulier avec Elie Balloul et Cornelia Monzel. Les interactions non spécifiques des nanoparticules avec les différents composants du cytoplasme vont modifier leurs dynamiques intracellulaires car elles conduisent à des mouvements sub-diffusifs et à une mobilité réduite au lieu du mouvement Brownien [223]. Les QD ont été injectés à l'intérieur du cytoplasme de cellules HeLa soit par micro-injection soit par électroporation. Aucune différence dans les résultats n'a été observée entre ces deux types d'injection. Dans la suite, nous ne parlerons que d'électroporation. Dans chacun des cas, il est possible d'injecter des concentrations en QD dans le cytoplasme d'environ 10-100 pM. Il est ensuite possible de suivre les trajectoires de QD unique comme schématisé en **figure II.15**. L'obtention de ces déplacements quadratiques moyens, pour chaque QD individuel, en fonction du temps, calculés sur 60 ms permet de remonter au coefficient de diffusion moyen des QD. Puis, sur des temps plus longs (jusqu'à 400 ms) l'écart à la linéarité permet d'obtenir un coefficient $\alpha$ qui traduit l'écart au mouvement Brownien ($\alpha$=1 correspond à un mouvement Brownien, $\alpha$<1 correspond à un mouvement sub-diffusif).

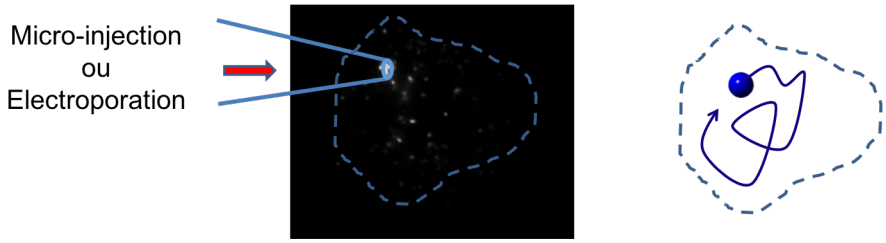



FIGURE II.15 – Schéma présentant le suivi de trajectoire de QD unique dans le cytoplasme de cellule HeLa après micro-injection ou électroporation.

Pour chaque nanoparticule (QD-Zwitterion) environ $5.10^5$ cellules HeLa ont été resuspendues dans du milieu de culture en présence d'environ 3-10 nmol de QD. Les QD peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules suite à un choc électrique très bref (15 ms ; capacité : 950 µF ; tension : 150 V) qui correspond à l'étape d'électroporation. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois par centrifugation (150 g) et resuspendues dans du milieu de culture. Ces dernière sont ensuite déposées sur une lamelle recouverte avec du collagène pour que les cellules se fixent. Plusieurs films (1000 images consécutives) peuvent ensuite être réalisés, avec un objectif à immersion à huile et une caméra, en illuminant les QD avec un laser à 488 nm (50 µW/µm$^2$) et un filtre d'émission à 630/50 nm. Ces films permettent d'obtenir des déplacements quadratiques moyens

en utilisant la formule suivante II.8.

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle = \left\langle [x(t+\tau)-x(t)]^2 + [y(t+\tau)-y(t)]^2 \right\rangle \tag{II.8}$$

L'obtention de ces déplacements quadratiques moyens sur 60 ms permettent de remonter au coefficient de diffusion $D$ des nanoparticules dans le cytoplasme selon II.9 et, sur des temps plus long : jusqu'à 400 ms, ils permettent de remonter au coefficient $\alpha$ indiquant éventuellement une dynamique anormale d'après II.10.

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle = 4D\tau \tag{II.9}$$

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle \propto \tau^{\alpha} \tag{II.10}$$

Pour chaque échantillon (QD-Zwitt) un couple (D,$\alpha$) est obtenu par trajectoire analysée permettant de tracer une carte bidimensionnelle des résultats de $\alpha$ en fonction de $\log(D_{60ms})$ comme présenté sur la figure modèle II.16.

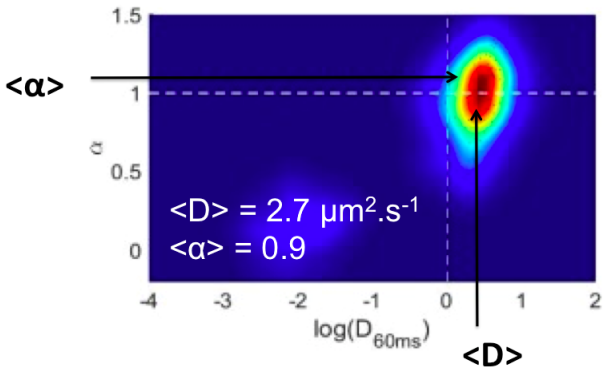



FIGURE II.16 – Carte 2D présentant les couples (D,$\alpha$) obtenus pour chaque trajectoire analysée d'un échantillon modèle.

## II.3 Résultats et discussion

Dans une première partie une étude portant sur la comparaison des différents zwitterions est proposée ; puis une seconde étude présentant l'influence de l'ajout de fonctions chimiques chargées est exposée, ce qui conduira à confirmer l'importance de la pureté des polymères synthétisés. Dans une toute dernière partie un marquage biologique dans le cytoplasme de cellules vivantes a été réalisé.

### II.3.1 Comparaison des différents QD-zwitterions

Tous les résultats de cette première étude sont présentés en **figure II.17**. Chaque ligne correspond à un polymère zwitterionique différent, de haut en bas : le sulfobétaïne (SB), le carboxybétaïne (CB) et le phosphorylcholine (PC). Chaque colonne correspond à une technique d'analyse des interactions non specifiques, de gauche à droite : analyse de la couronne dure par

dosage avec la fluorescamine, analyse de la couronne dynamique par FCS et mesure *in vivo* dans le cytoplasme des cellules.

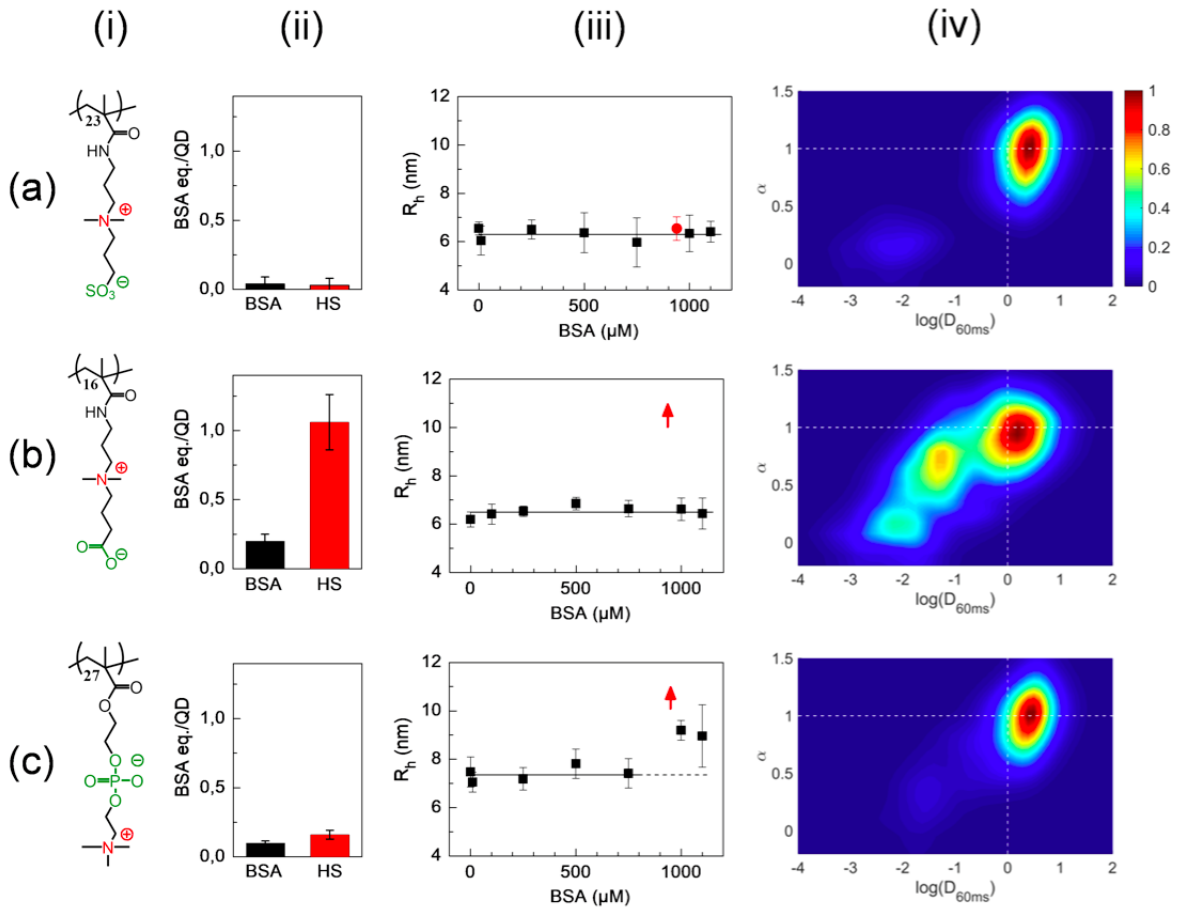



FIGURE II.17 – Influence du polyzwitterion attaché à la surface des QD sur l'adsorption non spécifique de protéines et sur leur diffusion cytoplasmique. De gauche à droite : (i) structure du zwitterion sulfobétaïne (a), carboxybétaïne (b) et phosphorylcholine (c). (ii) Nombre moyen d'équivalents BSA adsorbés par QD provenant la couronne dure. (iii) Rayon hydrodynamique des QD obtenus par FCS en fonction de la concentration en BSA (point noir) ou de la concentration en sérum humain (point rouge, placé à 950 µM d'équivalent BSA) Les flèches rouges correspondent à l'agrégation des QD. (iv) Carte bidimensionnelle de la densité (D,$\alpha$) des différentes trajectoires des QD mesurés. Cette carte représente $\alpha$ en fonction de $\log(D_{60ms})$. Le code couleur représente la densité locale des trajectoires normalisées entre 0 (bleu) et 1 (rouge). $\alpha = 1$ pour un mouvement purement brownien et $\alpha < 1$ pour un comportement sous-diffusif. Les lignes blanches en pointillé indiquent les conditions du mouvement brownien.

D'après la **figure II.17**, il ne semble pas y avoir d'interactions entre protéines et QD-SB car aucune couronne protéique ne se forme. En effet, les QD fonctionnalisés avec le zwitterion sulfobétaïne semblent être totalement furtifs dans chacune des trois analyses. Il peut être observé en **II.17(a)** l'absence totale de protéine provenant de la couronne dure, que ce soit après incubation dans la BSA ou dans le HS. Ces mesures donnent des résultats en dessous de la

limite de détection (< 0,05 équivalent BSA par QD). En effet, les dosages à la fluorescamine n'ont pas relevé de différence en fluorescence entre les QD incubés dans des solutions sans protéine et contenant des protéines. L'absence d'adsorption de protéines a également été mise en évidence à l'aide de l'expérience de FCS **II.17(b)**. Aucune variation du rayon hydrodynamique des QD n'a été observée en présence de HS (point en rouge sur la courbe) ou de BSA, même à la concentration la plus élevée (1,1 mM).

Le type de fonction chimique négative ainsi que la disposition des groupes chargés (positivement et négativement) dans les fractions de zwitterion, changent les densités de charge ce qui modifie légèrement les propriétés de solubilité et de furtivité des différents zwitterions. Le carboxybétaïne (CB) et le phosphorylcholine (PC) sont des zwitterions très classiques et semblent peu différents du sulfobétaïne (SB). En effet, de très nombreuses publications utilisent le CB et le PC pour leurs propriétés furtives [224–227].

Le polyzwitterion carboxybétaïne (CB) semble, d'après les résultats d'analyse, montrer des propriétés de furtivité moins efficaces que le SB. D'après l'analyse de la couronne dure, peu de protéines BSA ont été détectée par le dosage à la fluorescamine (légèrement au dessus de la limite de détection : environ 0,2 BSA par QD) et d'après l'analyse de la couronne dynamique par FCS, il n'y a pas d'augmentation du rayon hydrodynamique même aux plus fortes concentrations. En revanche, des différences entre les QD-SB et les QD-CB apparaissent en présence de sérum humain (HS). Lorsque les QD recouverts de CB sont incubés dans du HS, il apparait de grands événements dans le tracé de l'intensité de fluorescence des QD en fonction du temps lors de l'expérience de FCS, observés sur la **figure II.18(1)**. Ceci est caractéristique de la formation d'agrégats [228]. Ces agrégats proviennent de l'adsorption de certaines protéines à la surface des QD-CB. Ces agrégats peuvent être éliminés par centrifugation (20 000 g, 5 min), cependant ils réapparaissent après l'ajout supplémentaire de HS **II.18(2)**. Il est intéressant aussi de noter qu'ils ne réapparaissent pas après ajout de QD-CB supplémentaires. Ceci laisse donc conclure qu'une fraction de protéines, présente en faible quantité dans le sérum humain et différente de l'albumine, induit de l'agrégation d'une partie des QD. Ces agrégats ne se dissocient pas durant les étapes de lavage par ultracentrifugation car on note une quantité relativement importante de protéines adsorbées (couronne dure) par dosage à la fluorescamine (environ 1 éq BSA par QD-CB) **II.17(i)**.

Le ligand phosphorylcholine a un comportement encore différent des autres polyzwitterions **II.17(c)**. Les expériences de FCS montrent une augmentation du rayon hydrodynamique des QD-PC due à l'adsorption de protéines à une concentration supérieure à 1 mM de BSA. Pour rappel, la concentration en albumine dans le sang est autour de 0,75 mM. Cette augmentation du rayon global (2 nm) est compatible avec la formation d'une fine couche de protéines sans aucune agrégation. De plus, le niveau négligeable de protéines résiduelles mesuré après lavage

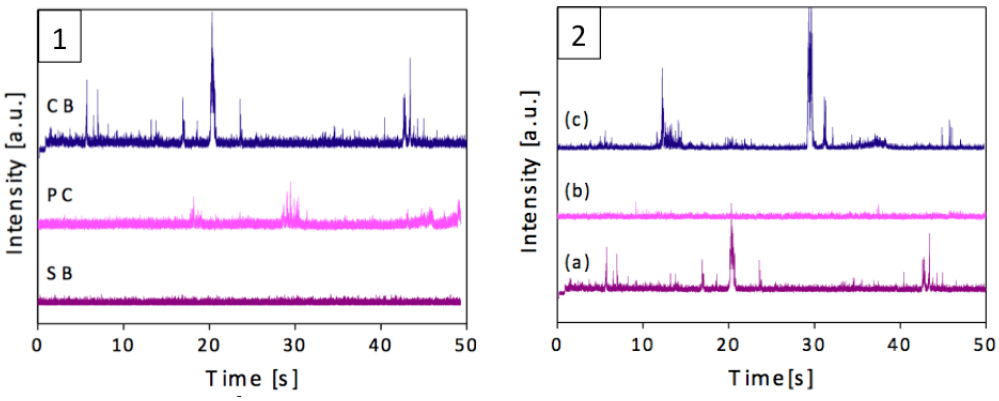



FIGURE II.18 – Image 1 : Tracé de la fluctuation de l'intensité d'émission en fonction du temps des échantillons : QD-SB, QD-PC et QD-CB dispersé dans du sérum humain (HS). Les variations d'intensité abruptes observés avec les QD-CB et aussi dans une moindre mesure avec les QD-PC correspondent au passage d'agrégats dans le volume confocal. Image 2 : Tracé de la fluctuation de l'intensité d'émission en fonction du temps de l'échantillon QD-CB dans du HS (a) après incubation, (b) après centrifugation, (c) après ajout de HS supplémentaire

par la fluorescamine souligne la nature «dynamique» des interactions entre l'albumine et les QD-PC. L'expérience en FCS montre aussi une faible tendance à l'agrégation lorsque les QD-PC sont exposés au HS **II.18(1)**. Cependant, comme pour la BSA, les protéines adsorbées sont facilement éliminées lors des étapes de lavage (pas de couronne dure).

Tous ces résultats *in vitro* sont confirmés par les mesures *in vivo* du suivi de trajectoire de QD unique dans le cytoplasme de cellules **II.17(c)**. Les résultats de cette expérience semblent tout à fait cohérents avec les analyses en couronnes dures et dynamiques réalisées sur les différents QD-Zwitterions. Les QD-SB et -PC ont un mouvement quasi-brownien : $<\alpha> = 0{,}89$ et 0,92 respectivement, ce qui concorde tout à fait avec leur excellent comportement furtif observé *in vitro* . Leurs coefficients de diffusion sont élevés : $<D> = 2{,}68$ et 2,57 $\mu m^2.s^{-1}$, pour QD-SB et -PC respectivement, présentés dans la Table II.2. Ces coefficients sont plus élevés d'un ordre de grandeur que des QD commerciaux ou des QD-PEG ou encore des nanoparticules de latex commerciales [223] ! Il y a donc très peu (voire pas du tout) d'interaction non spécifique avec les différents composants du cytoplasme. En revanche, les QD-CB semblent avoir un comportement différent une fois encore. Ils présentent un coefficient de diffusion plus faible : $<D> = 0{,}98$ $\mu m^2.s^{-1}$ et aussi des coefficient $\alpha$ anormaux : $<\alpha> = 0{,}73$. De plus, une fraction non négligeable de la population des QD-CB (31%) a un coefficient $<\alpha> = 0{,}6$, ce qui indique de très fortes interactions avec des composants cytoplasmiques qui ralentissent les particules.

D'après nos résultats expérimentaux sur l'étude des interactions dures et dynamiques entre protéines et nanoparticules, il est possible de classer les polyzwitterions en fonction de leur force d'interaction avec les protéines. La PC présente un comportement intermédiaire entre le SB, qui supprime totalement les liaisons non spécifiques, et le CB, qui forme de gros agrégats avec

certaines protéines sanguines différentes de l'albumine.

Tous ces polyzwitterions appartiennent à la famille des bétaïnes et ne se différencient que par la nature chimique de leurs sites chargés négativement. D'après les études de Collins *et al.* qui se basent sur la série de Hofmeister [229,230], les association entre ions de charges différentes devraient être favorisées si ceux-ci possèdent la même densité de charge (interactions entre ions dur/dur ou mou/mou favorisées). Les interactions entre un ion dur et un ion mou devraient donc être défavorisées. Ce concept relativement simpliste peut expliquer certaines propriétés des zwitterions comme leur solubilité dans des solutions aqueuses salées [231]. Cependant, cette théorie ne fonctionne pas dans le cas des interactions protéines - zwitterions car il ne s'agit pas, dans ce dernier, de charges positives et négatives indépendantes. De plus, avec cette théorie, les amines primaires qui sont des ions relativement mous devraient avoir plus d'interactions avec le sulfobétaïne (car le sulfonate est mou) qu'avec le carboxybétaïne (car le carboxylate est plus dur), ce qui est contradictoire avec les résultats des expériences. En effet, la densité de charge des fonctions négatives des trois zwitterions peuvent se classer ainsi : carboxylate > phosphonate > sulfonate. Par conséquent, les interactions zwitterions - protéines ne peuvent pas être expliquées avec un modèle se basant uniquement sur les interactions électrostatiques. D'autres équipes de recherche étudient l'hydratation de ces zwitterions. Ainsi, les équipe de Nagumo *et al.* et de Jiang *et al.* modélisent par dynamique moléculaire le nombre de molécules d'eau de la première sphère de solvatation autour des zwitterions [182, 232]. Ils ne montrent aucune différence autour des ammoniums quaternaires, en revanche, ils prédisent que le nombre de molécules d'eau autour des groupes négatifs des zwitterions est différent. Il y a plus de molécules d'eau autour des sulfobétaïnes (environ 7-7,2) qu'autour des phosphorylcholines (environ 5,4) ou des carboxybétaïnes (5-6). Cette très forte hydratation des sulfobétaïnes explique peut-être ses propriétés de furtivité supérieures à celles des phosphorylcholines et carboxybétaïnes.

TABLE II.2 – Coefficient de diffusion moyen (<D>), écart quadratique moyen du coefficient de diffusion (SEM <D>), coefficient $\alpha$ moyen, et écart quadratique moyen de $\alpha$ (SEM <$\alpha$>) pour chaque type de QD. N correspond au nombre de trajectoires analysées.

| Echantillon | <D> $\mu m^2.s^{-1}$ | SEM <D> | <$\alpha$> | SEM <$\alpha$> | N |
|---|---|---|---|---|---|
| QD-SB | 2,68 | 0,11 | 0,89 | 0,03 | 168 |
| QD-PB | 2,57 | 0,07 | 0,92 | 0,01 | 574 |
| QD-CB | 0,98 | 0,10 | 0,73 | 0,03 | 194 |

### Influence de la taille des polymères

L'influence de la taille des polymères a été étudiée. Un deuxième polymère diblocs VIM-b-SB avec une taille en SB différente a été synthétisé : $Mn_2 = 3400$ g.mol$^{-1}$ ; $Ip_2 = 1{,}12$. Tous les résultats montrés précédemment concernaient le polymère 1 : $Mn_1 = 6900$ g.mol$^{-1}$ ; $Ip_1 = 1{,}07$. Comme il l'a été montré dans la table II.1, il n'y a pas de différence significative entre les

densités surfaciques de recouvrement de polymères en fonction de la taille du polymère. Si le polymère est plus petit alors le nombre de polymères accrochés par QD sera plus élevé mais globalement le nombre de zwitterions par QD est toujours le même, indépendamment du type de zwitterion et de la taille du polymère. De plus, un troisième polymère dibloc VIM-b-SB ayant la même taille que le premier (environ 7 000 g.mol$^{-1}$) mais avec une fonction chimique de polymérisation méthacrylate à la place d'une fonction méthacrylamide a été synthétisé. Une analyse par FCS de la couronne dynamique a été effectuée pour ces deux nouveaux polymères à la fois pour différentes concentration en BSA mais aussi après incubation dans du sérum. Les résultats sont présentés en figure **II.19**. Les résultats du polymère n°1 ont été présentés dans la partie précédente. Ces trois polymères SB semblent avoir exactement le même comportement.

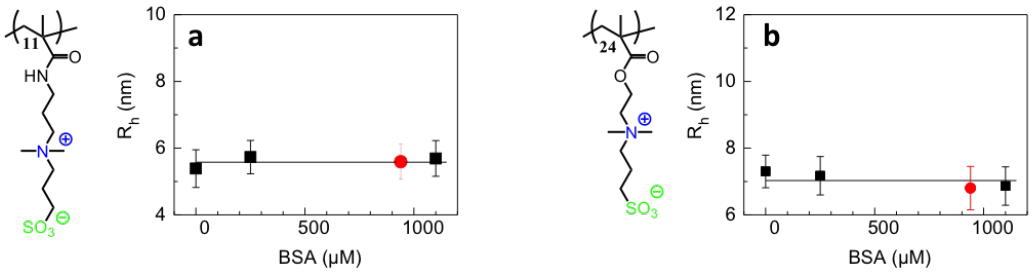



FIGURE II.19 – Rayon hydrodynamque de QD-SB en présence de BSA (point noir) ou de HS (point rouge) obtenu par FCS. (a) Polymère SB méthacrylamide $Mn_2$ = 3400 g.mol$^{-1}$. (b) Polymère SB méthacrylate $Mn_2$ = 7000 g.mol$^{-1}$

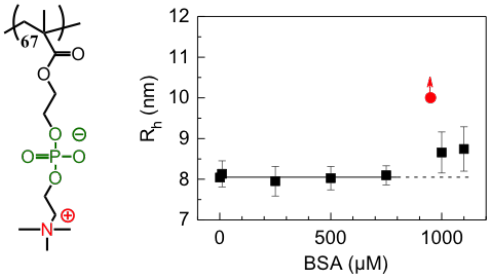



FIGURE II.20 – Rayon hydrodynamque de QD-PC en présence de BSA (point noir) ou de HS (point rouge) obtenu par FCS avec un polymère PC de $Mn_2$ = 18600 g.mol$^{-1}$

Une seconde étude prouvant que la taille du polymère n'influe pas sur l'adsorption non spécifique de protéine a été effectuée en refaisant une analyse de la couronne dynamique sur un second polymère phosphorylcholine (PC) ayant cette fois-ci une taille beaucoup plus grande ($Mn_2$ = 18 600 g.mol$^{-1}$ et $Ip_2$ = 1,1) par rapport à celui présenté en première partie ($Mn_1$ = 8 200 g.mol$^{-1}$ et $Ip_1$ = 1,07) sur la **figure II.17(c)**. Les rayons hydrodynamiques des particules en fonction de la concentration en BSA (ou HS), sont en **figure II.20**. Une aug-

mentation du $R_h$ est observée à partir d'une concentration en BSA de 1 mM et une partie des QD-PC s'agrège en présence de HS. Ceci est tout à fait similaire aux résultats présentés dans la partie précédente.
Ces deux analyses prouvent bien que, dans la gamme de 3 000 à 20 000 g.mol$^{-1}$, la taille du polymère n'influence en rien l'adsorption non spécifique de protéines.

### Etude cinétique : évolution en fonction du temps

Par ailleurs, une étude en fonction du temps a été réalisée par FCS sur les QD-SB (Mn = 6 900 g.mol$^{-1}$). Aucune augmentation des rayons hydrodynamiques n'a été observée après une incubation dans de la BSA ou du HS pendant plusieurs jours à 37°C, comme il peut être observé sur la **figure II.21**. Ceci montre que les QD-SB conservent leur comportement furtif pendant une longue période même dans des milieux biologiques complexes.

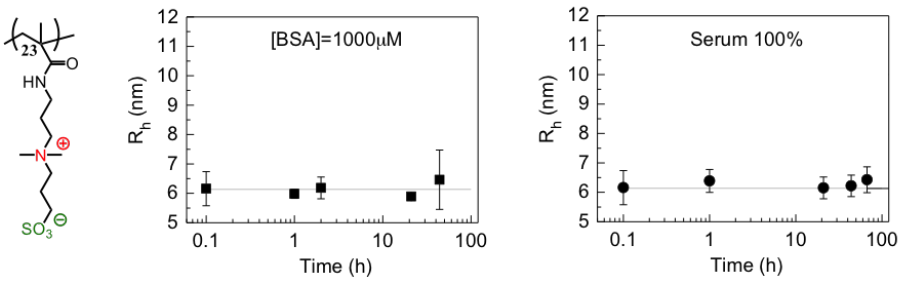



FIGURE II.21 – Rayon hydrodynamique des QD-SB (Mn = 6900 g.mol$^{-1}$) en présence de 1 mM de BSA ou du HS en fonction du temps.

## II.3.2 Influence de l'ajout de fonctions chimiques chargées

L'objectif de ce projet est d'étudier les interactions non spécifiques entre des nanoparticules-zwitterioniques et le milieu biologique dans lequel elles se trouvent. Les nanoparticules pourront ensuite être utilisées pour faire de l'imagerie ou pour délivrer un médicament par exemple. Pour cela, il va être nécessaire d'étudier le ciblage des nanoparticules vers des biomolécules spécifiques. Ce ciblage nécessite de fonctionnaliser les particules en utilisant les ligands accrochés à leur surface : ici des polymères. Les polyzwitterions SB et PC étant chimiquement inertes, il sera nécessaire d'ajouter de nouvelles fonctions chimiques réactives en incorporant de nouveaux monomères réactifs lors de la synthèse. Pour le zwitterion CB, la fonction carboxylate peut être utilisée directement pour la conjugaison d'une biomolécule contenant une amine par couplage peptidique [89]. Malheureusement, dans ce cas, la fonction amide formée va modifier la balance des charges en supprimant la charge négative, ne laissant alors que la charge positive de l'ammonium quaternaire. Comme cela va être détaillé dans la suite, la modification même très légère de cette balance de charge peut avoir de nombreuses conséquences sur la furtivité

des particules. Chaque modification des polyzwitterions est susceptible d'introduire des interactions entre les nouvelles fonctions chimiques et les protéines via des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogène ou encore des interactions hydrophobes.

Dans cette seconde partie, des fonctions chimiques positives ou négatives vont être ajoutées au polymère SB très furtif afin d'étudier l'influence du changement de la balance des charges sur l'adsorption non spécifique de protéines. Pour étudier l'influence de l'ajout de charges positives, le bloc de SB pur a été modifié au cours de la polymérisation en ajoutant une faible proportion (environ 15 %) de monomères méthacrylamides se terminant avec une amine primaire (APMA). Ce polymère sera noté par la suite SB-$NH_3^+$. Le nombre moyen d'APMA par chaîne de polymère a été estimé à 4, soit 1 APMA pour 6 SB en moyenne. La synthèse exacte de ce polymère et ses caractérisations sont présentées en annexe. Des réactions avec un large excès de colorants organiques activés par un ester-NHS indiquent qu'environ 20 fonctions amines par QD-SB-$NH_3^+$ sont accessibles pour les modifications chimiques. Ces amines primaires sont protonées à pH physiologique, ce qui modifie le potentiel zeta des particules de -10,0 ± 3,4 mV pour des QD-SB à -4,9 ± 3,0 mV pour des QD-SB-$NH_3^+$. Ceci peut également être observé par électrophorèse en gel d'agarose en **figure II.22**.

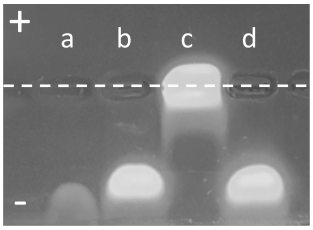



Figure II.22 – Migration par électrophorèse dans un gel d'agarose des QD recouverts de : (a)SB-Biotine, (b)SB-$COO^-$, (c)SB-$NH_3^+$ et (d)SB. La migration s'est effectuée dans un milieu tamponné d'HEPES/Na 100 mM et de NaCl 40 mM. Les pointillés correspondent aux puits initiaux dans lesquels ont été déposés les QD.

L'ajout de quelques charges positives au zwitterion SB initialement neutre induit des différences notables, dans les interactions entre QD et protéines, observables à la fois en couronne dure et dynamique, **figure II.23(a)**. Les résultats de la FCS montrent qu'une couche de protéines s'adsorbe à la surface des QD en présence de sérum Humain (HS) ou d'une faible concentration en albumine : 500 µM qui est inférieure à la concentration sanguine. De plus, après lavages par ultracentrifugation, certaines protéines restent très fortement accrochées à la surface des QD. Le coefficient de diffusion mesuré à l'intérieur du cytoplasme des cellules est beaucoup plus bas en présence de charges positives, il passe de 2,68 $\mu m^2.s^{-1}$ pour les QD-SB à 0,54 $\mu m^2.s^{-1}$ pour les QD-SB-$NH_3^+$. Le coefficient $\alpha = 0{,}61$ (donc fortement sub-diffusif) prouve aussi les nombreuses interactions non spécifiques.

TABLE II.3 – Coefficient de diffusion moyen (<D>), écart quadratique moyen du coefficient de diffusion (SEM <D>), coefficient $\alpha$ moyen, et écart quadratique moyen de $\alpha$ (SEM <$\alpha$>) pour chaque type de QD. N correspond au nombre de trajectoires analysées.

| Echantillon | <D> $\mu m^2.s^{-1}$ | SEM <D> | <$\alpha$> | SEM <$\alpha$> | N |
|---|---|---|---|---|---|
| QD-SB | 2,68 | 0,11 | 0,89 | 0,03 | 168 |
| QD-SB-$COO^{-1}$ | 3,55 | 0,15 | 0,97 | 0,02 | 153 |
| QD-SB-$NH_3^+$ | 0,54 | 0,07 | 0,61 | 0,01 | 149 |
| QD-SB-Biotine | 1,79 | 0,14 | 0,85 | 0,03 | 143 |

Par la suite, toutes les charges positives des QD-SB-$NH_3^+$ ont été converties en charges négatives. Pour cela, les particules ont été placées en présence d'un excès d'ester bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide) qui est un double ester activé par du NHS. Cette étape est suivie d'une étape de lavage puis d'une étape d'hydrolyse. Seule une des deux fonctions ester va réagir avec l'amine primaire du polymère et le second ester sera hydrolysé en acide carboxylique qui sera déprotonné à pH physiologique. Les conditions opératoires sont données en annexe. Ces nouveaux QD sont notés QD-SB-$COO^-$. Ce remplacement des fonctions cationiques par des fonctions anioniques réduit drastiquement les interactions non spécifiques avec les protéines, bien qu'il ne les supprime pas totalement, **figure II.23(b)**. La concentration minimale en BSA nécessaire pour induire de l'adsorption détectable est deux fois plus élevée qu'avec les charges positives (1000 µM au lieu de 500 µM) et quasiment pas d'augmentation du rayon hydrodynamique n'a été observée après incubation dans le HS. Les analyses dans les cellules ne semblent pas montrer la présence d'interaction non spécifique.

Cette analyse démontre l'importance de la neutralité au sein des polymères zwitterioniques. Même une très faible variation de la balance des charges aura un impact très important sur les interactions des nanoparticules avec leur milieu extérieur. L'effet est beaucoup plus prononcé dans le cas d'ajout de charges positives que de charges négatives, sans doute car les protéines sont principalement chargées négativement.

Il est aussi possible de fonctionnaliser les QD-SB-$NH_3^+$ avec de la biotine qui est une biomolécule d'intérêt car elle a une très forte affinité avec la streptavidine (une protéine). La réaction entre les QD-SB-$NH_3^+$ et l'ester activé sulfo-NHS-Biotine est présentée en annexe. D'après les résultats de la **figure II.23(c)**, après fonctionnalisation avec la biotine, les QD-Biotine retrouvent des propriétés de furtivité quasiment aussi bonnes que les QD-SB. Ceci suggère que les interactions non-spécifiques proviennent en grande partie d'interactions liées à la présence de charges. L'importance d'avoir une chimie de surface globalement neutre est une fois encore démontrée.

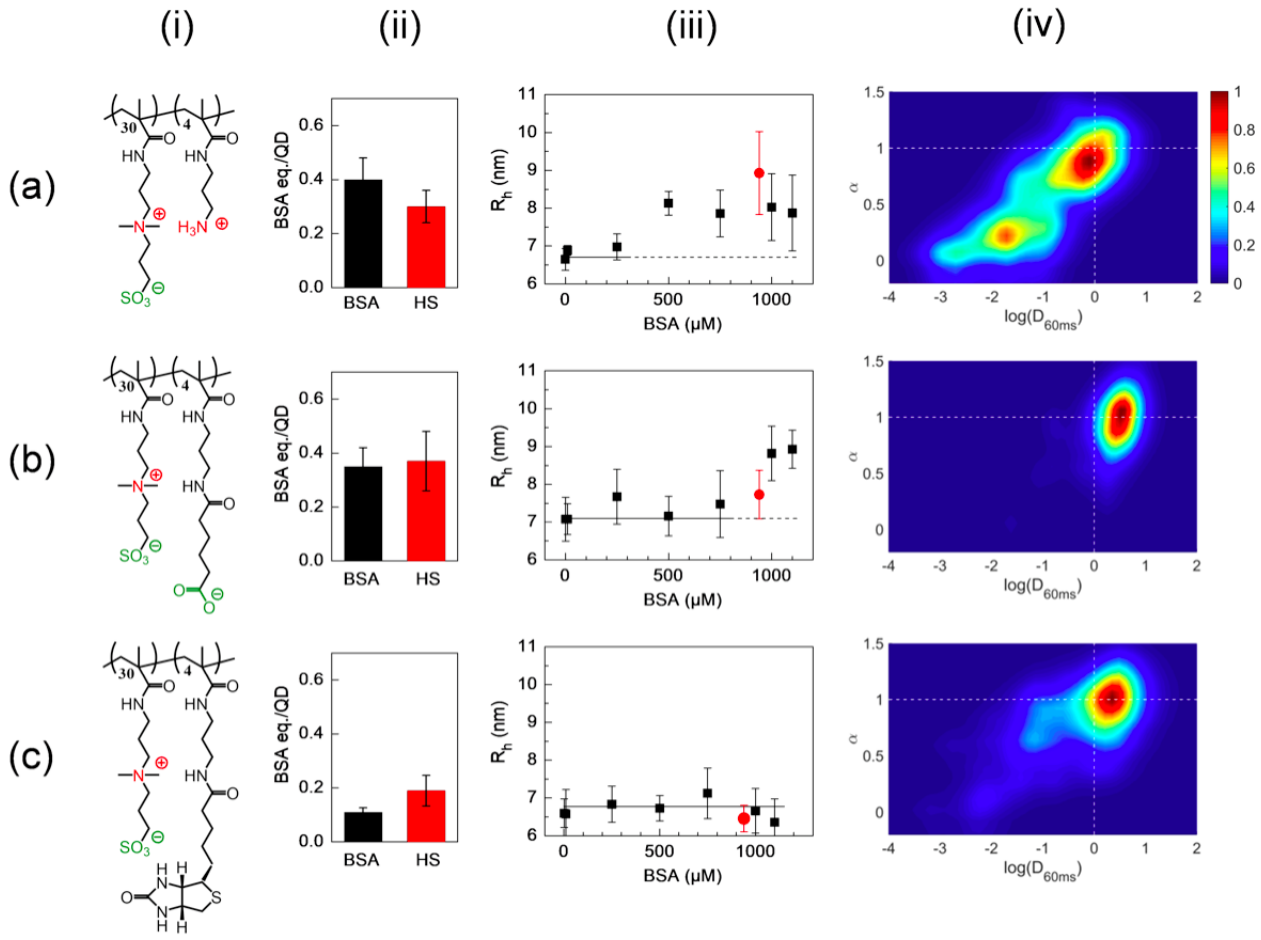



FIGURE II.23 – Influence d'ajout de charge positives et négatives sur les QD-SB. De gauche à droite : (i) structure du zwitterion sulfobétaïne + nouvelle fonction chimique (a) SB-$NH_3^+$ (b) SB-$COO^{-1}$ (c) SB-Biotine. (ii) Nombre moyen d'équivalents BSA adsorbés par QD dans la couronne dure. (iii) Rayon hydrodynamique des QD obtenu par FCS en fonction de la concentration en BSA (point noir) ou de la concentration en sérum humain (point rouge, placé à 950 µM d'équivalent BSA). Les flèches rouges correspondent à l'agrégation des QD. (iv) Carte bidimensionnelle de la densité (D,$\alpha$) des différentes trajectoires des QD mesurées.

### II.3.3 Influence de la fonction d'ancrage des polymères à la surface des QD

Au cours de ce projet, nous avons également souhaité comparer les adsorptions non spécifiques entre deux polymères SB possédant des fonctions d'ancrage différentes : un vinylimidazole et une fonction dithiol (avec le DHLA). Le premier polymère est celui déja présenté précédemment : le polymère dibloc SB-VIM (6 900 g/mol) et le second est un polymère statistique de SB/LA ($\approx$ 10 000 g/mol).

Les résultats présentés en **figure II.24**, permettent de comparer leurs couronnes dures et dynamiques. Aucune différence notable n'est observée en présence uniquement de BSA. En revanche, en présence de sérum humain, on peut noter l'apparition à la fois d'une couronne

dure et dynamique sur les QD-SB/LA. Cette différence avec les QD-SB-VIM provient très certainement de la présence de fonctions dithiols (probablement oxydées en ponts disulfure) qui ne sont pas accrochées à la surface des QD et pourraient interagir avec certaines protéines (différentes de la BSA). Ceci est probable car il s'agit d'un polymère statistique et non en bloc. Nous avons essayé également d'étudier le comportement d'un polymère bloc SB-LA à la surface de QD. Malheureusement, nous avions toujours la présence de quelques impuretés lors de la synthèse du polymère. Or nous allons voir par la suite que la présence d'impuretés, même en très faible quantité, va modifier totalement les propriétés de furtivité de nos polymères.

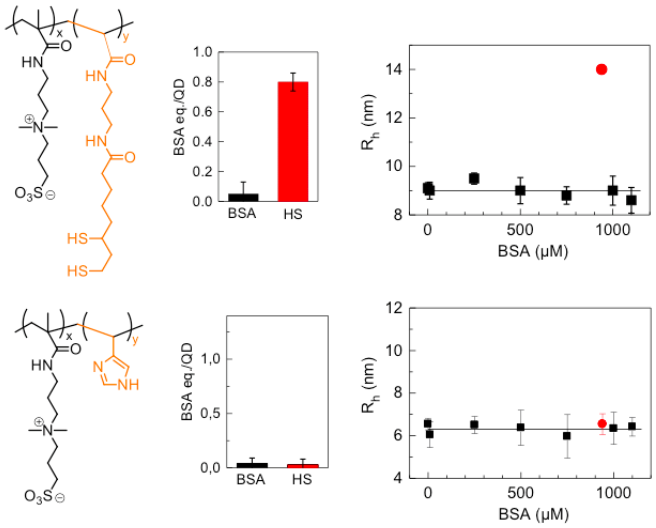



FIGURE II.24 – Comparaison entre deux polymères SB ayant une fonction d'ancrage différente vinylimidazole (figure du haut) et DHLA (figure du bas). A gauche : schéma représentant chaque polymère. Au centre : nombre moyen d'équivalents BSA adsorbés par QD dans la couronne dure. A droite : rayon hydrodynamique des QD obtenu par FCS en fonction de la concentration en BSA (point noir) ou de la concentration en sérum humain (point rouge, placé à 950 µM d'équivalent BSA).

### II.3.4 Importance de la pureté des polymères

Les monomères zwitterioniques à base de carboxybétaïne sont, dans la littérature, très souvent synthétisés par réaction entre une amine tertiaire et la propiolactone. L'amine permet une alkylation et une ouverture du cycle à 3 carbones formant le 3-ammoniopropionate [203,233], la synthèse est présente sur la **figure II.25**.

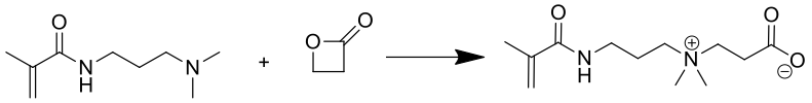


FIGURE II.25 – Synthèse classique du monomère carboxybétaïne [203, 233].

Cette synthèse fonctionne très bien, le rendement de cette réation est bon (90 %) et le

monomère après synthèse n'est pas dégradé. Nous avons observé, cependant, une très légère dégradation de ce monomère pendant la polymérisation : apparition de quelques pics dans le spectre RMN $^{1}$H, en **figure II.26**, du polymère après synthèse.

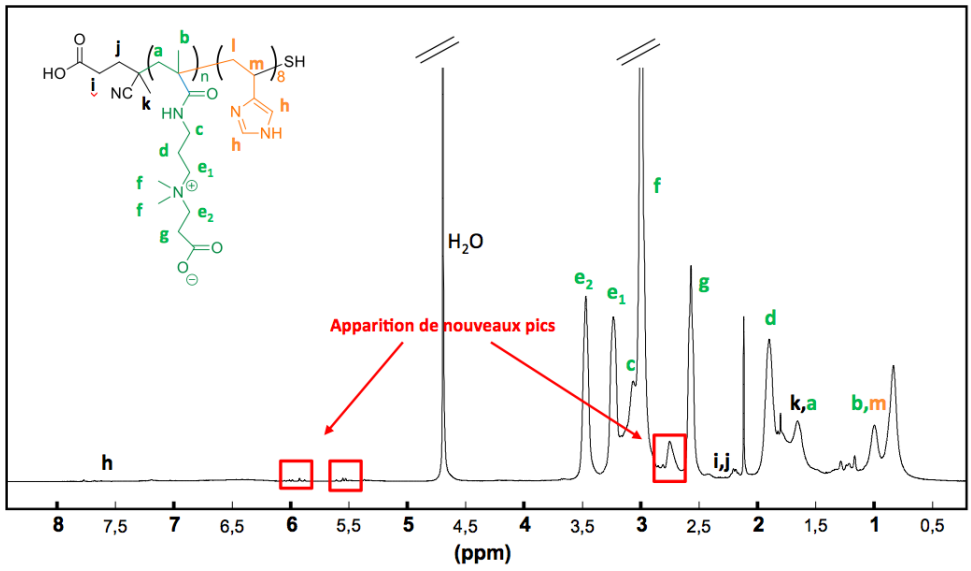



FIGURE II.26 – Spectre RMN $^{1}$H du polymère dibloc imidazole-carboxybétaïne avec la présence d'une impureté.

Ceci semble être une impureté présente en très faible quantité : environ 5-10%. Après une analyse effectuée sur le monomère carboxybétaïne (CBM) seul, cette impureté semble apparaître après un chauffage prolongé à 70°C. Afin de mieux comprendre quelle est la nature de cette impureté et si celle-ci change ou non la nature zwitterionique neutre de notre polymère, une étude précise de cette dégradation a été effectuée. Pour mieux caractériser les sous produits formés, la dégradation a été poussée au maximum en plaçant le monomère carboxybétaïne (CBM) dans $D_2O$ à 70°C pendant 5 jours. Une analyse fine par RMN a ensuite été réalisée, comparant le CBM avant et après dégradation. Les spectres RMN suivants ont été réalisés pour chacun de ces deux échantillons : RMN 1D $^{1}$H, RMN 1D $^{13}$C, RMN 1D $^{13}$C DEPT 135, RMN 2D COSY ($^{1}$H-$^{1}$H) et enfin RMN 2D HSQC. Après avoir analysé tous ces spectres RMN, il est clair que la dégradation qui se produit est une élimination d'Hoffman avec un mécanisme de type $E_2$ dont la réaction chimique est écrite en **figure II.27**.

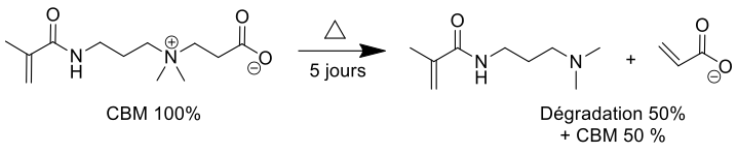



FIGURE II.27 – Ellimination d'Hoffman qui induit une dégradation du carboxybétaïne monomère (CBM).

Sur le spectre RMN $^{1}$H du CBM dégradé, **figure II.28(a)**, il est possible d'attribuer tous

les protons du CBM ainsi que ceux des deux sous produits. Il en est de même avec les $^{13}C$ pour le spectre DEPT 135 **II.28(b)**. Les spectres RMN 2D COSY, représentés en **figure II.29** ont permis d'identifier beaucoup plus facilement les sous produits car ceux-ci nous donnent des renseignements sur les couplages J hononucléaires. Ici, il est possible de savoir quels protons sont couplés entre eux. Les spectres RMN 2D HSQC donnent, eux, des renseignements sur les corrélations hétéronucléaires basées sur les couplage $^{1}J_{C-H}$, cela permet d'identifier les différentes fonctions chimiques d'une molécule.

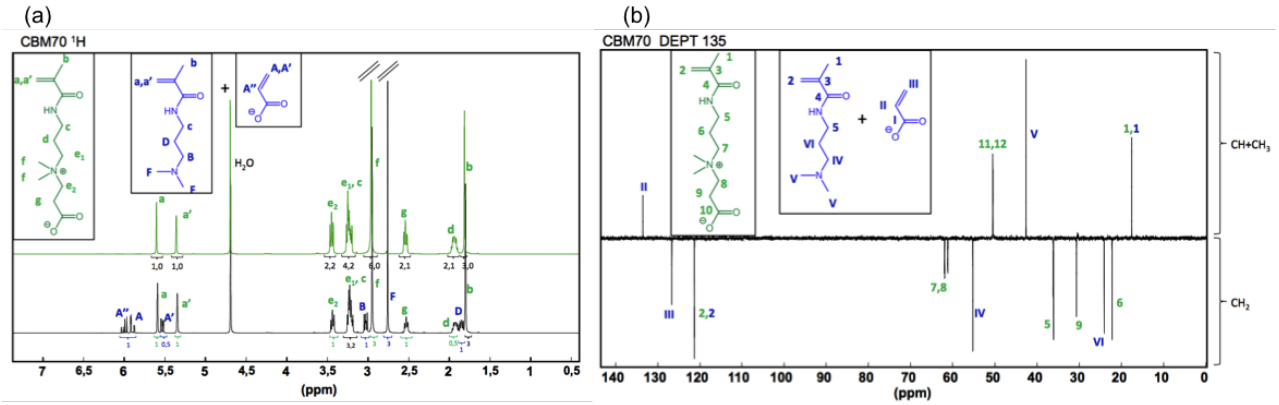



FIGURE II.28 – (a) Spectres RMN $^{1}H$ du monomère CBM seul en vert et du CBM dégradé pendant 5 jours dans $D_2O$ à 70°C en noir. (b) Spectre RMN 13C DEPT 135 du monomère CB dégradé pendant 5 jours dans $D_2O$ à 70°C.

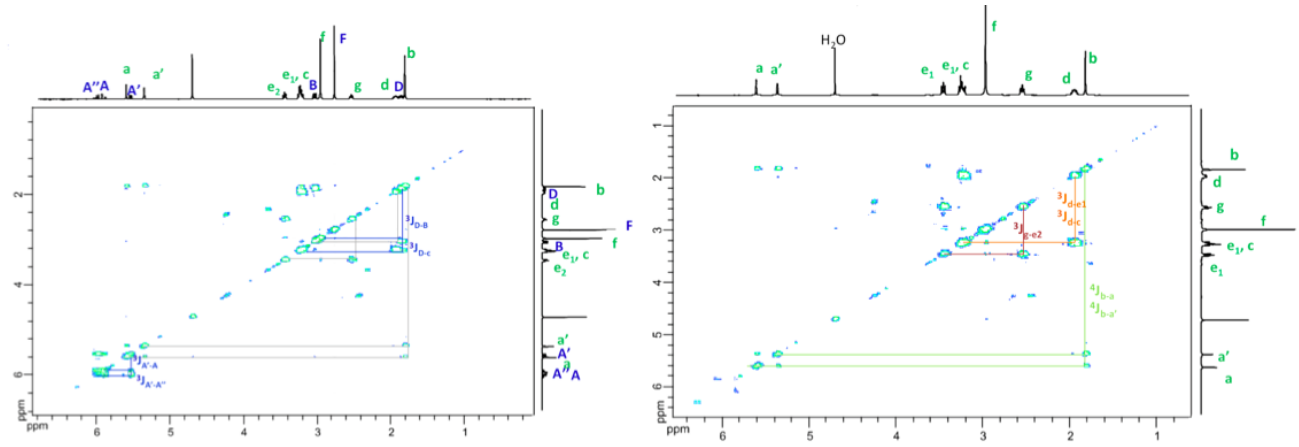



FIGURE II.29 – Spectres RMN 2D COSY ($^{1}H$-$^{1}H$) (a) du monomère CB non dégradé et (b) du monomère CB dégradé pendant 5 jours dans $D_2O$ à 70°C.

Afin de ne pas avoir d'impureté lors de notre synthèse de polymère, nous avons changé de protocole pour le monomère carboxybétaïne. Le zwitterion carboxybétaïne a été synthétisé avec, cette fois-ci, 3 atomes de carbone (au lieu de 2) entre l'amine tertiaire et l'acide carboxylique [234], le détail de la synthèse se trouve en annexe. La réaction d'élimination d'Hoffman ne se

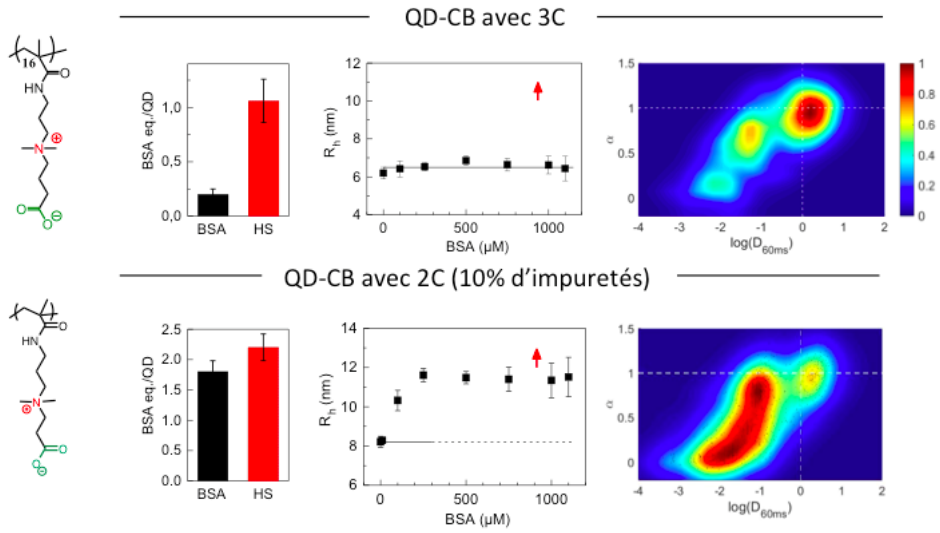



FIGURE II.30 – Comparaison entre la synthèse d'un polymère CB pur et d'un polymère CB contenant 5% d'impuretés sur l'adsorption non spécifique. En haut : polymère pure, en bas : polymère contenant l'impureté.

produit qu'avec les CB de 2 atomes de carbone et pas 3 car dans le premier cas seulement le sous produit formé est un composé carbonylé $\alpha,\beta$-insaturé qui est particulièrement stable ce qui favorise la réaction de dégradation. Les trois techniques d'analyse des interactions non spécifiques entre nanoparticules et protéines ont été réalisées avec des Quantum Dots recouvert du polymère CB-dégradé (avec CB contenant 2 atomes de carbone (2C) entre l'ammonium et le carboxylate). Sur la **figure II.30**, se trouve une comparaison des résultats entre les QD-CB propres, *i.e.* avec 3 atomes de carbone (les mêmes résultats que présentés dans la partie précédente) et les QD-CB-dégradés avec 2 atomes de carbone. Il peut être noté que cette dégradation est catastrophique et diminue drastiquement les propriétés de furtivité de ces QD-CB. En effet, à cause de cette dégradation, il y a dans le polymère de nouvelles fonctions positives provenant de l'amine tertiaire nouvellement formée qui est chargée positivement à pH physiologique. Ceci est tout à fait cohérent avec les conclusions de la partie précédente : l'ajout de charges positives modifie totalement les interactions électrostatiques avec l'environnement dans lequel se trouvent les particules et augmente à la fois la présence de protéines des couronnes dures et dynamiques. Il est donc absolument primordial d'être totalement sûr de la pureté des polymères qui seront utilisés pour recouvrir les nanoparticules afin d'obtenir des particules furtives.

### II.3.5 Imagerie *in vivo* dans les cellules et marquage biologique

Afin de faire de l'imagerie à l'intérieur de cellules, il est absolument nécessaire qu'il n'y ait pas d'adsorption non spécifique car cela induirait du marquage non spécifique et donc diminuerait l'efficacité du ciblage [80]. A ce jour, il est très difficile d'effectuer un ciblage intracellulaire avec des nanoparticules à cause du marquage non spécifique. En effet, un mouvement de diffusion

brownien des particules est absolument nécessaire à l'intérieur des cellules afin que ces dernières puissent explorer tout le cytoplasme et trouver rapidement leur cible.

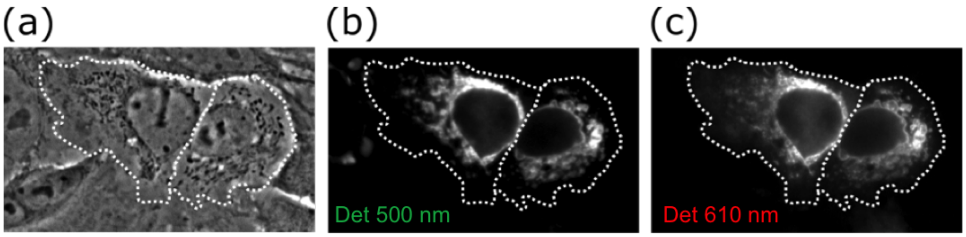



FIGURE II.31 – Ciblage intracellulaire d'une protéine du réticulum endoplasmique transfectée par de la streptavidine et de la mRaspberry par les QD-Biotine. (a) Image en transmission ; (b) fluorescence de la mRaspberry avec un détecteur à 500 nm ; (c) fluorescence des QD-Biotine avec un détecteur à 610 nm. Les QD-Biotine se fixent à la streptavidine. Présence des QD-Biotine uniquement dans le réticulum endoplasmique.

Nos collaborateurs à l'Institut Curie possèdent des cellules HeLa transfectées qui expriment une protéine du réticulum endoplasmique [235], une organelle intracellulaire, fusionnée à de la streptavidine et une protéine fluorescente ($\lambda_{em}$ = 500 nm) : mRaspberry. Afin d'étudier l'efficacité de ciblage de nos nouvelles particules très furtives (QD-SB) fonctionnalisées avec des biotines (noté QD-Biotine) ont été microinjectés dans le cytoplasme de ces cellules transfectées. La présence de mRaspberry permet d'identifier facilement les cellules transfectées de celles qui ne le sont pas. Le ciblage est très efficace : seulement quelques secondes après la micro-injection des particules, les QD-Biotine vont directement se fixer à leur cible : la streptavidine qui est présente dans le réticulum endoplasmique comme observé sur la **figure II.31**. Un test control a été effectué : des QD-Biotine ont été micro-injectés dans une cellule non transfectée. Les images obtenues en microscopie sont présentés en **figure II.32**. Il peut être observé que cette fois-ci il n'y a pas de signal de fluorescence de la mRaspberry et que les QD-Biotine ne se ciblent pas sur le réticulum endoplasmique mais diffusent librement dans toute la cellule.

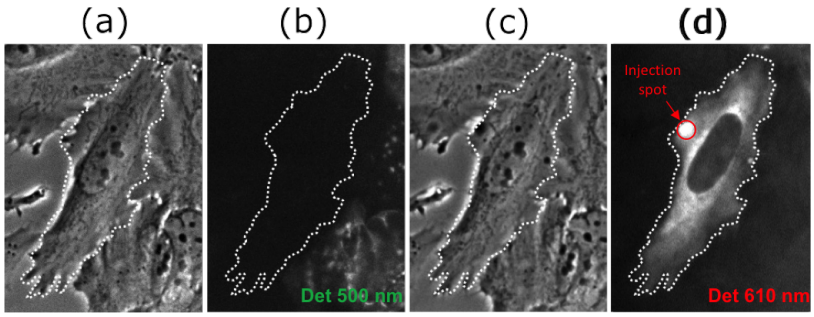



FIGURE II.32 – Test contrôle. Cellule HeLa non transfectée : (a) image en transmission ; (b) fluorescence de la mRaspberry (non présente ici) avec un détecteur à 500 nm ; (c) image en transmission après micro-injection des QD-Biotine ; (d) fluorescence des QD-Biotine avec un détecteur à 610 nm. Les QD-Biotine diffusent librement dans la cellule.

## Conclusion du chapitre II

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'importance des ligands à la surface de nanoparticules pour l'étude des interactions protéines-nanoparticules. Nous avons utilisé des Quantum Dots comme nanoparticules modèles et des polymères zwitterioniques comme ligands de surface. Nous avons démontré que les polymères zwitterioniques permettent une élimination partielle ou quasi-totale des couronnes dures et dynamiques de protéines. Il a été observé des comportements différents entre plusieurs zwitterions que ce soit dans le sérum ou en présence d'albumine en concentration millimolaire : les QD-sulfobétaïne semblent totalement furtifs avec aucune adsorption détectable ; les QD-phosphorylcholine présentent une fine couche de protéines lorsqu'ils se trouvent dans une solution de protéines très concentrée ; et enfin les QD-carboxybétaïne semblent partiellement s'agréger en présence de sérum humain. Par ailleurs, une modification de la balance des charges au sein des zwitterions, initialement neutres, par incorporation de fonctions chimiques chargées semble dégrader leurs propriétés de furtivité. En revanche, une fonctionnalisation avec de petites fonctions neutres telles que la biotine les préserve. Il a été très intéressant également d'observer que les coefficients de diffusion des particules dans les cellules étaient cohérents avec leur comportement *in vitro* . En particulier, les nanoparticules enrobées de sulfobétaïne démontrent un mouvement dans le cytoplasme totalement brownien. En outre, les QD-SB-Biotine sont capables de se lier efficacement à leur cible même dans un milieu intracellulaire, ce qui aurait été impossible avec des nanoparticules peu furtives.

A l'avenir, il pourrait-être extrêmement intéressant de faire une analyse protéomique de la composition des couronnes protéiques à la surface des nanoparticules QD-PC et QD-CB afin de déterminer exactement quelles protéines se lient aux NP afin de mieux comprendre leur formation.

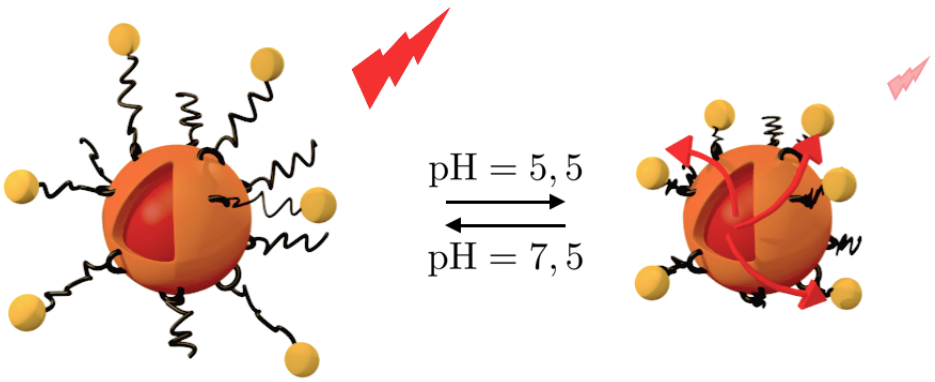
Les nouvelles propriétés furtives des QD-SB ouvrent de toutes nouvelles perspectives pour la conception de nanosondes destinées à l'imagerie *in vivo* ou pour l'administration de médicaments. Par ailleurs, comme les interactions entre protéines et nanoparticules sont responsables de leur capture par le système réticulo-endothélial, cela diminue leur temps de circulation *in vivo*. Les excellentes propriétés furtives des ligands à base de sulfobétaïne apparaissent donc comme une stratégie prometteuse pour réduire la reconnaissance immunitaire des nanoparticules. Dans les mois qui vont suivre cette thèse, des expériences sur le petit animal vont être mises en place, grâce à notre collaboration avec Johanne Seguin, biologiste à l'institut de pharmacie afin d'étudier le temps de circulation des QD-SB dans le sang de souris.

Chapitre III

# Sondes fluorescentes réversibles pour l'imagerie du pH

**Résumé du chapitre**

Ce chapitre propose une toute nouvelle stratégie de synthèse de sondes fluorescentes pour faire de l'imagerie optique des milieux cancéreux en se basant sur la différence de pH entre le milieu extra-cellulaire des tumeurs et les tissus sains. Ces nano-sondes dépendantes du pH se composent de Quantum Dots (QD ) fluorescents soit dans le visible soit dans la seconde fenêtre de l'infrarouge court. Ces QD sont recouverts d'une chimie de surface dépendante du pH qui va pouvoir moduler leur fluorescence. Ainsi, il a été possible de réaliser des nano-sondes réversibles et sensibles à de faibles variations de pH autour du pH physiologique. Ces dernières ont aussi été testées *ex vivo* par imagerie optique dans des érythrocytes qui permettront de transporter ces nano-objets dans le sang.



## Sommaire

**III.1 Choix du polymère sensible au pH . . . . . 97**
III.1.1 Études réalisées sur des copolymères sulfadimethoxines (SDM) . . . . 98
III.1.2 Études réalisées sur des copolymères sulfamethazine (SMZ) . . . . . 103
**III.2 Nano-sonde de pH avec des QD visibles . . . . . 107**
III.2.1 Assemblage de la nano-sonde de pH . . . . . 107
III.2.2 Mesures ratiométriques . . . . . 112
**III.3 Nano-sonde de pH dans l'infrarouge court : SWIR . . . . . 117**
III.3.1 Synthèse de la nano-sonde SWIR . . . . . 117
III.3.2 Sensibilité au pH et réversibilité . . . . . 120
III.3.3 Mesures ratiométriques . . . . . 121
**III.4 Comparaison entre la théorie et l'expérience . . . . . 123**

## Introduction et objectifs du projet

Le but de ce projet est de développer des nano-sondes fluorescentes sensibles au pH dans le domaine de l'IR court (SWIR) afin de pouvoir faire de l'imagerie optique *ex vivo* ou *in vivo* en profondeur dans les tissus avec une résolution spatiale de l'ordre du µm.

### Introduction

Le développement de métastases est la cause principale des décès par cancer. Les métastases ne sont détectables que tardivement et les phénomènes physico-chimiques responsables de leur formation sont encore très peu connus. Le pH est, par exemple, un des paramètres importants du micro-environnement tumoral : celui-ci est généralement plus acide dans les tumeurs et cela influe sur le développement métastatique [236]. L'imagerie de ce pH afin de détecter les tumeurs, et aussi, de mieux comprendre leurs mécanismes de développement.

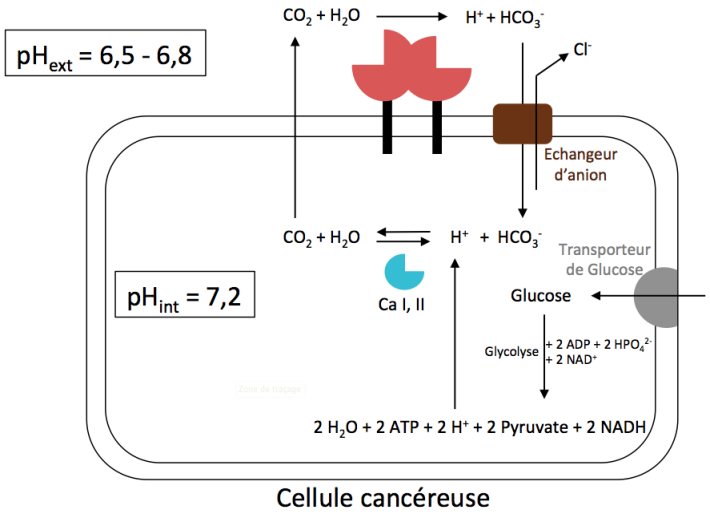



FIGURE III.1 – Schéma simplifiée de la libération de $CO_2$ lors de la glycolyse puis formation de bicarbonate et libération d'un proton, catalysé par une métallo-enzyme. Figure inspirée de [237].

Les différences de pH entre les tissus sains et les tissus tumoraux, ainsi que l'environnement acide dans les compartiments endosomal et lysosomal, peuvent être exploitées comme stimulus interne soit pour la libération déclenchée d'un médicament [238], soit pour imager les tumeurs. Le pH dans les compartiments extracellulaires sains est de 7,4, tandis que le pH intracellulaire est d'environ 7,2. Le pH dans les tissus tumoraux est légèrement inférieur, entre 6,5 et 6,8, en raison du taux élevé de glycolyse dans les cellules cancéreuses [239, 240]. La glycolyse forme du pyruvate et des protons qui réagissent ensuite à l'intérieur de la cellule comme montré sur la **figure III.1**. Le dioxyde de carbone formé diffuse à l'extérieur de la cellule cancéreuse et réagit avec une métallo-enzyme à base de Zinc ce qui entraine la conversion réversible de $CO_2$ en bicarbonate et libère un proton. Cette acidité devrait se réguler mais à cause d'une altéra-

tion du sytème vasculaire et d'une pression interstitielle élevée, l'excrétion est retardée et les produits métaboliques s'accumulent [241]. Dans les compartiments endosomal et lysosomal, le pH est encore plus bas, de l'ordre de 5 à 6, ce qui peut aussi être utilisé pour la libération de médicament directement dans les cellules, ou pour l'imagerie de ces milieux.

Par ailleurs, depuis une dizaine d'années, l'étude de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie *in vivo* a suscité un très fort engouement. En effet, le développement de sondes émettant dans le domaine du proche infrarouge (NIR pour Near InfraRed : 700-1000 nm) ou de l'infrarouge court (SWIR pour Short Wave InfraRed : 1000-1500 nm) avec des rendements quantiques de plus en plus élevés ouvrent de toutes nouvelles perspectives pour le domaine de l'imagerie optique [242].

Les Quantums Dots sont de plus en plus étudiés dans le domaine de la recherche scientifique permettant de découvrir de nouvelles synthèses afin, par exemple, d'augmenter la stabilité des particules, d'améliorer le rendement quantique, ou encore de diminuer la toxicité... Toutes ces nouvelles études permettent d'envisager l'utilisation de ces nanoparticules pour des applications dans le domaine de l'imagerie *in vivo* [243]. En effet, ces nanocristaux semi-conducteurs fluorescents possèdent des propriétés optiques particulièrement intéressantes par rapport aux sondes organiques comme mentionné dans le chapitre d'introduction de ce manuscrit de thèse. Brièvement, les QD présentent :

- des sections efficaces d'extinctions très élevées [244], leur permettant d'être excités sur une très grande gamme d'énergie et de faire, par exemple, de l'imagerie multi-couleur ;
- des rendements quantiques d'émission dans le domaine du SWIR beaucoup plus élevés que les molécules organiques (d'au moins un ordre de grandeur) [245, 246] ;
- une photostabilité prolongée [247] ;
- des temps de vie beaucoup longs que ceux des molécules organiques [137, 248].

Le point le plus important, ici, est le rendement quantique de fluorescence dans la fenêtre de transparence biologique des tissus : autour de 1000-1400 nm, *i.e.* l'infrarouge court ou le SWIR. Dans cette gamme d'énergie, les molécules organiques ont un rendement quantique ne dépassant quasiment jamais 1% alors qu'avec certains QD il est possible d'atteindre plusieurs dizaines de pourcentage (entre 10 et 30%) [5, 249]. L'imagerie optique SWIR permet une imagerie bien plus en profondeur dans les tissus avec une meilleure résolution spatiale [250]. De plus, cette gamme d'énergie permet de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus [251, 252] donc d'augmenter encore le rapport signal/bruit.

Beaucoup d'équipes de recherche ont publié des articles sur l'utilisation de QD pour l'imagerie *in vivo* afin d'augmenter le contraste d'une cellule cible ou de certains tissus ou organes dans des souris, avec, par exemple des QD couplés à des peptides ou bien à des anticorps via les ligands à leur surface [253–255]. En revanche, peu d'études ont été réalisées afin d'utiliser cette

chimie de surface pour rendre la fluorescence des QD sensible à leur environnement extérieur tel que le pH. En particulier, le pH du micro-environnement tumoral. Cette acidité joue un rôle dans certains processus biologiques comme l'angiogenèse et le grossissement des tumeurs et peut aussi modifier le lieu de délivrance d'un médicament par exemple. L'objectif de ce projet de recherche est de développer des QD sensibles au pH ce qui permettrait de réaliser une cartographie de l'acidité dans le micro-environnement tumoral.

Dans la littérature, plusieurs sondes à base de QD sensibles au pH ont déjà été proposées, principalement pour imager le pH intracellulaire ou bien le pH des endosomes. Par exemple, les équipes de Bawendi *et al.* et de Bao *et al.* réalisent des nano-objets à base de QD liés à des sondes organiques. Les QD émettent dans le visible après une excitation mono ou bi-photonique puis il y a un transfert d'énergie avec les fluorophores organiques, qui eux sont sensibles au pH [256,257]. Il y a également l'équipe de Brovelli *et al.* qui propose des modifications ratiométriques de la fluorescence de QD coeur@coques : CdSe@CdS, avec une coque particulièrement épaisse. Il y a alors deux émissions : une provenant du coeur de CdSe qui émet un signal de fluorescence comme référence et une autre provenant de la très grosse coque de CdS qui fluctue en fonction du pH à cause des changements de passivation de surface des particules [258]. Cependant, chacune de ces deux stratégies présente des limites. Les fluorophores organiques sensibles au pH souffrent d'une mauvaise photostabilité. Pour la seconde stratégie, les QD moins bien passivés à certains pH souffrent d'une moins bonne stabilité. De plus, ces sondes émettent dans le visible et aucune de ces deux stratégies ne peut être facilement reproduite dans une gamme de longueur d'onde plus élevée (NIR ou SWIR), ce qui représente une limite importante pour l'imagerie optique. Enfin, les plages de pH utilisées pendant ces deux études sont trop basses par rapport à notre projet. En effet, beaucoup de publications dans la littérature proposent des sondes de pH entre un pH $\approx 3$ et pH $\approx 5$ mais très peu entre pH $\approx 6$ et pH $\approx 7$.

### Objectifs du projet : Description de la nano-sonde

Dans ce projet de recherche, nous proposons une nouvelle stratégie pour réaliser des capteurs de pH compatibles avec différents type de QD : du visible jusque dans l'infrarouge court. Chacune de ces nano-sondes sensibles au pH sera composée d'un QD recouvert par un copolymère dont la conformation peut varier (de façon réversible) autour d'un pH spécifique ainsi que de nanoparticules d'or périphériques accrochées sur le polymère. Le QD est, sous excitation, le donneur de photons et les particules d'or sont des accepteurs, elles peuvent inhiber la fluorescence des QD. Les particules d'or sont des accepteurs très efficaces car elles peuvent être très petites (1-2 nm), elles sont très stables et elles possèdent de grands coefficients d'extinctions molaires. Il peut donc y avoir un transfert d'énergie entre les donneurs (D) : les QD, et les accepteurs (A) d'énergie : les particules d'or, noté AuNP. Ce transfert d'énergie dépend de la distance entre D et A, par conséquent, le changement de conformation du polymère modifie ce transfert d'énergie et module le signal optique de fluorescence.

Les copolymères utilisés sont constitués d'une fonction chimique permettant l'accroche à la surface des nanoparticules (ici : un lipoamide) et d'une fonction sensible au pH (ici : un sulfaméthazine, un composé de la famille des sulfonamides). Dans ce projet, contrairement au chapitre II de ce manuscrit, les fonctions vinylimidazoles ne sont pas sélectionnées car elles peuvent se décrocher facilement de la surface des QD lorsqu'elles se protonent en milieu acide (pKa $\approx$ 6) [199]. Le lipoamide, au contraire, est stable sur une grande gamme de pH. Il se lie fortement à la surface du QD (lorsqu'il est réduit) mais peut aussi s'accrocher à des nanoparticules d'or (lorsqu'il est réduit ou oxydé) ce qui permet de créer des nano-objets de type : QD-polymère-AuNP, représenté en **figure III.2**. Les nanoparticules d'or peuvent inhiber par transfert d'énergie la fluorescence du QD si celles-ci sont suffisamment proches spatialement du QD. La fonction sulfaméthazine va permettre d'éloigner ou de rapprocher les AuNP de la surface du QD en fonction du pH. En effet, le sulfaméthazine peut-être soit hydrophile si il est déprotoné (car chargé négativement) soit hydrophobe si il est protoné (neutre). Ces transitions entrainent des modifications réversibles de la conformation du polymère qui modulent la distance de séparation, et donc l'efficacité du transfert d'énergie, entre le donneur (le QD) et les extincteurs (les AuNP) en fonction du pH. Ceci va moduler le signal de fluorescence en fonction du pH.

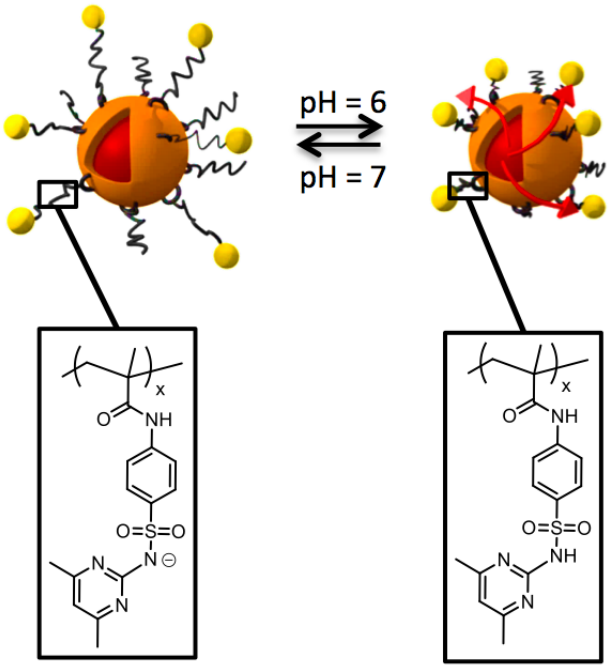



FIGURE III.2 – Nano-sonde sensible au pH : QD-polymère-AuNP

Une étude minutieuse sur la synthèse des copolymères a été effectuée afin d'avoir une sonde de pH ayant une transition autour de pH 6-7 dans des conditions physiologiques. L'obtention

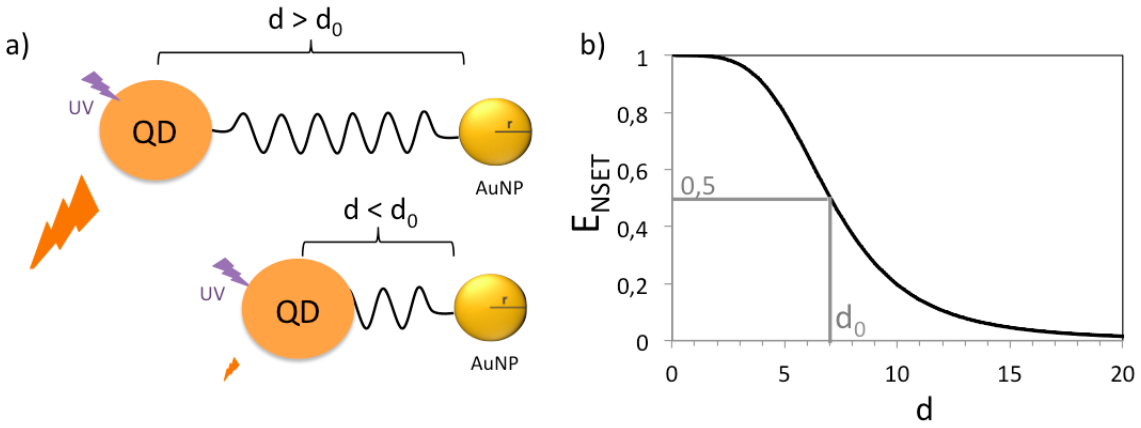



FIGURE III.3 – a) Schéma de la distance d entre un donneur (ici : QD) et un accepteur (ici AuNP). Lorsque $d>d_0$ alors le transfert d'énergie est faible ($E_{NSET} < 0{,}5$), par contre lorsque $d<d_0$ alors le transfert d'énergie est fort ($E_{NSET} < 0{,}5$). b) Courbe exemple d'efficacité de transfert d'énergie par NSET.

de ces nano-sondes a été montrée par différentes caractérisations physico-chimiques et l'efficacité de ces dernières a été mesurée à la fois en analyses *in vitro* par mesures ratiométriques de fluorescence et par mesure du temps de vie ; et également en analyse *in vivo* ratiométrique, par microscopie optique, après injection des nano-sondes et d'une référence dans des érythrocytes humains. Nous montrons également que ces nano-sondes peuvent se composer soit de QD visibles ou bien de QD SWIR. Tout ce projet a d'abord été réalisé avec des QD visibles CdSe@CdS/ZnS car ce sont des QD très stables et dont les propriétés sont bien connues au laboratoire. Ces particules modèles ont permis d'optimiser la nano-sonde, puis, dans un second temps cette même nano-sonde a été réalisée avec des QD SWIR : PbS@CdS.

J'ai réalisé l'intégralité des expériences et analyses de ce chapitre III : choix du copolymère, synthèses et caractérisations, synthèses des QD, assemblage des nano-sondes, caractérisations et mesures ratiométriques *in vitro* et *ex vivo*. Durant ce projet et avec l'aide de mon directeur de thèse Thomas Pons, j'ai également pu encadrer un stagiaire de M2, Thomas Marchandier, qui a optimisé la synthèse de QD SWIR : PbS@CdS afin d'améliorer les rendements quantiques après synthèse en milieu organique et après transfert dans l'eau.

## III.1 Choix du polymère sensible au pH

La nano-sonde de pH que nous souhaitons développer est une sonde à base de QD reliés à des nanoparticules d'or qui peuvent inhiber la fluorescence de ces derniers par transfert d'énergie si ceux-ci sont proches spatialement. Dans cet objectif, il a été nécessaire de synthétiser des polymères pH-sensibles. D'après les travaux de Ho Jo *et al.* [259], les polymères à base de sulfonamide semblent être d'excellents candidats. Un polymère à base de nombreuses fonctions sulfonamide pourra alors être soit déplié, en pH basique car déprotoné, soit replié sur lui-même

dans l'eau, en pH acide car protoné. Ce polymère pH-sensible permettra, dans notre projet, de modifier la distance entre le QD et les AuNP. D'après les travaux de McCormick *et al.* [260] le pKa de la fonction chimique sulfonamide dépend beaucoup du groupe fonctionnel R comme représenté sur la **figure III.4**. En effet, dû aux effets inductifs et/ou mésomères du groupement R, le sulfonamide déprotoné sera plus ou moins stabilisé décalant ainsi la valeur du pKa. Nous verrons par la suite que ce pKa peut-être modifié sur plusieurs unités pH : de pH = 5 à pH = 9, en modifiant soit le groupement R, soit la salinité de la solution soit le nombre de monomères par polymère.

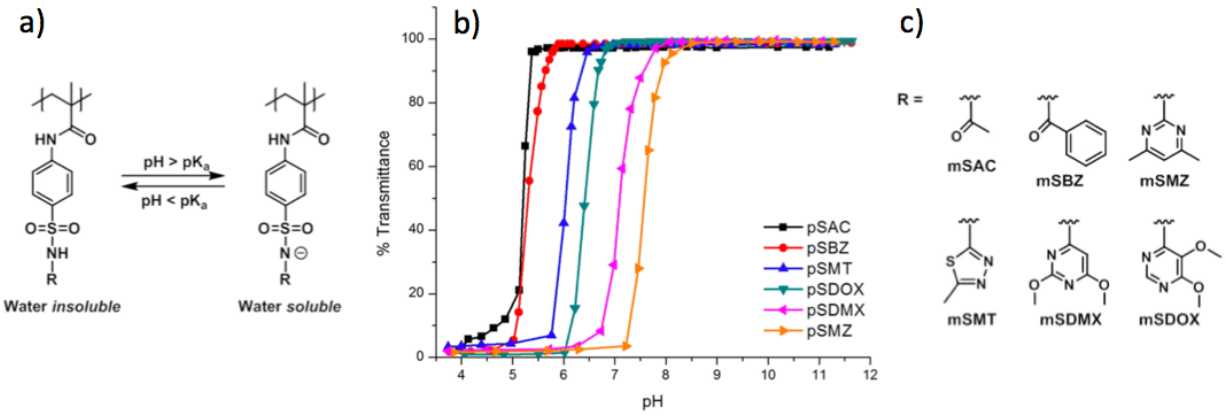



Figure III.4 – a) Polymères pH-sensibles à base de sulfonamides méthacrylamides. b) Effet du substituant R sur les courbes de turbidité des polymères pH-sensibles. Le polymère est soluble dans l'eau lorsque la transmittance vaut 100%, lorsque celle-ci diminue, il y a précipitation. c) Les différents substituants R utilisés dans l'étude de McCormick *et al.* [260].

### III.1.1 Études réalisées sur des copolymères sulfadimethoxines (SDM)

#### Synthèses des polymères

La première famille de polymères sélectionnée est à base de sulfadimethoxine (SDM). La toute première étape a été de synthétiser le monomère sulfadimethoxine méthacrylamide. Cette réaction chimique entre un chlorure d'acyle avec une amine primaire en milieu basique dans un solvant eau/acétone s'effectue avec un excellent rendement (>95%). Au bout de 2h, l'acétone est éliminée grâce à l'évaporateur rotatif puis le produit précipite en ajoutant une solution concentrée d'acide chlorhydrique. Le protocole exacte de cette synthèse se trouve en annexe et le schéma de la réaction chimique est représenté en **figure III.5**.

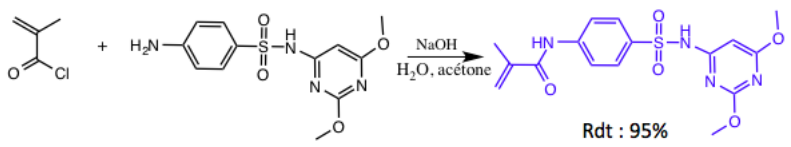



FIGURE III.5 – Synthèse du monomère sulfadimethoxine methacrylamide (SDM).

La deuxième étape est la synthèse des polymères : pSDM et pSDM/LA. Ces polymères ont été obtenus par polymérisation RAFT en utilisant de l'acide 4-cyano-4[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoïque (CDP) comme agent de transfert de phase (CTA), et du 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (V65) comme initiateur. Ces polymérisations ont été effectuées à 70°C dans du DMF. Le polymère pSDM ne se compose que de monomères SDM, il possède un rendement de 30% et son degré de polymérisation est estimé environ à DPn = 45 ($M_n \approx 17\ 000$ g.mol$^{-1}$), soit $pSMZ_{45}$. Le polymère pSDM/LA est un polymère statistique composé de sulfadimethoxine méthacrylamide et d'acide lipoïque méthacrylamide dont la synthèse est expliquée en annexe. Le rendement de synthèse de ce deuxième polymère est d'environ 30%, le DPn = 50 ($M_n \approx 18\ 660$ g.mol$^{-1}$), et le ratio SDM/LA d'environ 10/1. Ce polymère sera noté $pSMZ_{45}/LA_5$. Ces deux synthèses sont écrites en **figure III.6**.

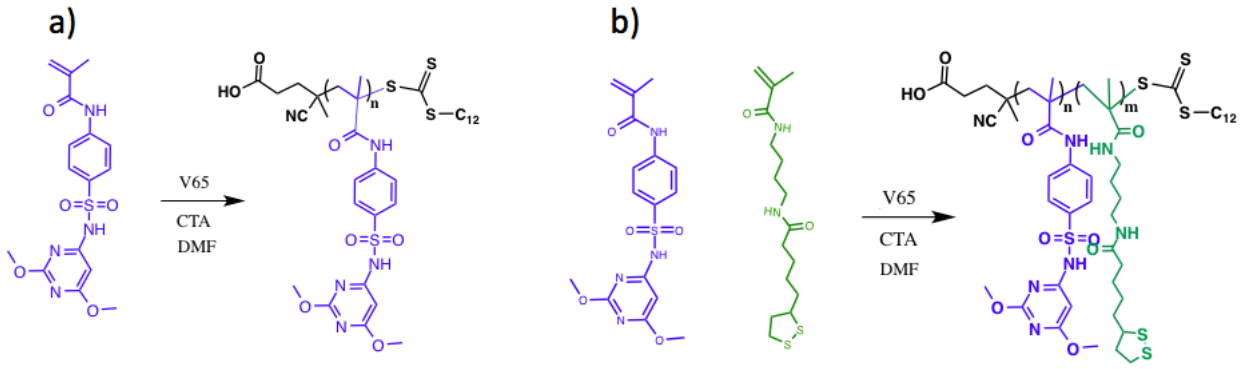



FIGURE III.6 – Synthèse des polymères : a) $pSMZ_{45}$ et b) $pSMZ_{45}/LA_5$.

### Courbes de turbidité et de dosage : pKa* et pT

Le pKa tabulé de la fonction chimique SDM vaut 6,7. Nous avons réalisé des courbes de dosages acido-basiques par ajout d'acide chlorhydrique à 1 M sur une quantité connue de monomère ou des différents polymères dissous en milieu basique, afin de déterminer les différents pKa. Le pKa correspond au pH auquel il y a autant de sulfonamides protonées et déprotonées. Nous avons confirmé expérimentalement la valeur du pKa du monomère (pKa = 6,7) et nous avons observé que ce pKa est modifiée dans le cas d'un polymère où de nombreuses fonctions SDM sont proches. Cette nouvelle valeur obtenue en dosant le polymère déprotoné sera noté

pKa*. Pour ces deux polymères, les pKa* obtenus sont autour de 7,2. Il est aussi possible de caractériser cette protonation en mesurant à partir de quel pH le polymère précipite. En effet, cette transition hydrophile/hydrophobe est observable à l'aide de mesures de turbidité en fonction du pH. Il est, ainsi, possible de définir un point de turbidité, noté pT, qui représente le pH auquel la transmittance vaut 90%. Les courbes de turbidités pour le monomère SDM ainsi que les deux polymères synthétisés sont présentés en **figure III.7**. Lorsque le pH est supérieur au point de turbidité (pT) une proportion suffisante de charges négatives permet d'assurer la solubilité du polymère dans l'eau. Au contraire, lorsque le pH est plus faible que le pT, le nombre de sulfonamides protonés est suffisant pour rendre le polymère insoluble et le faire précipiter. La solution devient alors turbide et la transmittance chute. Il est intéressant de remarquer que les polymères ont un pT plus faible que le monomère SDM. Il est donc nécessaire d'ajouter une plus grande quantité d'acide pour que les polymères précipitent. Les polymères sont donc plus longtemps solubles lors de la diminution de pH car les fonctions SMD encore déprotonées augmentent la solubilité de tout le polymère. La comparaison des courbes de turbidité des polymères $pSMZ_{45}$ et $pSMZ_{45}/LA_5$ semble montrer que l'ajout de quelques fonctions LA ne modifie pas la solubilité donc le pT du polymère.

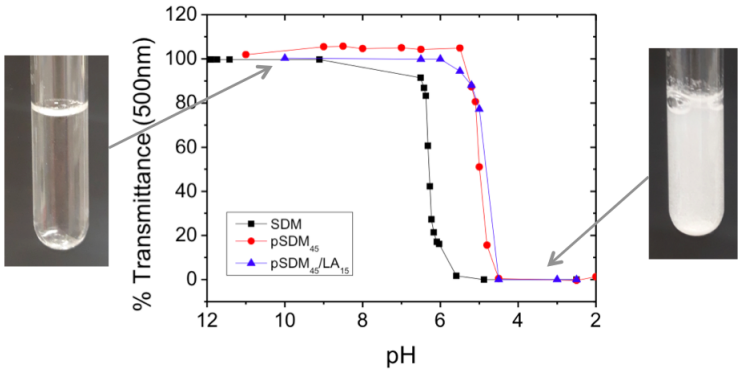



FIGURE III.7 – Courbes de turbidité du monomère SDM (noir) et des polymères $pSMZ_{45}$ (rouge) et $pSMZ_{45}/LA_5$ (bleu).

### Accroche du copolymère pSDM/LA sur des nanoparticules d'or

Afin d'observer la dépendance au pH de ce polymère sur des nanoparticules, pSDM/LA a été greffé sur des particules d'or et les spectres d'absorption des AuNP en fonction du pH ont été analysés. Les particules d'or utilisés, ici, ont un diamètre de 20 nm et sont stabilisées par des ligands citrates [261]. La synthèse des nanoparticules est détaillée en annexe. L'accroche du polymère pSDM/LA sur les AuNP ne nécessite pas de réduction préalable du pont disulfure car cette réduction peut se produire directement à la surface des nanoparticules [262]. Une fois l'échange effectué, les nanoparticules d'or sont lavées par ultracentrifugation afin d'éliminer le polymère libre.

*III.1 Choix du polymère sensible au pH*

Les spectres d'absorbance des nanoparticules d'or recouvertes du polymère (AuNP-pDPA/LA) à différents pH permettent de confirmer le caractère hydrophile/hydrophobe du polymère. En effet, sur la **figure III.8a)**, il est possible de remarquer le pic d'absorbance plasmonique à 520 nm pour un pH=8 (courbe noire), bien caractéristique des particules d'or sphériques. La solution de particules d'or est alors de couleur rouge. Si le pH est ensuite abaissé à 4 (courbe bleue) on observe une seconde absorption, plutôt large autour de 650 nm. La solution d'or passe alors du rouge ou bleu, provenant d'une agrégation des nanoparticules. Si, par la suite, le pH est remonté à 8 (courbe rouge), les nanoparticules retrouvent un spectre d'absorbance similaire au premier (courbe noire) et la solution redevient rouge. Sur la **figure III.8b)**, les mêmes expériences ont été réalisées sur les nanoparticules d'or de 20 nm sans polymère, donc recouverts de citrate. Dans ce cas, l'agrégation est également observée, en revanche il n'y a aucune réversibilité. Cette expérience prouve deux choses : le polymère est bien accroché à la surface des AuNP et celui-ci est effectivement sensible au pH de façon réversible.

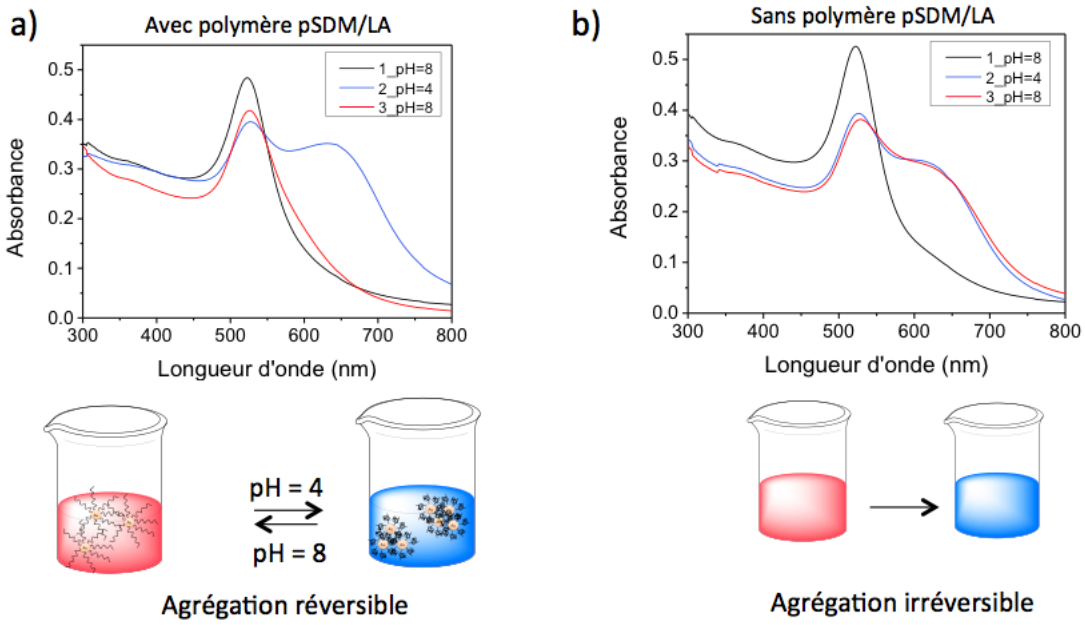



FIGURE III.8 – Courbes d'absorbance à différents pH de : a) AuNP-pSDM/LA et b) AuNP-citrate. En dessous se trouvent les couleurs des solutions dans les deux cas à pH=4 et à pH=8. Lorsque les nanoparticules sont en bonne suspension colloïdale, les solutions de nanoparticules d'or sont rouges. Lorsque celles-ci sont agrégées, les solutions deviennent bleues. Cette agrégation est réversible uniquement lorsque le polymère pSDM/LA recouvre les AuNP.

### Accroche du copolymère pSDM/LA sur des QD visibles

Par la suite, ce même polymère a été accroché sur des QD visibles : CdSe@CdZnS. La synthèse de ces QD est détaillée en annexe. L'étape d'échange de ligand a déjà été expliquée au chapitre précédent ($1^{iere}$ étape : passage des QD dans l'eau avec du MPA puis $2^{ime}$ étape : échange de ligand entre le MPA et le polymère pSDM/LA avec les fonctions lipoamides (LA)

initialement réduites en dihydrolipoamide (DHLA) avec du $NaBH_4$). Les QD ont ensuite été purifiés par ultracentrifugation pour éliminer le MPA et les polymères en excès. La multiplication des fonctions d'ancrage LA sur le même brin de polymère assure la stabilité à long terme du polymère sur la surface QD, comme démontré précédemment avec d'autres ligands polymères à base de poly-LA [144].

A nouveau, le caractère hydrophile/hydrophobe du polymère a été observé . Sur la **figure III.9**, se trouve des images de tubes à essais contenant des solutions de QD excités par un laser UV, à pH=5 et à pH=8. La fluorescence des QD est observée en orange à l'endroit où se trouve le faisceau laser. L'agrégation des particules est observée à l'œil nu : à pH=5 les QD ont agrégés et forment des agrégats de taille micrométrique alors qu'à pH=8 les QD ont de taille nanométrique et dispersés en solution. Tout comme avec les nanoparticules d'or, cette agrégation est totalement réversible.

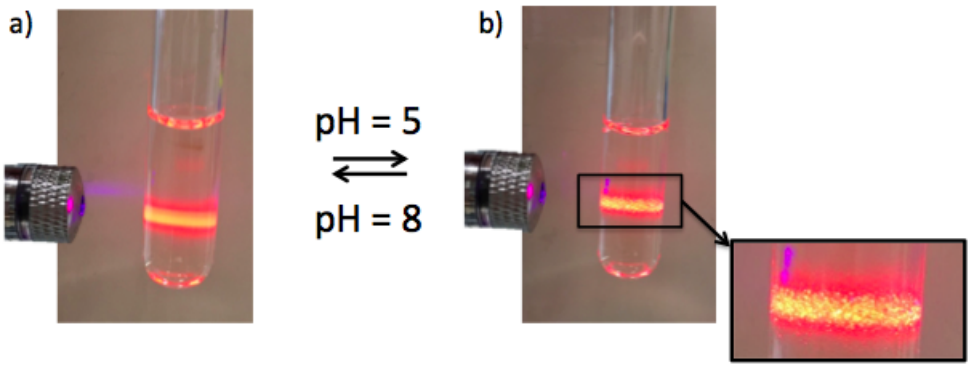



FIGURE III.9 – Photos de solutions diluées de QD-pSDM/LA : a) à pH=5 et b) à pH=8. De l'agrégation est observée à pH=5. Ce phénomène est totalement réversible.

Une seconde photo, en **figure III.10**, montre les solutions de QD à pH=8 (à gauche) et à pH=5 (à droite) après centrifugation (14 000 Tours/min pendant 5 min) sous éclairage en lumière visible a) et sous lumière UV (350 nm) b). Les QD de taille nanométrique ne sédimentent pas contrairement aux QD agrégés de taille micrométrique. Ces expériences sur nanoparticules suggèrent que le polymère a bien été accroché à la fois sur les AuNP mais aussi sur les QD ce qui est très important pour la réalisation *in fine* de notre objectif. De plus, la sensibilité et la réversibilité au pH du polymère ont bien été montrées même lorsque ce dernier se trouvent à la surface des particules. Ici, deux problèmes subsistent encore : d'une part le point de turbidité du polymère est trop bas pour notre étude (pT à pH≈5) et d'autre part, le polymère s'agrège très rapidement lorsqu'il devient hydrophobe. Il ne semble pas y avoir d'étape intermédiaire où le polymère commencerait à s'effondrer sur lui-même sans que les particules ne s'agrègent. Pour la suite de cette étude, il a donc été nécessaire de travailler avec un nouveau polymère en changeant de fonction sulfonamide.

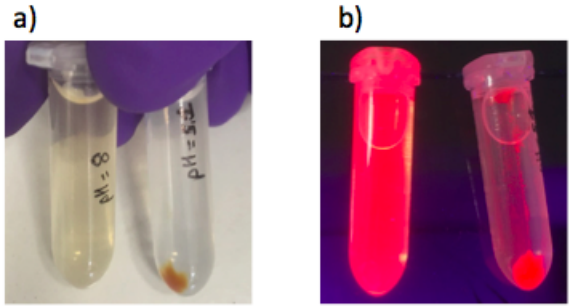



FIGURE III.10 – Photos des QD-SDM/LA en solution après centrifugation a) éclairage en lumière blanche et b) éclairage en lumière UV. Le tube de droite est à pH=5 et celui de gauche à pH=8.

### III.1.2 Études réalisées sur des copolymères sulfamethazine (SMZ)

#### Synthèses des polymères

La famille de polymères sélectionnée, ici, est à base de sulfamethazine (SMZ). Le pKa théorique du monomère SMZ est d'environ 7,5. Le sulfamethazine a été choisi pour son pKa légèrement plus élevé que le sulfadimethoxine.

Plusieurs polymères ont été synthétisés avec des tailles différentes. La synthèse est très proche de celle des copolymères SDM/LA. La toute première étape est la synthèse du monomère sulfamethazine méthacrylamide. Cette réaction chimique entre un chlorure d'acyle avec une amine primaire en milieu basique dans un solvant eau/acétone s'effectue avec un excellent rendement (>95%). Le protocole exact de cette synthèse se trouve en annexe.

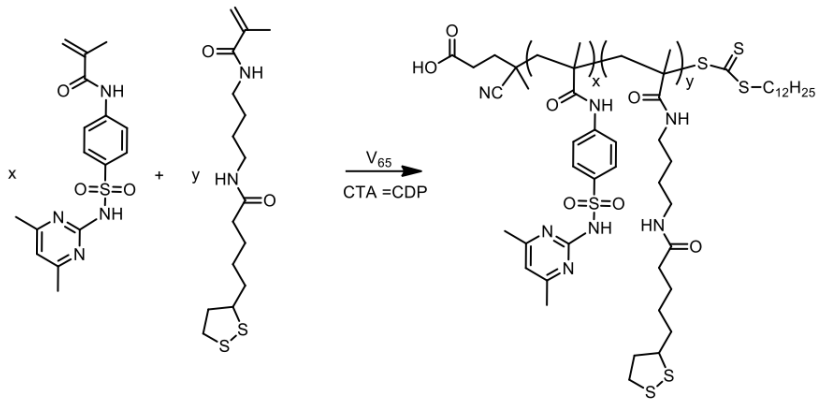



FIGURE III.11 – Synthèse du monomère sulfamethazine methacrylamide (SMZ).

La deuxième étape est la synthèse des polymères : pSMZ et pSMZ/LA. Cette étape est schématisée en **figure III.14**. Plusieurs polymères pSMZ/LA ont été synthétisés avec des tailles différentes mais ayant tous environ le même ratio LA : SMZ = 1 : 4 (ou 5). Ces polymérisations

ont été effectuées à 70°C dans du DMF. Le polymère pSMZ ne se compose que de monomères SMZ alors que les polymères pSMZ/LA sont des polymères statistiques composés de SMZ et d'acide lipoïque méthacrylamide (LA). Ces polymères ont des taux de polymérisation entre 20% et 40%. Il n'a pas été possible de caractériser ces polymères par GPC. En effet, malgré nos tentatives, ces polymères s'adsorbent sur les colonnes de GPC aqueuse acide, et aussi sur les colonnes de GPC DMF. Les nombres de fonctions SMZ et de fonctions LA ont donc été estimés avec les spectres de RMN $^1$H en comparant les pics des alcènes de la fonction métacrylamide avant et après polymérisation. Il est possible de différentier les monomères SMZ et LA car ces pics n'ont pas exactement le même déplacement chimique. Tous les polymères synthétisés sont présentés dans le tableau III.1. La masse molaire en nombre estimée de ces polymères varie entre 5 400 et 43 200 g.mol$^{-1}$ (l'hypothèse d'une synthèse relativement monodisperse a été faite). Le spectre RMN $^1$H du polymère pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ se trouve en **figure III.12**.

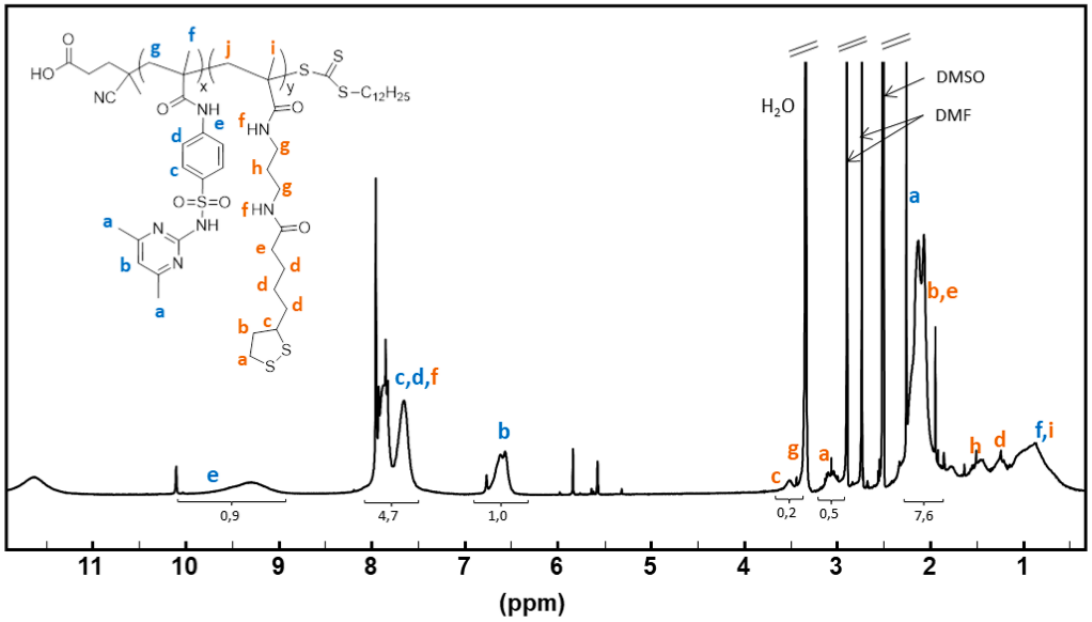



Figure III.12 – Spectre RMN $^1$H (DMSO-d6, 400 MHz) du polymère pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$.

Table III.1 – Liste des différents polymères synthétisés : nom du polymère ; nombre de fonctions SMZ ; nombre de fonctions LA et ratio SMZ/LA ; masse molaire en nombre du polymère (Mn).

| Nom du Polymère | Nombre de fonction SMZ | Nombre de fonction LA | Ratio LA/SMZ | Mn (g.mol$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| pSMZ$_{12}$/LA$_3$ | 12 | 3 | 1/4 | ≈ 5 400 |
| pSMZ$_{25}$ | 25 | - | - | ≈ 9 100 |
| pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ | 65 | 15 | 1/4.3 | ≈ 29 000 |
| pSMZ$_{100}$/LA$_{20}$ | 100 | 20 | 1/5 | ≈ 43 200 |

### Études sur les polymères seuls en fonction du pH

Des courbes de turbidité et de dosage ont été effectuées afin d'obtenir le pka* et le pT de chaque polymère. Il a été intéressant de remarquer, grâce aux dosages acido-basiques, que le pKa* des polymères est constant ≈ 7,8 (peu importe la taille du polymère ou la salinité de la solution) alors que le pKa (théorique et confirmé par dosage) du monomère est de 7,5. En revanche, le point de turbidité (pT) des polymères dépend fortement de la concentration en sel de la solution aqueuse et aussi de la taille des polymères. La **figure III.13** présente les courbes de turbidité en fonction du pH pour différentes concentrations en sel (NaCl) (a) et pour différentes tailles de polymères (b). L'augmentation de la concentration en sel a tendance à diminuer la solubilité du polymère en raison de l'écrantage des charges électrostatiques. Le point de turbidité est alors plus élevé car une plus grande fraction de SMZ doit être chargée pour assurer la solubilité du polymère dans l'eau. L'augmentation de la taille du polymère augmente aussi le point de turbidité vers un pH plus élevé (avec une concentration en sel fixe : [NaCl] = 150 mM). Ce point de turbidité évolue de ≈ 6 à ≈ 8 lorsque le DPn (en SMZ) augmente de 12 à 100. Cela suggère que les plus gros polymères s'agrègent plus facilement que les plus courts, même s'ils contiennent la même fraction d'espèces chargées et non chargées à un pH donné. L'incorporation d'une petite fraction de fonctions LA ne semble pas, une fois encore, influer sur les changements de conformation des polymères.

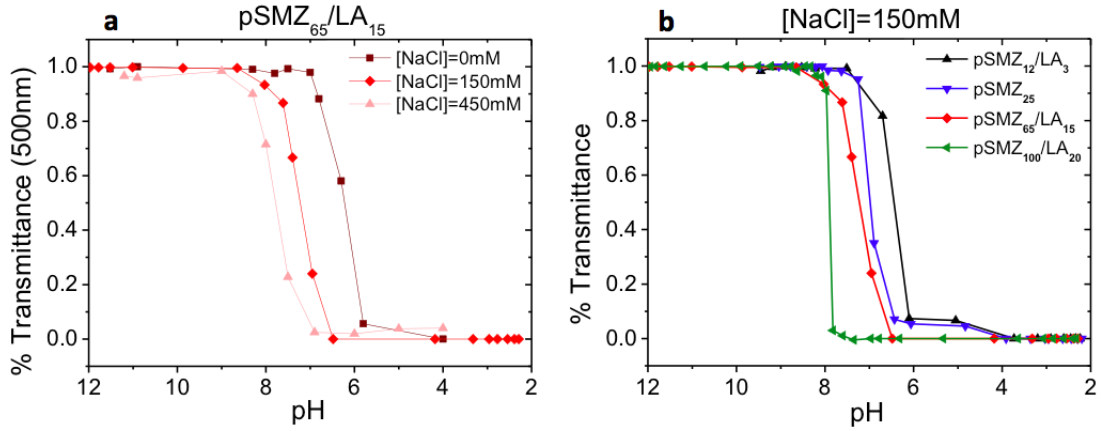



FIGURE III.13 – Courbes de turbidité en fonction du pH (a) pour polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$ avec différentes concentrations en NaCl et (b) avec [NaCl] fixe (150mM) mais avec différentes tailles de polymères.

### Études sur les QD-pSMZ/LA en fonction du pH

Nous avons étudié, ensuite, le comportement des polymères pSMZ/LA une fois accrochés sur des QD coeur-multicoques : CdSe@CdS/ZnS.

Des analyses en diffusion dynamique de la lumière : DLS (Dynamic Light Scattering) ont été effectuées pour caractériser la taille de ces objets. La DLS a permis d'obtenir le rayon hydrodynamique pour chaque échantillon QD-pSMZ/LA en fonction du pH. Par exemple, pour

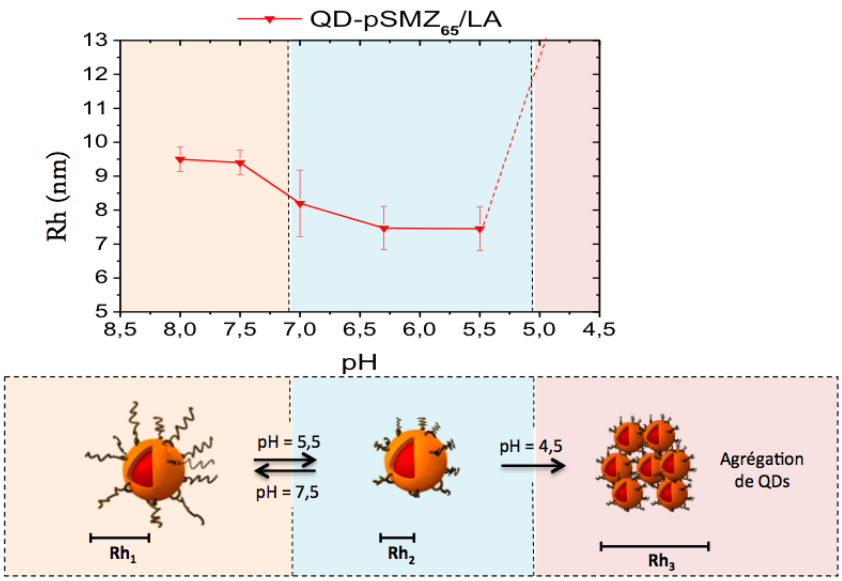



FIGURE III.14 – Courbe présentant le rayon hydrodynamique (Rh) de l'échantillon QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ en fonction du pH. Ces valeurs de Rh ont été mesurées en DLS.

l'échantillon QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$, la courbe est en **figure III.14**. Grâce à celle-ci, il est possible d'étudier le comportement du polymère en fonction du pH. Lorsque le pH est supérieur à 7,5 le rayon hydrodynamique du QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ est constant et vaut environ 9,5 nm. Ce rayon hydrodynamique est cohérent avec la taille des QD inorganiques (7 nm de diamètre) entourés d'une couche de polymères. Puis, lorsque le pH diminue entre 7,5 et 5,5 le rayon hydrodynamique

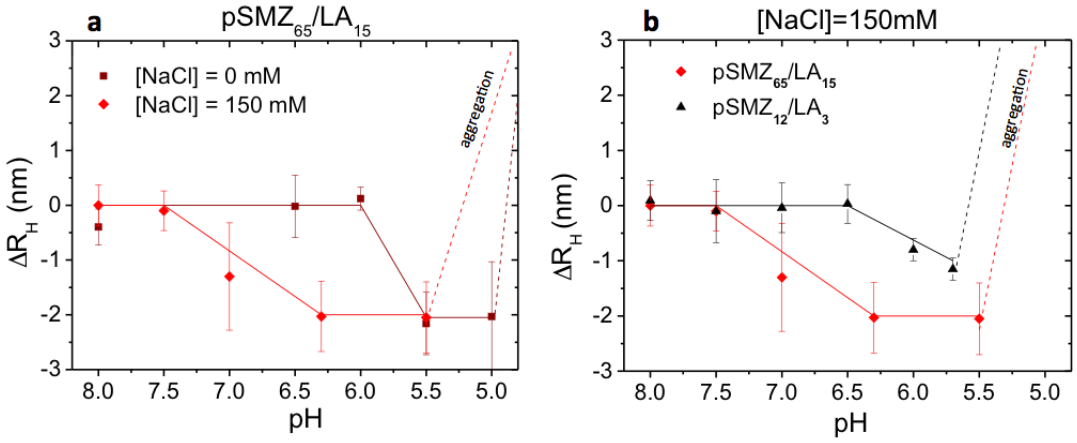



FIGURE III.15 – (a) Variation du rayon hydrodynamique des QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ en fonction du pH pour [NaCl] = 0 mM et [NaCl] = 150 mM. Le rayon hydrodynamique initial à pH 8, 150 mM NaCl : 9,5 ± 0,5 nm pH 8 et sans NaCl : 8,5 ± 0,4 nm. Ces tailles sont cohérentes avec la taille du QD recouvert avec polymère. La différence entre les deux concentrations en sel provient de la différence de force ionique de la solution. (d) Variation du rayon hydrodynamique de QD recouverts de pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ ou de pSMZ$_{12}$/LA$_3$ en fonction du pH à [NaCl] = 150 mM (rayon hydrodynamique initial de QD recouverts de pSMZ$_{12}$/LA$_3$ à pH 8 : 6,8 ± 0,4).

décroit de 2 nm (jusqu'à 7,5 nm). Le polymère commence à s'effondrer sur lui-même lors de la protonation d'une certaine fraction de SMZ mais les QD ont toujours une bonne stabilité colloïdale, donc sont stables dans l'eau comme le montre leur distribution de taille d'intensité monomodale en DLS. Ce n'est que lorsque le pH est inférieur à 5 que les QD s'agrègent car la surface est devenue totalement hydrophobe, quasiment tous les SMZ sont protonés. Pour la suite de ce projet, nous souhaitons que la taille du polymère varie mais que les QD ne s'agrègent pas. Par conséquent, nous utiliserons cette chimie de surface en restant à un pH supérieur à 5.

Par DLS, nous avons aussi étudié l'influence de la taille du polymère et de la salinité. La **figure III.15(a)** montre l'influence de la concentration en NaCl sur l'échantillon QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ et la **figure III.15(b)** montre l'influence de la taille du polymère à une concentration en sel fixe. Ces résultats confirment les observations faites avec les courbes de turbidité des polymères seuls : l'augmentation de la concentration en sel ou de la longueur du polymère conduit à un décalage du pH de transition vers des valeurs plus basiques.

Dans le suite du projet, le polymère sélectionné est le pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ avec une transition entre un pH de 7 et de 6 et la concentration saline en NaCl sera fixée à 150 mM car il s'agit de la salinité physiologique.

## III.2 Nano-sonde de pH avec des QD visibles

### III.2.1 Assemblage de la nano-sonde de pH

Afin d'obtenir la nano-sonde sensible au pH, la dernière étape est d'accrocher les germes d'or (AuG) sur la surface des QD-pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$ (noté par la suite uniquement pSMZ/LA).

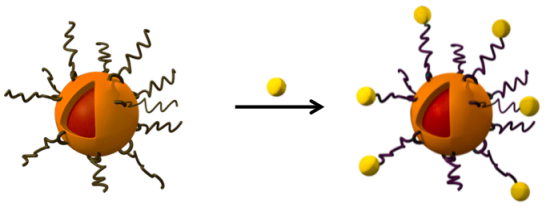


FIGURE III.16 – Schéma de l'assemblage de la nano-sonde sensible au pH.

#### Synthèse de la nano-sonde

Des germes d'or (environ 2 nm de diamètre, présentés en **figure III.17**) ont été synthétisés et assemblés sur au QD-pSMZ/LA grâce aux fonctions LA restantes (non accrochées à la surface du QD). La synthèse de AuG est présentée en détails en annexe. Les germes d'or ont pu être attachés sur le polymère pSMZ/LA recouvrant les QD par simple mélange des deux solutions de nanoparticules en milieu basique, au dessus de la transition du polymère pH-sensible. Par la suite, un court ligand hydrophile, l'acide lipoïque-sulfobetaïne (LA-SB), dont la synthèse est aussi détaillée en annexe, a été ajouté afin de saturer la surface libre restante des nanoparticules

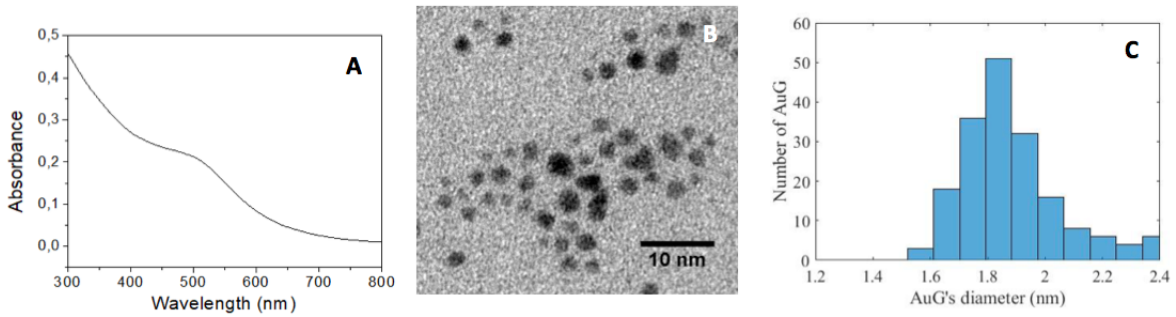



Figure III.17 – (a) Spectre d'absorbance des germes d'or (AuG) dans l'eau. (b) Image TEM des AuG. (c) Distribution en taille de la synthèse des AuG.

d'or. Dans sa forme oxydée, le LA-SB est capable de se lier à la surface de l'AuNP, mais pas à la surface des QD. Ceci empêche de déplacer les polymères pSMZ/LA à la surface des QD. Un lavage par vivaspin 100K a ensuite été réalisée pour éliminer l'excès de LA-SB et les petits AuG non conjugués. Un dosage retour a été effectué et montre que, pour un rapport AuG/QD inférieur à 20, la conjugaison des AuG à des QD-pSMZ/LA a atteint une efficacité supérieure à 95%. Cette très forte efficacité d'assemblage est attribuée à la très forte affinité des fonctions LA libres pour les surfaces d'or. Ce dosage par retour est présenté en **figure III.18**. Les spectres d'absorbance des QD-pSMZ/LA et des AuG seuls sont respectivement de couleur rose et noir. Les spectres du mélange des deux solutions (en noir) puis après ajout du TA-SB en excès (en bleu foncé) correspond à la somme de l'absorbance des QD, des AuG et du TA-SB (absorbance en dessous de 420 nm). Après lavage de ce nano-assemblage le spectre d'absorbance de la solution passée à travers le vivaspin permet de doser le nombre de AuG non-accrochés aux QD. Ici, d'après le spectre de dosage en retour (en bleu clair) toutes les particules d'or semblent bien

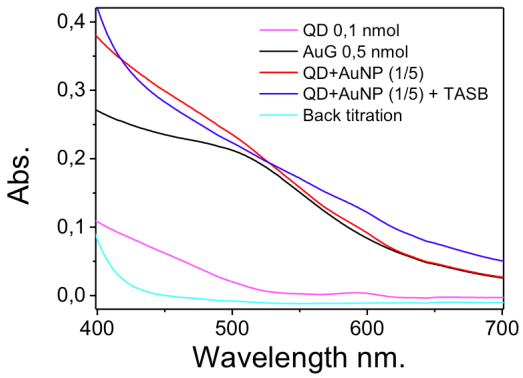



Figure III.18 – Spectre de dosage en retour du nombre de AuG attachés par QD. En rose : les QD-pSMZ/LA avant mélange. En noir : les AuG avant mélange. En rouge : QD-pSMZ/LA + AuG après mélange. En bleu foncé : QD-pSMZ/LA + AuG après ajout de TASB en excès. En bleu clair, résultat du dosage en retour : solution passée à travers le vivaspin.

attachées car aucune n'est détectable par absorbance. Seul le TA-SB libre est détecté dans la solution.

La **figure III.19(a)** montre des images de microscopie électronique en transmission de l'assemblage QD-pSMZ/LA-AuG. Les QD se trouvent au centre de la nano-sonde et les AuG en périphérie. La couche de polymères autour des QD ne peut être visualisée car elle absorbe trop peu les électrons par rapport aux QD et AuG.

Le nombre optimal de AuG par nano-sonde a ensuite été déterminé. En effet, l'augmentation du nombre de AuG/QD entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence des QD même à pH basique, lorsque le polymère est totalement déplié. Il a donc fallu chercher le nombre optimal de AuG : il en faut suffisamment pour avoir un maximum de différence de fluorescence entre un pH basique et acide mais il n'en faut pas trop initialement afin de ne pas trop avoir de transfert

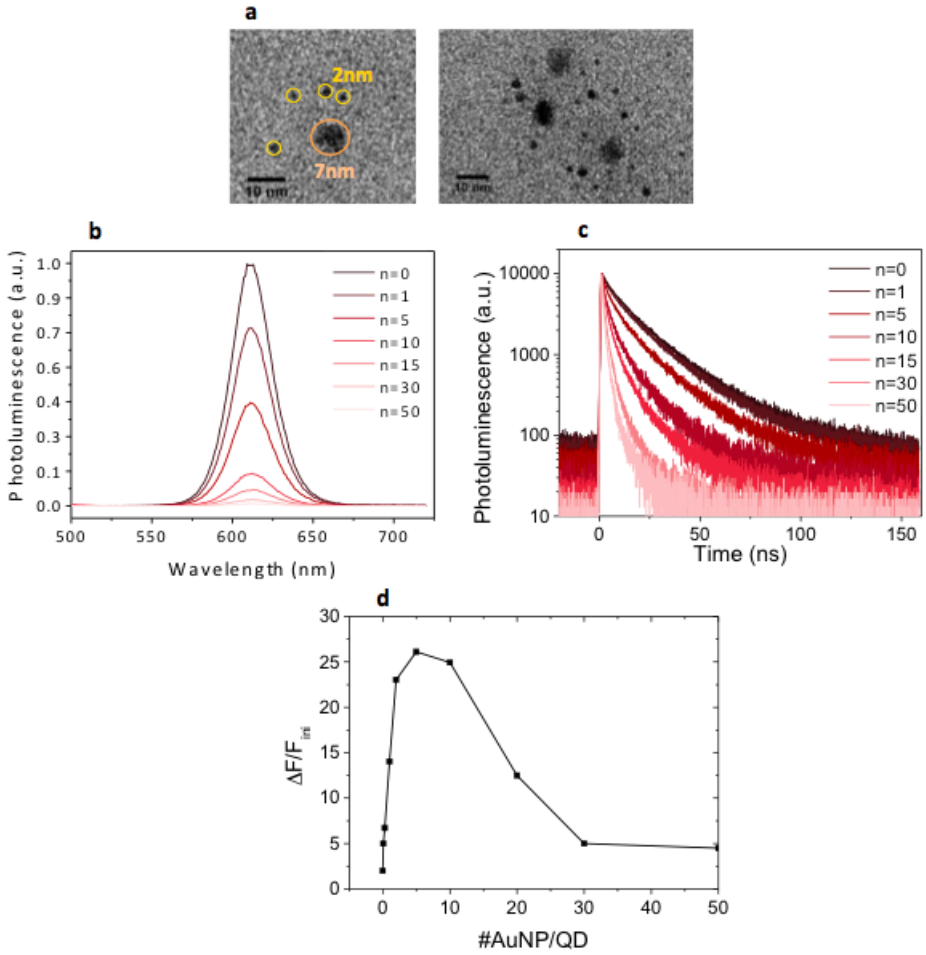



FIGURE III.19 – (a) Image TEM de la nano-sonde (avec le ratio : AuG/QD = 5/1). (b) Courbes de photoluminescence et (c) courbes de déclin de fluorescence des nano-sondes pour différents ratio AuG/QD. (d) Différence entre le maximum de fluorescence des QD à 610 nm entre un pH 7 et un pH 5,5 normalisé par la fluorescence à pH 7, en fonction du ratio AuG/QD.

d'énergie à pH basique. Les spectres de fluorescence (aussi nommée spectre de photoluminescence : PL) et de déclin de fluorescence (ou intensité de PL résolue en temps) en fonction du nombre de AuG/QD à pH basique se trouvent en **figure III.19(b)** et **(c)**. La différence de fluorescence entre pH 7 et pH 5,5, normalisée par rapport à la fluorescence à pH 7 (**figure III.19(c)**) permet d'obtenir le nombre optimal de particules d'or. Le rapport AuG/QD de 5/1 a donc été sélectionné pour les nano-sondes. Dans cette configuration, l'efficacité d'extinction est de 50% à pH basique, *i.e.* 50% de fluorescence en moins par rapport à la fluorescence du QD en l'absence de AuNP. Ceci correspond à l'endroit où la pente de l'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance entre le donneur et l'accepteur est la plus grande (dE/dd est maximale), donc où la sensibilité est maximale, voir **figure III.20**.

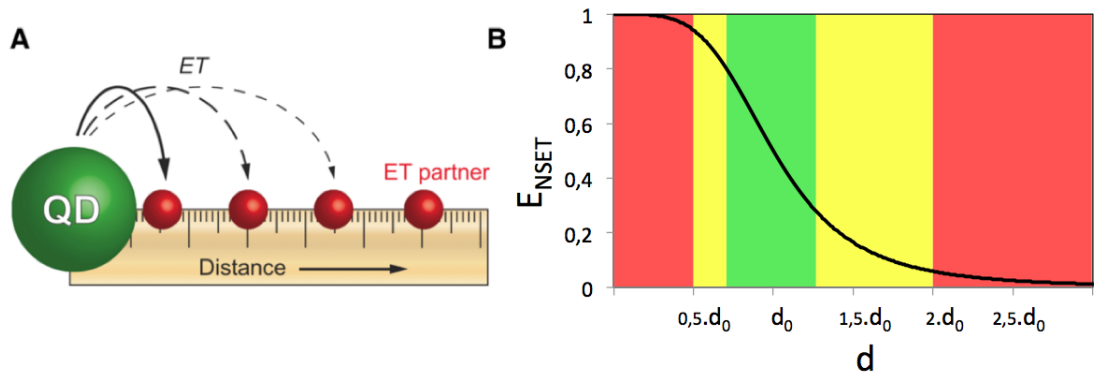



Figure III.20 – Efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance d entre le donneur et l'accepteur. $d_0$ correspond à la distance à laquelle il y a une efficacité de transfert d'énergie de 50%. Ces figures proviennent de la référence [159].

Ce transfert d'énergie est aussi prouvé par les mesures de temps de vie de fluorescence qui montrent une diminution du temps de vie de l'état excité donc une accélération de la cinétique de désexcitation due à une nouvelle possibilité de désexcitation non radiative (voir la partie en annexe détaillant les transferts d'énergie). Les efficacités d'extinction obtenues à partir des mesures de fluorescence et des temps de vie sont cohérentes avec une extinction homogène progressive de la population de QD, et non à l'extinction totale d'une fraction de QD.

### Sensibilité au pH et réversibilité

Lorsque ces nano-sondes : QD-pSMZ/LA-AuG se trouvent dans une solution dont le pH est en dessous du pH de transition du polymère, ce dernier se replie sur lui-même diminuant la distance $d$ entre QD et AuG. Ceci augmente le transfert d'énergie entre les nanoparticules et entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde. La **figure III.21** prouve la dépendance en pH de la sonde, en (a) se trouve la photoluminescence et en (b) le déclin de PL de la nano-sonde en fonction du pH. En diminuant le pH entre 7 et 5,5 on observe une diminution de $\approx$ 50% de la PL. Le temps de vie est cohérent avec la PL puisque celui-ci est accéléré lors de

la diminution de pH. Ce transfert d'énergie progressif correspond à l'effondrement de la couche de polymères provenant de l'augmentation de fonctions SMZ protonées, bien que l'ensemble de la nano-sonde reste hydrophile et stable colloïdalement en solution. Il est à noter qu'en absence de AuG, la photoluminescence des QD-pSMZ/LA ne dépend pas du pH (<2%). Ceci démontre bien que les variations d'intensité de fluorescence de la nano-sonde proviennent du changement de distance entre le QD et les AuG périphériques et non d'une interaction entre la surface du QD et le polymère. Ces spectres ont été réalisés dans une solution aqueuse de 150 mM de NaCl pour mimer les conditions de salinité des milieux biologiques.

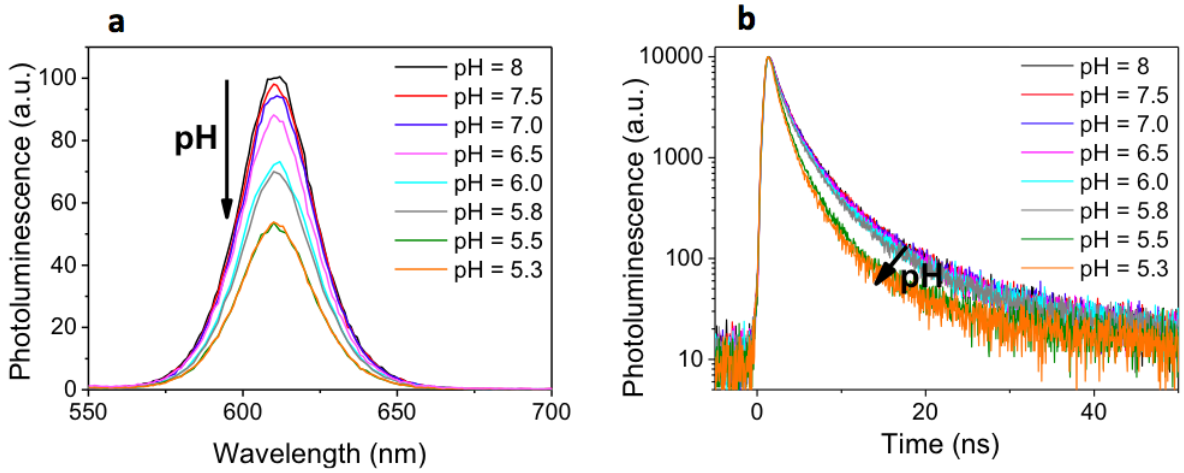



FIGURE III.21 – (a) Spectre de photoluminescence et (b) spectre de déclin de PL (spectre résolu en temps) de la nano-sonde en fonction du pH. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 400 nm.

Afin d'étudier la réversibilité de cette nano-sonde, les QD-pSMZ/LA-AuG ont été soumis à plusieurs cycles de variation de pH entre des conditions basiques et acides. La **figure III.22** montre une réversibilité sur au moins 3 cycles de pH et peut s'observer à la fois sur les courbes

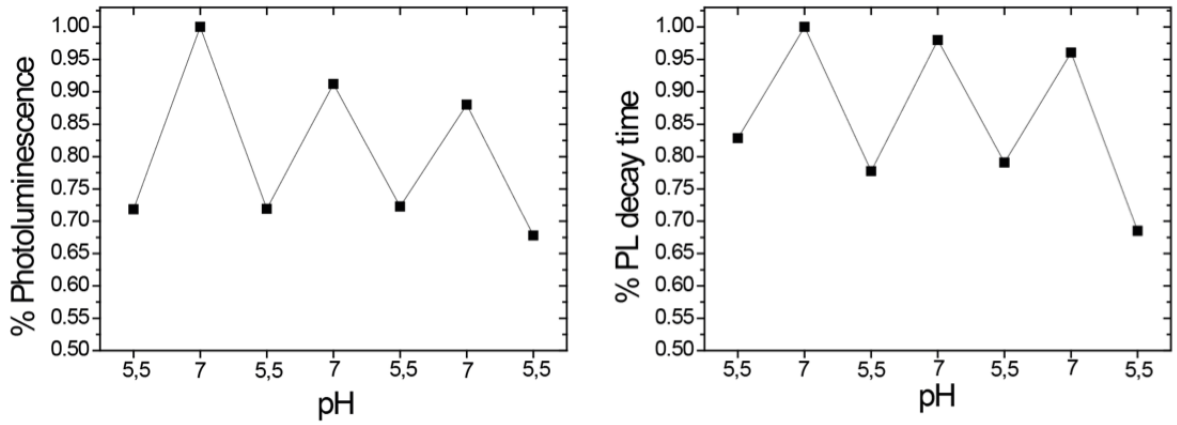



FIGURE III.22 – Variation de (a) la PL et (b) le temps de vie moyen de PL lors de 3 cycles de variation de pH entre 5,5 et 7. En rouge la sonde sans AuG (donc le contrôle) et en noir la nano-sonde avec AuG.

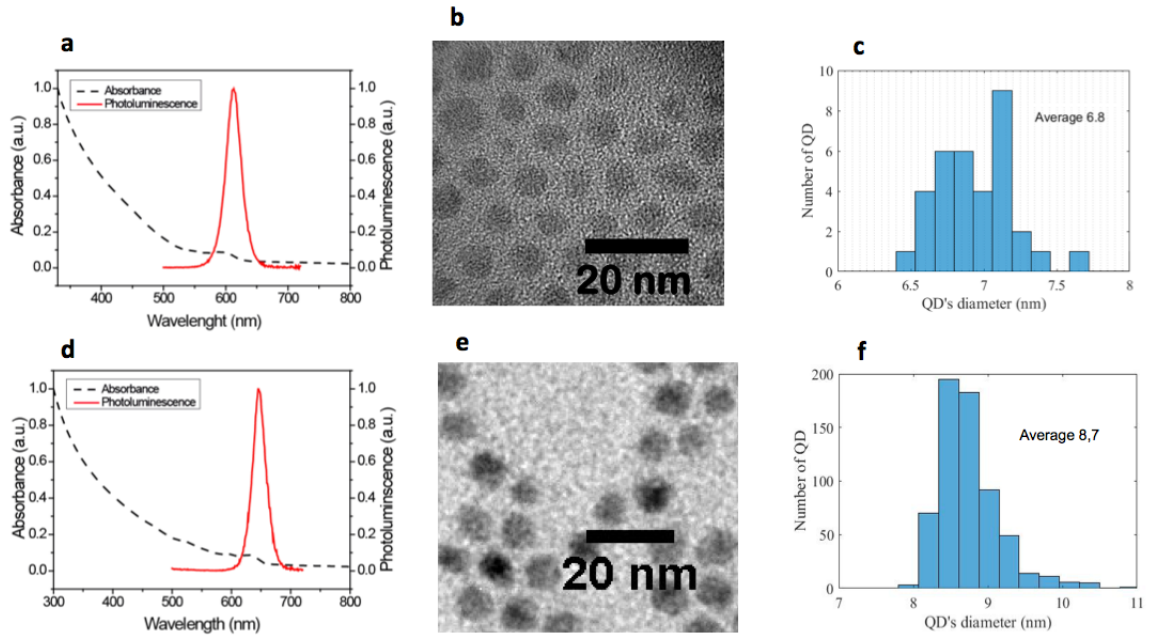



FIGURE III.23 – (a) Spectres d'absorption et de PL des QD610 dans l'hexane ($\lambda_{exc} = 400$ nm). (b) Microscopie TEM des QD610. (c) Distribution en taille des QD610. (d) Spectre d'absorption et de PL des QD650 dans l'hexane. (e) Microscopie TEM des QD650. (f) Distribution en taille des QD650.

de photoluminescence mais aussi sur le temps de vie de photoluminescence.

### III.2.2 Mesures ratiométriques

#### Mesures ratiométriques *in vitro*

L'imagerie quantitative du pH dans des échantillons biologiques nécessite un signal ratiométrique. En effet, un signal de photoluminescence faible (PL) pourrait signifier soit une faible concentration de la sonde dans un environnement basique ou neutre, soit une concentration plus élevée mais dans un environnement acide. Les variations de la cinétique de décroissance de PL pourraient permettre des estimations du pH basées sur des mesures de la durée de vie, cependant, ces variations se produisent principalement à un pH inférieur à 6, alors que les intensités QD PL varient plus progressivement.

Nous avons, par conséquent, choisi de développer un système bicolore composé de la nano-sonde (QD-pSMZ/LA-AuG) sensible au pH émettant à 610 nm (noté par la suite QD610-SMZ-Au) et d'une autre population de Quantum Dots émettant à 650 nm, non dépendant du pH, recouverts d'un polymère vinylimidazone-b-sulfobétaine (noté QD650-SB) [145]. Ces deux populations de QD ont toutes deux des CdSe@ZnS/CdS mais ayant des tailles différentes. Leurs spectres d'absorbance, de PL, leur distribution en taille ainsi qu'une image TEM de chacune de ces deux synthèses sont présentés en **figure III.23**.

La **figure III.24(a)** montre une atténuation de l'intensité du signal de PL des QD610-

SMZ-Au entre pH 7 et 5,5, ce qui correspond aux mesures précédentes. En revanche, l'intensité de PL des QD650-SB est restée constante, fournissant un signal de référence utile. Le cycle de réversibilité en pH neutre et acide montre que les variations du rapport d'intensité de PL : 610/650 sont totalement réversibles (d'après **III.24(b)**). De plus, les mesures d'intensité de PL résolue en temps, sur la **figure III.24(c)**, de la population à 610 nm et de la population à 650 nm obtenus séparément (grâce au filtrage spectral du monochromateur du détecteur) montrent que la cinétique de décroissance de PL des QD650-SB ne dépend pas du pH dans cette plage physiologique, alors que les QD610-SMZ-Au présentent une diminution de leur temps de vie en présence du transfert d'énergie. Ces modifications de cinétique de désexcitation sont également réversibles comme il peut être observé sur la **figure III.24(d)**. Cette expérience a été réalisée en solution *in vitro* avec une concentration en NaCl de 150 mM. Dans ces conditions, une diminution de PL d'environ 20-30% a été observée.

Des expériences similaires ont également été réalisées en solution *in vitro* dans des conditions de salinité plus élevée, [NaCl] = 450 mM. Les résultats démontrent un comportement similaire avec des variations encore plus prononcées entre pH neutre et acide en raison de l'écrantage des charges comme expliqué précédemment. La variation est désormais de ≈ 50%. Les résultats sont présentés en **figure III.25**.

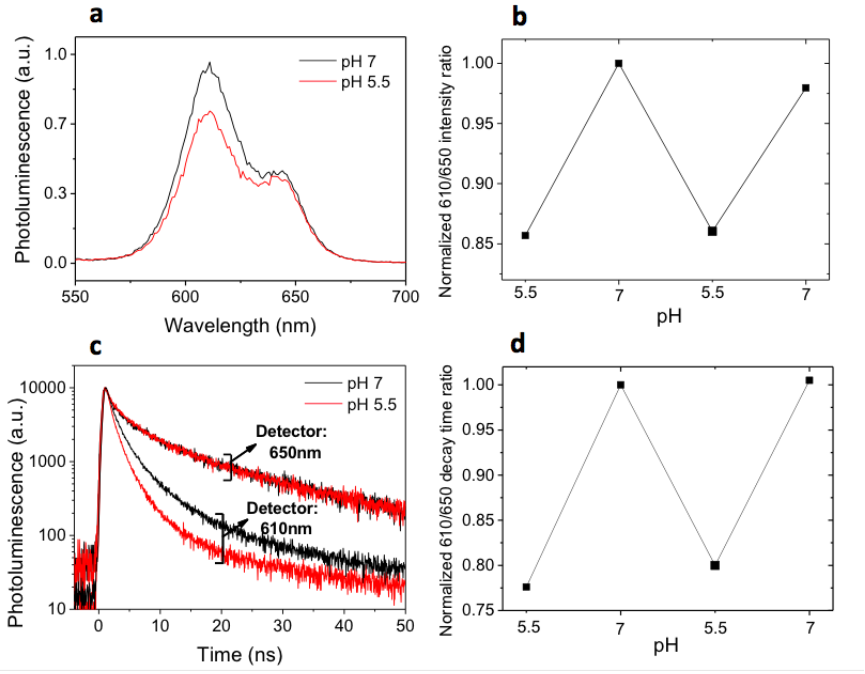



FIGURE III.24 – Mesures bicolores à [NaCl] = 150 mM avec $\lambda_{exc}$ = 400 nm. (a) Spectre de PL de QD610-pSMZ/LA-AuG (sensible au pH) et de QD650-SB (non sensible au pH) à pH 7 et 5,5. (b) Ratio entre l'émission de PL à 610 nm et 650 nm lors de 2 cycles de variation de pH. (c) Spectres d'intensité de PL résolus en temps de la population de QD610-SMZ-Au (détecteur 610 nm) et de la population de QD650-SB (détecteur 650 nm) à pH 7 et pH 5,5. (d) Ratio entre le temps de vie de PL à 610 nm et 650 nm lors de 2 cycles de variation de pH entre 5,5 et 7.

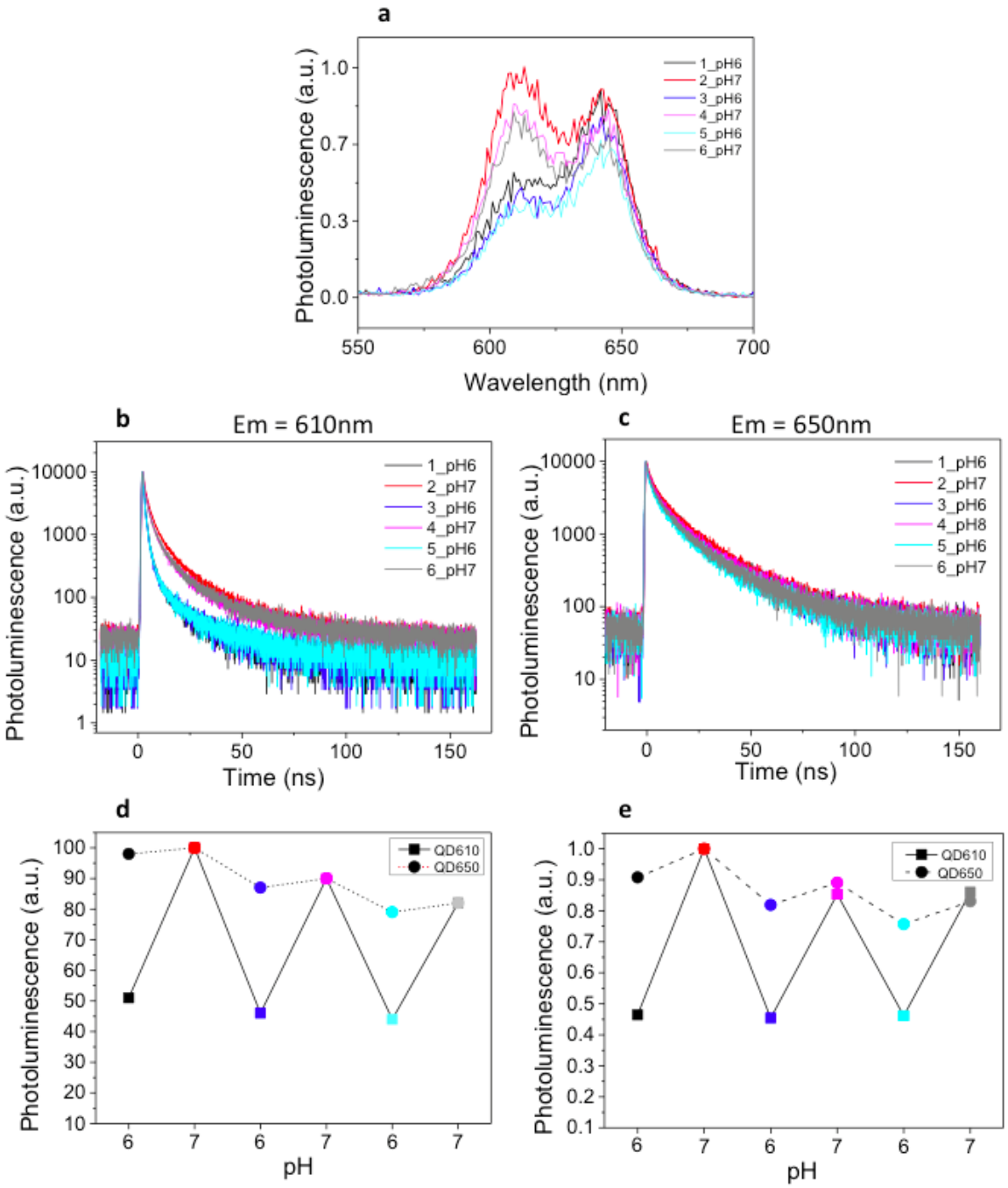



FIGURE III.25 – Mesures bicolores à [NaCl] = 450 mM avec $\lambda_{exc}$ = 400 nm. (a) Spectre de PL de QD610-SMZ-Au (sensible au pH) et de QD650-SB (non sensible au pH) à pH 7 et 6. (b) Spectres d'intensité de PL résolus en temps de la population de QD610-SMZ-Au (détecteur 610 nm) lors de 3 cycles de variation de pH (c) Spectres d'intensité PL résolus en temps de la population de la population de QD650-SB (détecteur 650 nm) lors de 3 cycles de variation de pH. (d) Fluctuation de la PL de QD610 (traits pleins) et de QD650 (pointillés) lors des 3 cycles de variation de pH. (e) Fluctuation du temps de vie de QD610 (traits pleins) et de QD650 (pointillés) lors des 3 cycles de variation de pH.

### Mesures ratiométriques *ex vivo*

Les résultats de ces dernières expériences semblent suggérer qu'un système bicolore composé de QD610-SMZ-Au et de QD650-SB pourrait être utilisé pour réaliser une image ratiométrique du pH dans des environnements biologiques. Pour l'imagerie *in vivo*, deux difficultés sont toutefois attendues. Une fois les particules injectées dans le sang, la nature anionique du polymère SMZ est susceptible d'induire une adsorption rapide des protéines présentes dans le sang (comme il l'a été expliqué dans le chapitre II de cette thèse). Cela conduirait à une opsonisation ultérieure et à une absorption efficace par les macrophages du système réticulo-endothélial. De plus, ces deux populations de QD ayant des chimie de surface distinctes pourraient avoir des biodistributions considérablement différentes après une injection intraveineuse. Ceci rendrait l'imagerie ratiométrique impossible en pratique.

En conséquence, nous proposons, dans ce projet, de contourner ces limitations en incorporant les QD sensibles au pH et les QD de référence dans des érythrocytes (globules rouges). En tant que cellules les plus abondantes dans le sang, les érythrocytes sont des vecteurs naturels attrayants pour transporter des agents d'imagerie fonctionnelle ou des médicaments dans le sang, tout en assurant une excellente biocompatibilité et des temps de circulation sanguine prolongés [263].

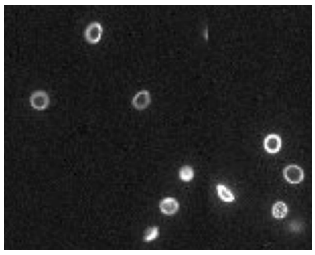


FIGURE III.26 – Photo de microscopie de fluorescence (détecteur à 610 nm) d'érythrocytes chargés avec des Quantum Dots QD610-SMZ-Au.

Un protocole (détaillé en annexe) a été développé pour charger les érythrocytes avec un mélange de QD610-SMZ-Au et de QD650-SB en réalisant un choc hypotonique, comme le résume la **figure III.27** [264]. Après lavage, les érythrocytes ont été modifiés en incorporant de l'amphotéricine B à leurs membranes. L'amphotéricine B permet aux petits ions de traverser la barrière membranaire des érythrocytes, permettant ainsi de les rendre perméables au pH [265]. Les érythrocytes alors obtenus présentent une quantité hétérogène de QD en raison des différents niveaux de perméabilité de leur membrane lors du choc hypotonique, permettant de charger une plus ou moins grande quantité de QD. Le ratio entre le nombre de QD610-SMZ-Au et QD650-SB incorporés par érythrocyte devrait, cependant, être statistiquement le même.

Pour chaque érythrocyte il est ensuite possible d'obtenir la fluorescence provenant de chacune des deux populations de QD avec un détecteur ne collectant que les photons à 610 nm et

un autre à 650 nm. Un rapport R d'intensité de PL 610/650 peut alors être obtenu à pH acide et à pH neutre pour chaque érythrocyte, comme sur la **figure III.27(b)**.

Les rapport R d'intensité de PL mesurés sur une trentaine d'érythrocytes ($\approx 30$) présentent une distribution centrée autour de R $\approx$ 1,5 à pH physiologique de 7,5. En revanche, lorsque les érythrocytes sont exposés à un pH légèrement acide de 6, typique des micro-environnements tumoraux, la distribution du rapport se déplace vers des valeurs plus basses (R $\approx$ 1), comme illustré à la **figure III.27(c)**. Ceci démontre que notre capteur de pH ratiométrique bicolore reste fonctionnel même à l'intérieur d'érythrocytes, ce qui ouvre des possibilités intéressantes pour l'imagerie *in vivo*, en utilisant soit des érythrocytes, soit par exemple des vésicules extrudées plus petites [263].

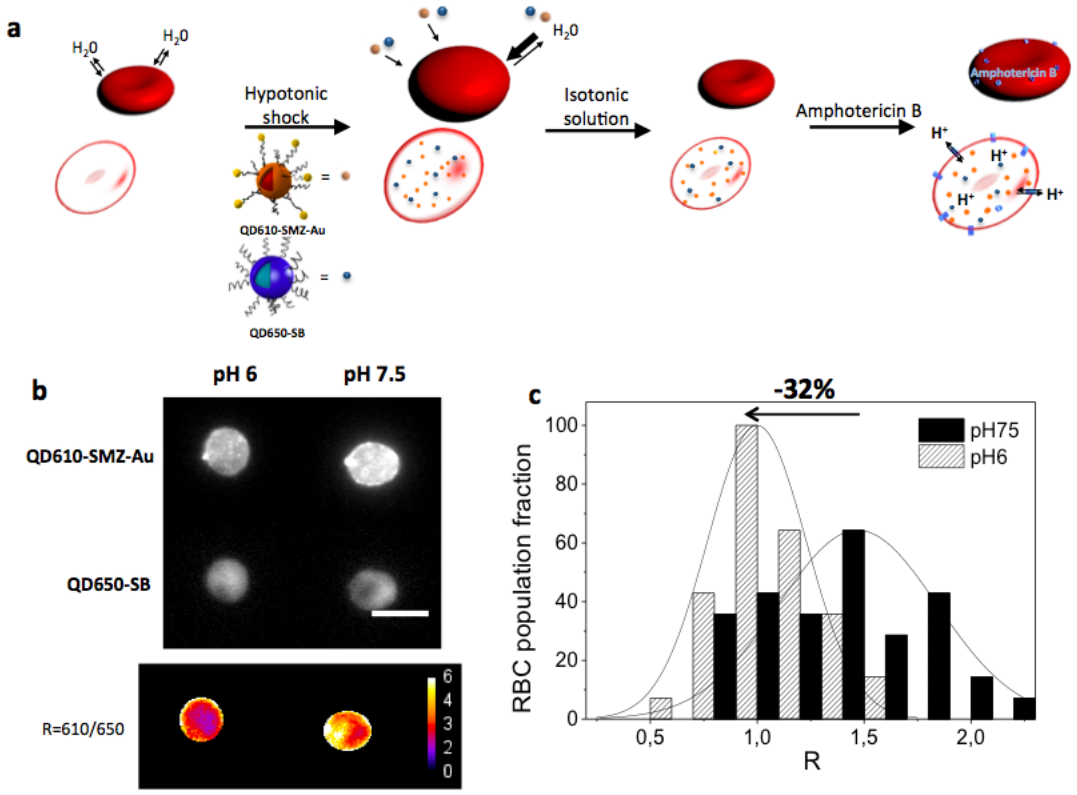



FIGURE III.27 – (a) Schéma montrant comment charger les deux populations de QD dans les érythrocytes : 1) choc hypotonique permettant aux QD de pénétrer à l'intérieur des érythrocytes puis 2) retour en solution isotonique pour que les érythrocytes retrouvent leur forme initiale puis 3) modification de leur membrane par ajout d'amphotericin B les rendant perméables au pH. (b) Images par fluorescence de 2 érythrocytes (à pH 6 et à pH 7,5) avec un détecteur à 610 nm afin de ne détecter que les QD610-SMZ-Au et un détecteur à 650 nm afin de ne détecter que les QD-SB. (c) Histogramme de distribution du ratio R d'intensité 610/650 d'une population d'érythrocytes à pH 7,5 (en noir) à pH 6 (en gris). La longueur d'onde d'excitation sélectionnée est $\lambda_{exc} = 400$ nm.

## III.3 Nano-sonde de pH dans l'infrarouge court : SWIR

Dans les nano-sondes que nous avons développées dans ce projet, la sensibilité au pH provient des modifications conformationnelles du polymère en fonction du pH et ne devrait pas dépendre de la nature spécifique des nanoparticules fluorescentes. De plus, l'extinction de fluorescence par des germes d'or est efficace sur une large gamme de longueurs d'onde. Cela devrait rendre cette stratégie applicable aux nanoparticules émettant dans d'autres régions spectrales. A titre d'exemple, dans cette partie, la même nano-sonde est développée avec des QD émettant, cette fois-ci, dans le domaine de l'infrarouge court (SWIR) : des PbS@CdS. Ce domaine spectral est particulièrement intéressant pour les futures applications d'imagerie *in vivo*, car il est possible d'obtenir une résolution spatiale au micromètre même jusqu'à plusieurs millimètres de profondeur dans les tissus [252].

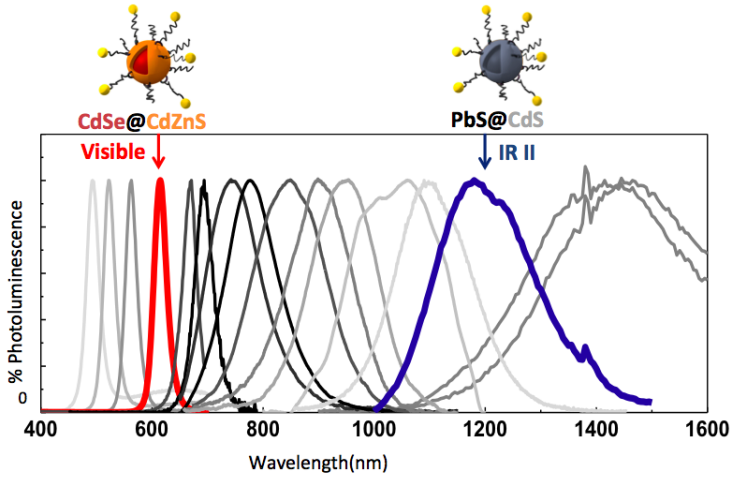



FIGURE III.28 – Courbes superposées de spectres de PL de différentes sythèses de QD. En rouge, QD CdSe@CdZnS émettant dans le visible utilisés dans la partie précédente. En bleu : QD PbS@CdS émettant dans l'infrarouge court II développés et utilisés dans la partie suivante.

### III.3.1 Synthèse de la nano-sonde SWIR

Avant même de synthétiser la nano-sonde, la première étape, ici, a été de synthétiser des QD dans le SWIR avec un rendement quantique le plus élevé possible. Pour cette partie, j'ai pu tester différentes synthèses de PbS en faisant varier les conditions expérimentales puis des synthèses de cœur/coque de PbS@CdS afin d'étudier la robustesse des nanoparticules et afin de comparer les rendements quantiques après formation de la coque, après transfert dans l'eau et après accroche du polymère.

La synthèse du cœur de PbS sélectionnée est celle de l'équipe de Hens *et al.* [107]. Une solution de précurseur de soufre oleylamine (S-OAm) est préparée puis injectée à une solution de chlorure de plomb ($PbCl_2$) initialement dissous dans de l'oleylamine. La réaction est très ra-

pide. Les QD sont ensuite précipités dans l'éthanol et resuspendus dans de l'hexane. Un exemple de spectres obtenus lors d'une synthèse de coeurs est présenté en **figure III.29**. Plus les QD de PbS grossissent lors de la synthèse plus la longueur d'onde d'émission est décalée vers les grandes longueurs d'ondes.

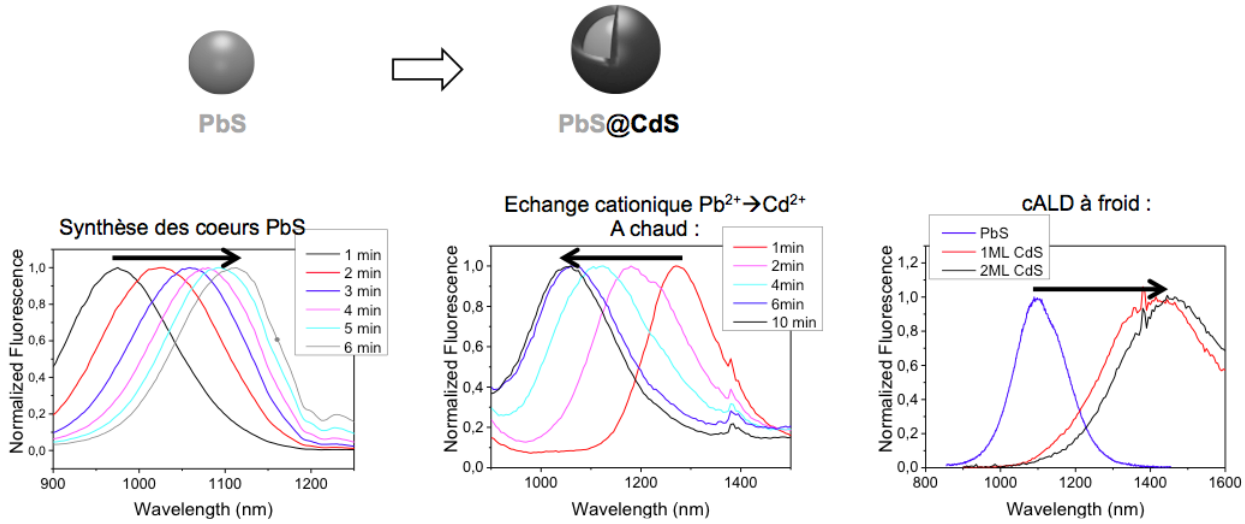



FIGURE III.29 – Spectres de PL lors de la synthèse des cœurs PbS, des cœur-coques PbS@CdS à chaud et à froid.

Pour la synthèse de la coque deux stratégies ont été étudiées : un échange cationique partiel à chaud [129,266,267] entre $Pb^{2+}$ et $Cd^{2+}$ et une synthèse à froid par déposition couche par couche de soufre $S^{2-}$ et de cadmium $Cd^{2+}$ appelée la cALD (colloïdal Atomic Layer Deposition) [130]. Ces deux synthèses sont détaillées en annexe. Les QD PbS@CdS sont des QD de type I, c'est à dire que la bande interdite du cœur est plus petite que celle de la coque : il y a donc une recombinaison électron-trou dans le cœur uniquement.
Lors de la synthèse du cœur, plus les QD grossissent plus un décalage de la fluorescence est observé vers les grandes longueurs d'onde car le confinement quantique diminue comme cela a été expliqué dans le chapitre I d'introduction de cette thèse. Ce phénomène est observé sur la **figure III.29**. En revanche, lors de la synthèse de la coque par un mécanisme d'échange cationique partiel, la particule conserve toujours la même taille mais il y a un échange entre les ions $Pb^{2+}$ remplacés par des $Cd^{2+}$ ce qui entraine une diminution de la taille du cœur et donc un décalage vers les plus basses longueurs d'onde.
Lors d'une synthèse de coque par cALD, tout d'abord une première monocouche de $S^{2-}$ est déposée ce qui augmente la taille du cœur de PbS, donc un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde est observé puis lors de l'ajout des couches suivantes : $Cd^{2+}$ puis $S^{2-}$ puis à nouveau $Cd^{2+}$... la taille du coeur reste fixe donc la longueur d'onde d'émission ne change plus. La **figure III.29** présente les spectres d'émission de PL lors des synthèses de coques avec

les mécanismes par échange cationique ou cALD. Les rendements quantiques obtenus à l'aide d'une sphère intégratrice et mesurés après chaque étape sont notés dans la table III.2.

TABLE III.2 – Rendement Quantique (QY) de fluorescence de QD synthétisés : les cœurs de PbS, les PbS@CdS avec une synthèse de la coque à froid (par cALD) et les PbS@CdS avec une synthèse de la coque à chaud (par échange cationique).

| | QY<br>Milieu organique | QY<br>dans l'eau |
|---|---|---|
| PbS | 55 ± 15% | - |
| PbS@CdS à froid | 10 ± 5% | 10 ± 15% |
| PbS@CdS à chaud | 35 ± 15% | 25 ± 15% |

La synthèse de PbS@CdS qui a été sélectionnée est celle ayant le plus grand rendement quantique, donc l'échange cationique à chaud pour la synthèse de la coque. Typiquement lors de cet échange, des cœurs de PbS sont précipités dans l'éthanol et resuspendus dans de l'octadecène puis ensuite injectés dans une solution contenant un précurseur de cadmium (l'oléate de cadmium) dans de l'acide oléique préalablement dégazé sous vide puis chauffé à 100°C sous argon. La réaction d'échange est très rapide et s'effectue en quelques minutes. La solution est ensuite refroidie et les cœurs/coques sont précipités dans l'éthanol puis repris dans l'hexane.

Des PbS@CdS émettant à 1100 nm ont été synthétisés (le protocole exact est en fourni en annexe). Le spectre de PL de ces particules, ainsi qu'une image TEM et leur distribution en taille se trouvent sur la **figure III.30**.

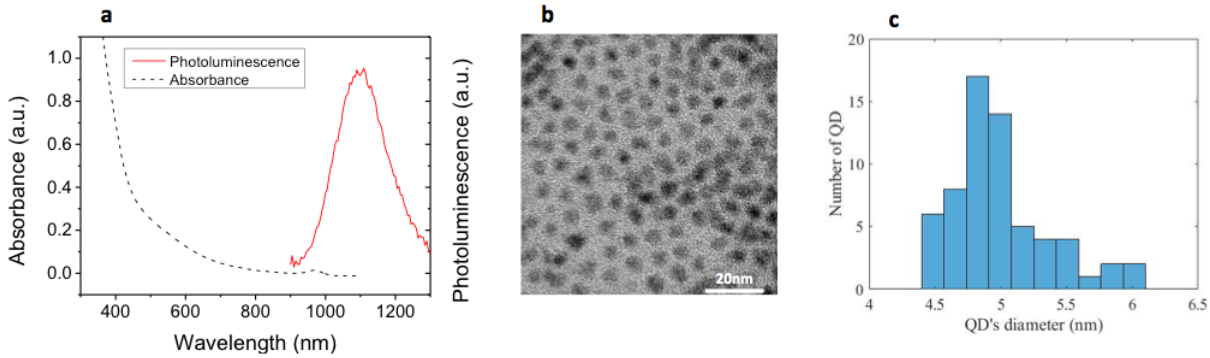



FIGURE III.30 – (a) Spectre d'absorption et de PL des QD SWIR dans l'hexane. (b) Microscopie TEM des QD SWIR. (c) Distribution en taille.

Ces QD sont plus petits que les QD visibles utilisés précédemment (diamètre ≈ 5 nm). Le polymère sélectionné cette fois-ci est le $pSMZ_{12}/LA_3$ car expérimentalement il a été observé qu'avec le polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$, la distance entre les particules est trop grande pour qu'il y ait un transfert d'énergie efficace. Ce polymère est accroché à la surface des QD après transfert

dans l'eau avec le MPA puis échange de ligands (déjà expliqué précédemment). Le meilleur ratio AuG/QD a été déterminé à 4/1.

### III.3.2 Sensibilité au pH et réversibilité

Cette nouvelle nano-sonde de pH dans l'infrarouge II a été étudiée *in vitro* en solution aqueuse de salinité [NaCl]= 150 mM. Comme le montre la **figure III.31(a)**, le signal de pho-

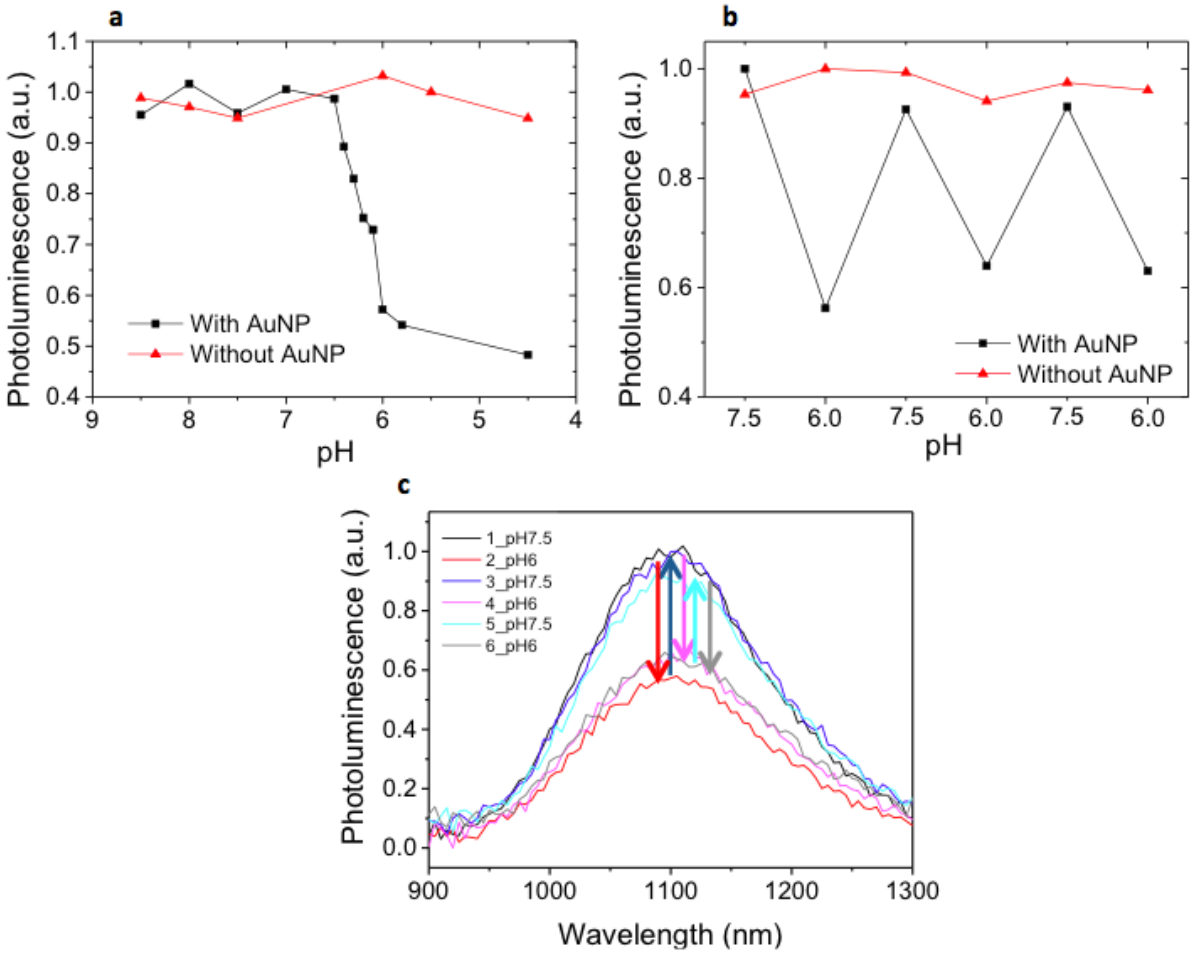



FIGURE III.31 – (a) Dépendance en fonction du pH de l'intensité de PL de la nano-sonde (avec AuG) et de QD IR-SMZ (sans AuG). (b) Réversibilité sur 3 cycles de pH entre 7,5 et 6. (c) Spectres d'émission de photoluminescence (PL) de la nano-sonde lors des 3 cyles de variations de pH. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

toluminescence à 1100 nm de ces nano-sondes est fortement dépendant du pH. Une diminution de l'intensité de PL de 50% est observée entre un pH de 7 et de 6 en présence d'AuG accrochés au QDIR-SMZ alors qu'en absence d'or la PL reste constante entre un pH de 8,5 et 4,5. Cela démontre que la sensibilité au pH de QDIR-SMZ-Au provient encore une fois de la distance contrôlée entre les AuG et le QD central, ce qui autorise plus ou moins de transfert d'énergie modulant donc la cinétique de désexcitation non radiative du QD. Comme pour la nano-sonde

visible, cette nano-sonde dans l'IR est bien sensible au pH et la réversibilité est toujours observée. La **figure III.31(b)** et **(c)** montre une réversibilité sur 3 cycles de variations de pH entre 7,5 et 6.

### III.3.3 Mesures ratiométriques

Nous avons ensuite préparé un mélange de deux populations de QDSWIR, PbS@CdS : les QD1100-SMZ/Au sensibles au pH et des QD1250-SB émettant à 1250 nm et recouverts d'un polymère sulfobétaine insensible au pH afin de pouvoir fournir un signal de référence. *In vitro*, l'intensité de PL de la population QD1100-SMZ/Au diminue d'environ 50 % lorsque le pH passe de 7,5 à 5,5 alors que l'intensité de PL des QD1250-SB reste quasiment constant, comme le montre la figure III.32(a). Ceci permet d'obtenir un signal ratiométrique du pH de l'environnement comme il peut être observé sur la **figure III.32(b)**.

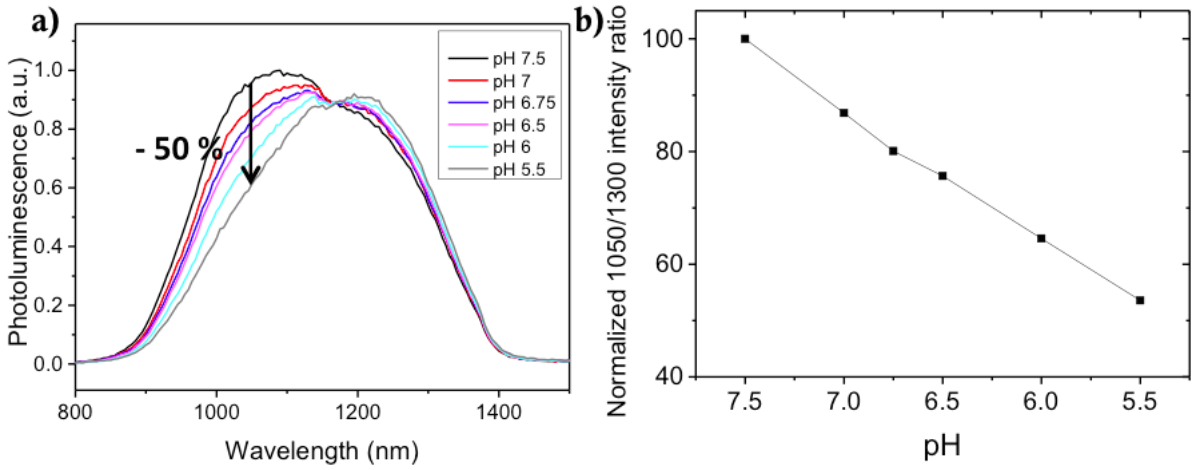



FIGURE III.32 – (a) Spectres de PL normalisés du mélange ratiométrique de QD1100-SMZ/Au et de QD1250-SB en fonction du pH. (b) Ratio d'intensité normalisé entre 1050 nm et de 1300 nm en fonction du pH. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

Par la suite, nous avons incorporé ces deux populations de QD dans des érythrocytes lavés, de la même façon qu'avec les QD visibles, expliqué précedemment. Les érythrocytes sont ensuite rendus perméables au pH grâce à l'amphotéricin B. Cette fois-ci, comme les QD émettent dans le SWIR, il est possible de mesurer leur spectre de fluorescence à travers les érythrocytes. En effet, nous n'avons pas pu faire d'imagerie en microscopie de fluorescence car nous ne possédons pas de détecteur dans le SWIR au laboratoire.

Les spectres de PL des érythrocytes chargés avec les QD sont présentés en **figure III.33**, à pH = 7,5 puis à pH = 5,5. Nous pouvons observer que le rapport d'intensité 1100/1250 diminue de 40% entre les deux pH, ce qui est similaire à leur comportement *in vitro*.

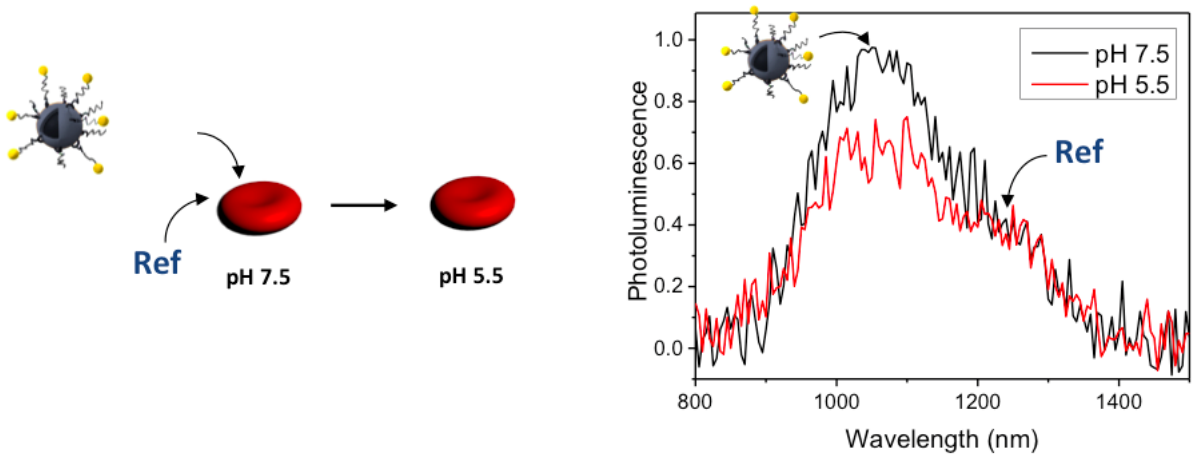



FIGURE III.33 – Spectre de PL des érythrocytes chargés avec des QD1100-SMZ/Au et des QD1250-SB, à pH 7,5 puis à pH 5,5.

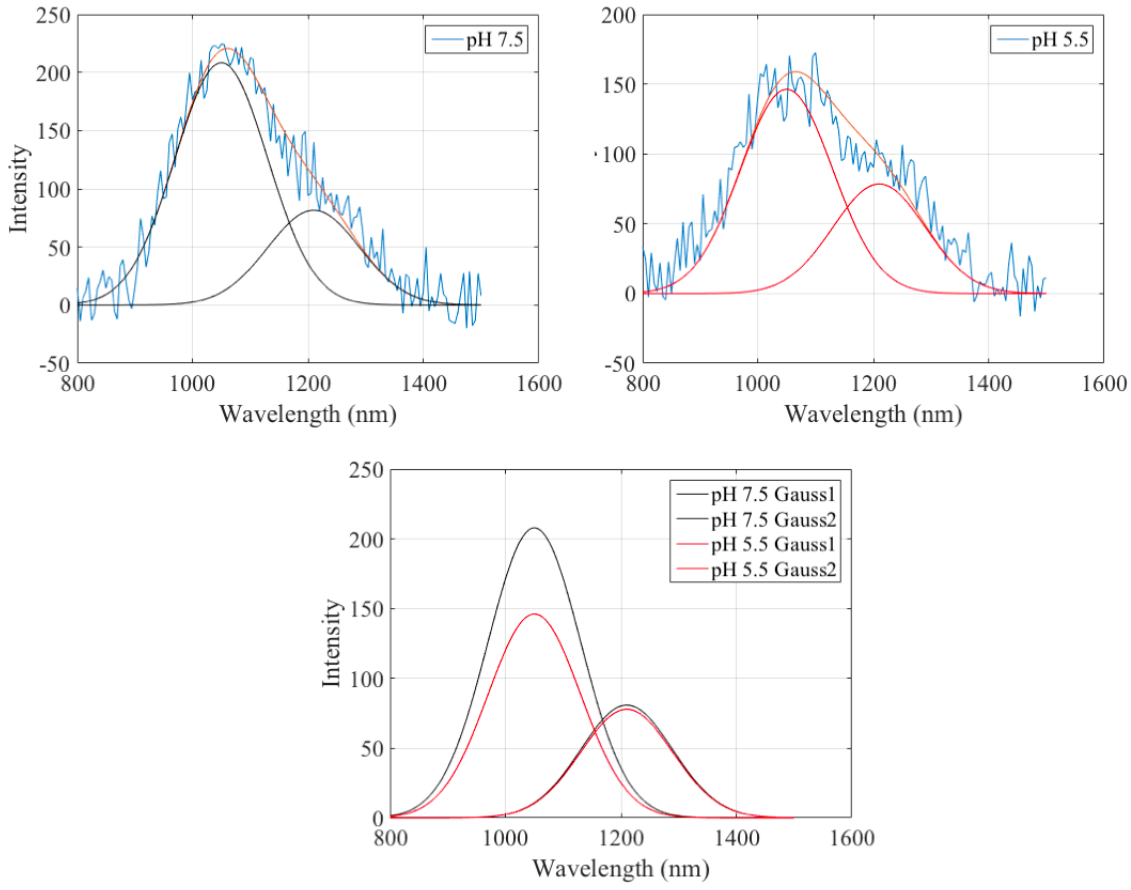



FIGURE III.34 – Déconvolution en gaussienne des spectres de PL des QD à l'intérieur des érythrocytes, obtenus à pH 7,5 et à pH 5,5. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

Pour que les résultats soient bien confirmés, j'ai effectué une déconvolution en deux gaussiennes (une pour chaque population de QD) de chaque signal de PL à pH 7,5 (en noir) et 5,5 (en rouge), comme représenté sur la **figure III.34**. En comparant ensuite les gaussiennes à pH 7,5 et à 5,5, il peut être confirmé que la PL de la population de QD1250 n'est pas modifiée en fonction du pH et qu'il y a ≈ 40% de déclin de PL pour la population de QD1100-SMZ/Au. Par conséquent, les mesures ratiométriques fonctionnent à la fois en *in vitro* et *ex vivo* même avec les QD SWIR.

Par la suite, il est intéressant de comparer tous les résultats obtenus expérimentalement avec ceux obtenus avec la théorie du NSET qui seront détaillés dans la suite. Ceci va nous permettre notamment de comprendre pourquoi il a été nécessaire d'accrocher un polymère de plus petite taille sur les QD SWIR que sur les QD visibles mais aussi pourquoi le nombre d'AuG par QD a été fixé à 4 ou 5 et enfin, d'avoir une estimation des tailles des deux polymères à la fois à pH neutre et à pH acide.

## III.4 Comparaison entre la théorie et l'expérience

Afin de voir si ces résultats sont cohérents avec la théorie, j'ai pu tracer les courbes d'efficacité de transfert d'énergie par NSET ($E_{NSET}$) pour notre système dont les équations (déjà expliquées dans le chapitre I) se trouvent en IV.1. Le $d_0$ correspond à la distance caractéristique où l'efficacité du transfert vaut 0,5. Cette distance caractéristique se calcule à l'aide de l'équation III.2, avec $\alpha$ le facteur d'orientation du donneur vers le plasmon du métal, $\lambda$ la longueur d'onde d'émission maximale du donneur, $n_m$ l'indice de réfraction du solvant, $n_r$ l'indice de réfraction du métal, $\phi_D$ le rendement quantique, $\epsilon_1$ la constante diélectrique du solvant et $\epsilon_2$ la fonction complexe diélectrique du métal. La grandeur $A$ correspond à l'absorbance des particules d'or et est définie en équation III.3, $\epsilon_\lambda$ est le coefficient d'extinction molaire des AuNPs à la longueur d'onde d'émission du donneur, $\delta_{skin}$ représente l'épaisseur de peau, $N_A$ est le nombre d'Avogadro, $r$ le rayon des AuNPs en centimètre et $V$ le volume de la particule en $cm^3$.

$$E_{NSET} = \frac{N}{N + \left(\frac{d}{d_0}\right)^4} = \frac{1}{1 + \left(\frac{d}{d_0.N^{1/4}}\right)^4} \tag{III.1}$$

$$d_0 = \frac{\alpha\lambda}{n_m}(A\phi_D)^{1/4}\left(\frac{n_r}{2n_m}\left(1 + \frac{{\epsilon_1}^2}{|\epsilon_2|^2}\right)\right)^{1/4} \tag{III.2}$$

$$A_{NP} = 10^3 ln(10)\left(\frac{\epsilon_\lambda 4r^2}{N_A V \delta_{skin}}\right) \tag{III.3}$$

Ces équations permettent de déterminer la distance caractéristique : $d_0$ de chaque système, les valeurs obtenues sont les suivantes avec comme accepteur, à chaque fois les germes d'or de

2 nm de diamètre (r = 1 nm ; $\epsilon_{610}$=1,87.10$^5$ M$^{-1}$cm$^{-1}$ et $\epsilon_{1100}$=1,3.10$^4$ M$^{-1}$cm$^{-1}$) et comme donneur soit les QD visibles CdSe@CdS/ZnS soit les QD SWIR PbS@CdS :

- avec les CdSe@CdS/ZnS ($\lambda_{Em}$ = 610 nm ; QY = 0,3 ; $\epsilon_1$ = 1.76 ; $n_m$ = 1.33 ; $n_r$ = 0.226) : $d_0$ = 4,7 nm
- avec les PbS@CdS ($\lambda_{Em}$ = 1100 nm ; QY = 0,05 ; $\epsilon_1$ = 1.76 ; $n_m$ = 1.32 ; $n_r$ = 0.28) : $d_0$ = 3,0 nm.

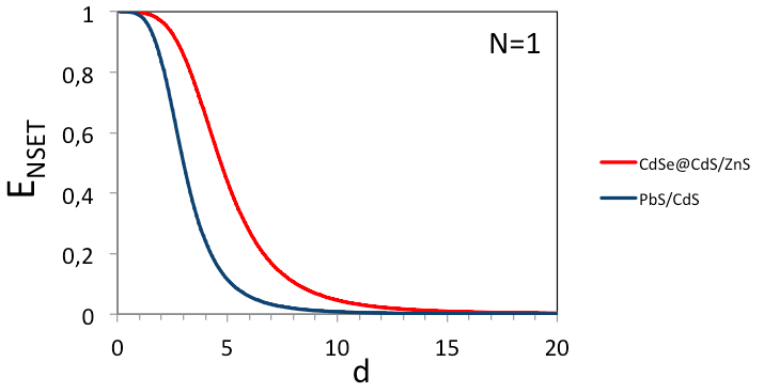



FIGURE III.35 – Courbe représentant l'efficacité de transfert d'énergie entre un donneur (ici : un QD soit visible soit SWIR) et un accepteur (ici : AuG). Ces courbes sont tracées avec N = #AuNP/QD = 1.

Grâce à ces valeurs de $d_0$ pour chaque système (ici chaque type de QD) il est possible de tracer la courbe d'efficacité de transfert d'énergie en fonction du nombre de particules d'or. Il est à noter que plus $d_0$ est grand plus le transfert d'énergie est important, *i.e.* qu'il a lieu à une distance plus grande. Le transfert d'énergie est donc plus important avec le système QD visible + AuG ($d_0$ = 4,7) plutôt qu'avec le système QDSWIR + AuG ($d_0$ = 3,0). Ceci est observé sur la **figure III.35** avec N=1. Grâce à la théorie, nous comprenons ici pourquoi il a été nécessaire expérimentalement d'accrocher un polymère plus long sur les QD visibles que sur les QD SWIR. Avec un polymère trop court sur les QD visibles le transfert d'énergie serait trop efficace à pH neutre et avec un polymère trop long sur les QD SWIR il n'y aurait pas assez de transfert d'énergie à pH neutre et acide.

Ces valeurs de $d_0$ permettent de tracer les courbes d'efficacité de transfert d'énergie par NSET en fonction du nombre N = #AuNP/QD, représentées en **figure III.36**.

Les systèmes qui ont été sélectionnés dans ce projet sont les suivants :

- CdSe@CdS/ZnS (de rayon 3,5 nm) avec le polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$ et N = 5 ;
- PbS/CdS (de rayon 2,5 nm) avec le polymère $pSMZ_{12}/LA_3$ et N = 4.

Pour le premier système, expérimentalement, il a été remarqué qu'avec le polymère $pSMZ_{12}/LA_3$ il y avait un transfert d'énergie trop rapide (pour un N très faible), observable sur la **figure III.37(a)** donc le polymère plus grand : $pSMZ_{65}/LA_{15}$ avait été sélectionné. De plus le nombre de 5 particules d'AuG (en moyenne) par QD a été sélectionné car cela correspond à

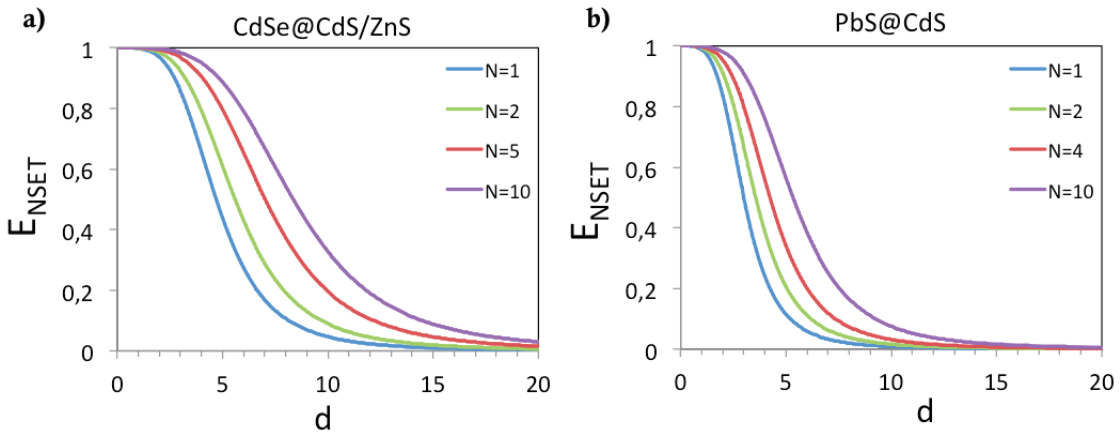



FIGURE III.36 – Courbe représentant l'efficacité de transfert d'énergie entre QD en (a) CdSe@CdS/ZnS et en (b) PbS@CdS) et AuG, en fonction de N = #AuNP/QD. La distance d est en nm.

un transfert d'énergie initial de 50% (à pH neutre). Ces résultats expérimentaux sont présentés en **figure III.37(b)**, avec en ordonnée soit $PL/PL_0$ soit $\tau/\tau_0$ (0 signifie en absence de AuG). Un rappel de l'efficacité de transfert d'énergie est présenté en équation III.4.

$$E_{\text{NSET}} = 1 - \frac{PL}{PL_0} \qquad \text{ou alors} \qquad E_{\text{NSET}} = 1 - \frac{\tau}{\tau_0} \tag{III.4}$$

Pour chaque polymère, lors d'ajout croissant de particules d'or (*i.e.* N croissant), il est possible de mesurer expérimentalement le transfert d'énergie à pH neutre. Ce transfert d'énergie peut être évalué avec la PL (points rouges) mais aussi avec l'intensité de PL résolue en temps ou le temps de vie, noté TDV (points noirs). A l'aide de l'équation IV.1 et en connaissant $d_0$, un ajustement des courbes est présenté en trait plein rouge ou noir respectivement pour le TDV ou la PL, permet d'estimer la distance $d$ moyenne entre un QD visible et un AuG ($d = r_{QD} + r_{polymre}$ avec $r_{QD}$ le rayon d'un QD et $r_{polymre}$ la taille d'un polymère). Ces distances sont présentées dans la table III.3.

TABLE III.3 – Résultats obtenus à l'aide de mesures expérimentales ajustés avec le modèle théorique de NSET afin d'estimer les distance $d$ (en nm), qui correspond à la distance entre le centre du QD et la surface des AuG.

| | QD visible $pSMZ_{12}/LA_3$ | **QD visible $\mathbf{pSMZ_{65}/LA_{15}}$** |
|---|---|---|
| Fit NSET (TDV) | d = 4,6 ± 0,5 | **d = 7,6 ± 1,7** |
| Fit NSET (PL) | d = 3,6 ± 0,5 | **d = 6,1 ± 1,6** |
| Résultats de la DLS | $R_h$ = 6,8 ± 0,4 | $R_h$ = 9,5 ± 0,5 |
| | **QD SWIR $\mathbf{pSMZ_{12}/LA_3}$** | QD SWIR $pSMZ_{65}/LA_{15}$ |
| Fit NSET (PL) | **d = 4,1 ± 0,6** | d = 6,9 ± 1,6 |

Pour le second système, avec les PbS/CdS il a été observé expérimentalement, qu'avec le

polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$, il n'y avait pas assez de transfert d'énergie (même pour un N grand $> 20$), observé sur la **figure III.37(d)**, c'est pourquoi nous avons sélectionné le polymère plus petit $pSMZ_{12}/LA_3$. Le nombre de N = 4 AuG/QD correspond à un transfert d'énergie initial de 50% (à pH neutre). Ces résultats expérimentaux se trouvent en **figure III.37(c)**. Avec ces QD, nous n'avons pas pu mesurer d'intensité de PL résolu en temps car le temps de vie des QD SWIR est très grand et nous n'avons pas le système optique adapté au sein de notre laboratoire. De la même façon qu'avec les QD visibles, il a été possible d'estimer, à l'aide d'ajustement, la distance $d$ moyenne entre un QD SWIR et un AuG, dans la table III.3.

Deux observations peuvent être faites à l'aide de ces résultats. La première est que les valeurs de $d$ semblent cohérentes avec la taille des QD : en effet, avec le même polymère, à chaque fois, il est possible de noter une diminution d'environ 1 nm entre les QD visibles et les QD

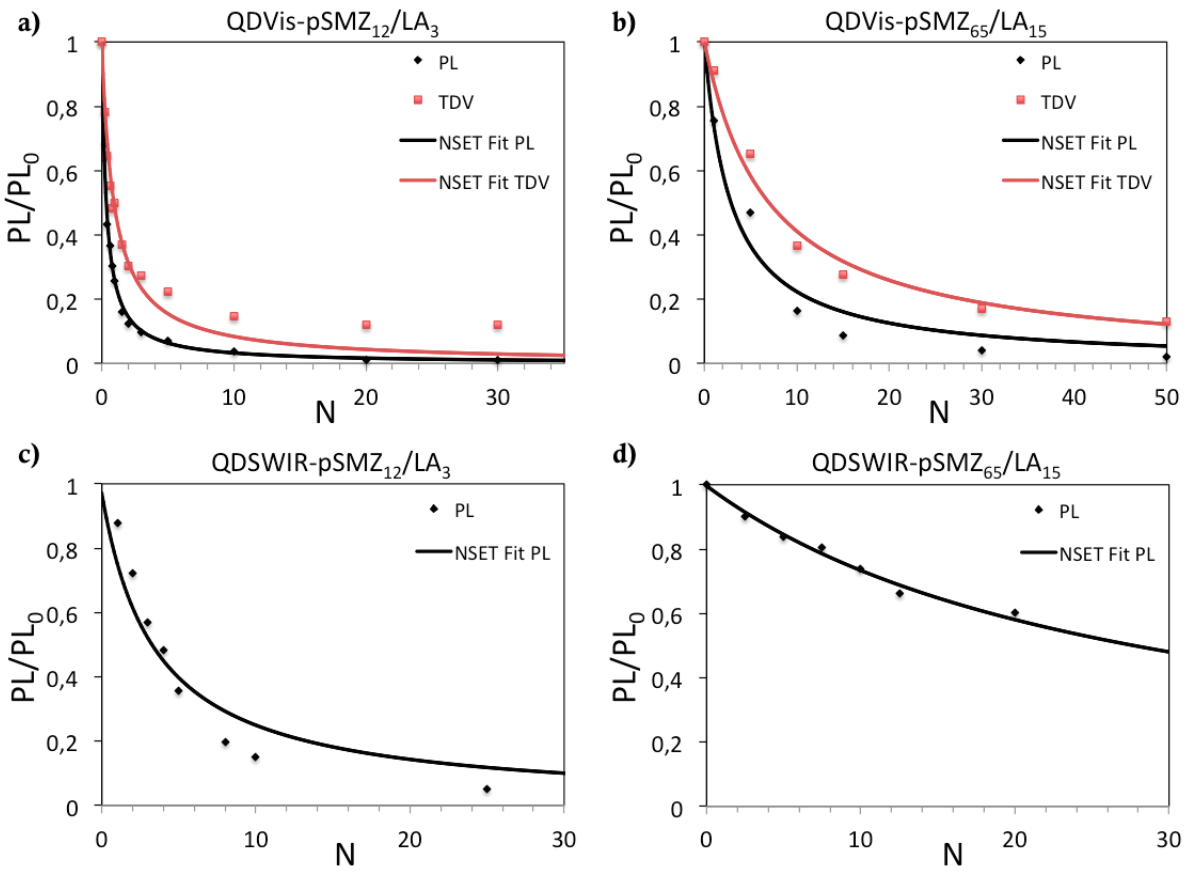



FIGURE III.37 – Courbes représentant 1-$E_{NSET}$ entre QD et N = AuG/QD. Les points noirs sont les résultats expérimentaux mesurés par PL. Les points rouges sont les résultats expérimentaux mesurés par TDV. Les courbes en traits pleins représentent des modélisations effectuées à l'aide de l'équation III.4 et les $d_0$ connues (soit 4,7 pour QDSWIR soit 3,0 nm pour QDvis). (a) QD CdSe@CdS/ZnS avec le polymère $pSMZ_{12}/LA_3$. (b) QD CdSe@CdS/ZnS avec le polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$. (c) QD PbS/CdS avec le polymère $pSMZ_{12}/LA_3$. (d) QD PbS/CdS avec le polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

SWIR. Ceci est cohérent avec les images TEM qui montrent un rayon moyen de 3,5 nm pour les QD visibles et de 2,5 nm pour les QD SWIR. La deuxième observation est qu'à chaque fois la différence de taille entre les polymères $pSMZ_{65}/LA_{15}$ et le $pSMZ_{12}/LA_3$ semble être de 3 nm, ce qui est cohérent avec les mesures de rayon hydrodynamique de ces systèmes en DLS.

Par ailleurs, une fois le nano-objet assemblé, en modifiant le pH de 7,5 à 5,5 nous avons aussi observé 50% supplémentaire de transfert d'énergie, que ce soit avec le système : QDvisible-$pSMZ_{65}/LA_{15}$-5AuG ou avec QDSWIR-$pSMZ_{12}/LA_3$-4AuG. Comme il y avait initialement déjà 50% de transfert d'énergie lors de l'assemblage de la sonde, le changement de pH permet, en fait, de passer de $E_{FRET} = 0{,}5$ à $E_{FRET} = 0{,}75$. Sur la **figure III.38** se trouvent les courbes théoriques de transfert d'énergie de nos deux systèmes avec les $d_0$ adéquat pour N =5 et N =4 respectivement pour les QD visibles et les QD SWIR. Grâce à ces courbes, on observe que le passage de 50% à 75% de transfert d'énergie permet d'obtenir les distances entre le centre du QD et la surface des particules d'or à la fois pour pH = 7,5 et pour pH = 5,5, noté respectivement $d_{7,5}$ et $d_{5,5}$. Les résultats de cette analyse théorique sont présentés dans la table III.4.

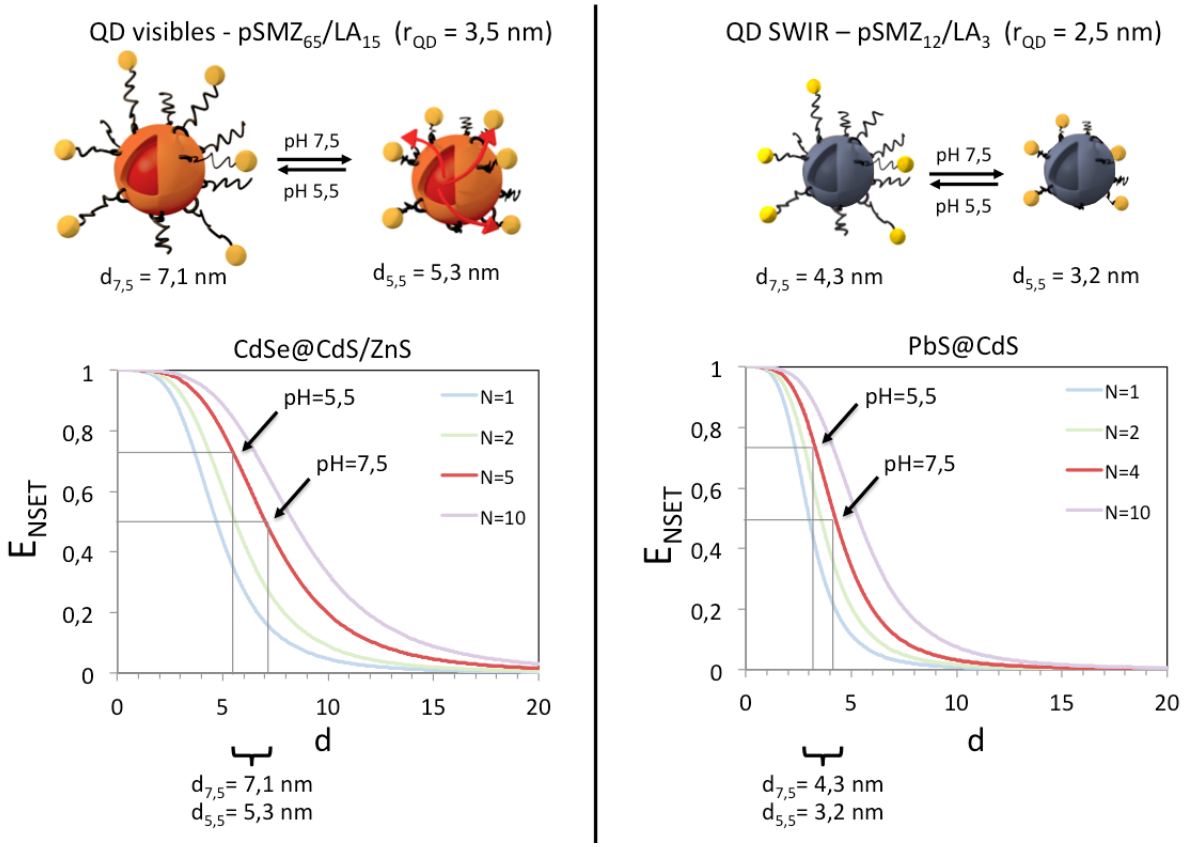



FIGURE III.38 – Schéma des résultats théoriques des transferts d'énergie pour les deux systèmes : QDvisible-$pSMZ_{65}/LA_{15}$-5AuG à gauche et QDSWIR-$pSMZ_{12}/LA_3$-4AuG à droite.

Table III.4 – Résultats des distances $d$ (en nm) obtenues théoriquement à pH 7,5 et pH 5,5.

| | QD visibles $pSMZ_{65}/LA_{15}$ | QD SWIR $pSMZ_{12}/LA_3$ |
|---|---|---|
| pH 7,5 | d = 7,1 | d = 4,3 |
| pH 5,5 | d = 5,3 | d = 3,2 |

De plus, la différence de distance théorique entre pH 7,5 et 5,5 permet de noter que le polymère $pSMZ_{65}/LA_{15}$ a une taille qui diminue de 2 nm lors du changement de pH alors que la taille du polymère $pSMZ_{12}/LA_3$ ne diminue que de 1 nm. Ces résultats théoriques sont en accord avec les observations faites en DLS présentées dans la **figure III.15**.

Bien que les résultats expérimentaux semblent cohérents avec la théorie du NSET, il est, toutefois, important de noter que les valeurs des différentes distances $d$ obtenus ne sont que des estimations car nos nano-objets restent des systèmes très complexes : tous les AuG ne sont pas exactement à la même distance des QD, de plus il n'y a pas une monodispersité parfaite des AuG ni des QD et enfin le nombre de particules d'or par nano-objet n'est qu'une moyenne.

## Conclusion du chapitre III

En résumé, dans ce chapitre, j'ai proposé une nouvelle stratégie de conception de nano-sondes à base de QD sensibles à leur environnement, basée sur des modifications conformationnelles réversibles des ligands polymères accrochés à la surface de la nanoparticule. Ces nano-sondes se composent de QD émettant soit dans le domaine visible soit dans l'infrarouge court recouvert par des copolymères sensibles au pH et conjugués à des nanoparticules d'or de très petites tailles (des germes AuG de 2 nm). Il peut y avoir un transfert d'énergie entre le QD et les AuG si ceux-ci sont proches spatialement. Ce transfert d'énergie, certainement de type NSET, entraine l'augmentation de la cinétique de désexcitation non radiative des QD et diminue son intensité de photoluminescence. Une variation de pH de la solution entraine un changement de conformation du ligand polymère, ce qui modifie la distance entre les nanoparticules d'or et le QD. Cela entraine une modulation réversible de la photoluminescence des QD. Ces changements de PL se produisent entre un pH physiologique (7,5) et un pH légèrement plus acide (5,5-6), qui est comparable au pH dans les endosomes, les micro-environnements tumoraux ou les tissus inflammés.

Dans ce projet, il a été démontré que ces sondes permettent des mesures ratiométriques du pH, soit en réalisant des spectres d'intensité de PL résolue en temps soit en utilisant une autre population de QD de référence insensibles au pH. Cette nano-sonde peut être développée pour différentes nanoparticules émettant à des longueurs d'onde variées. Par ailleurs, le changement

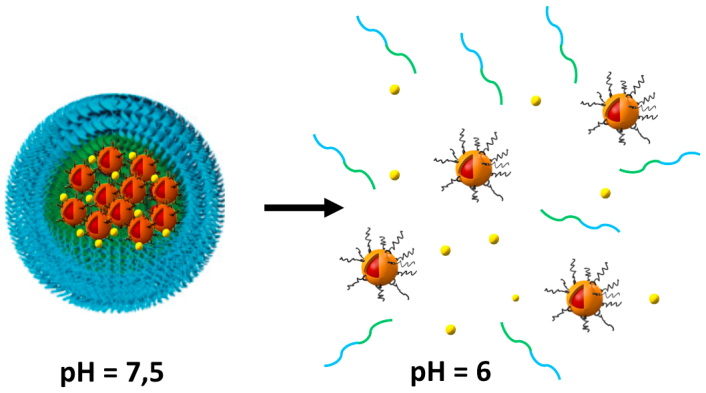
de conformation du polymère dépend de la composition de ce dernier, de sa longueur et aussi de la salinité de la solution. De plus, même après l'intégration de ces nano-sondes dans des érythrocytes, la sensibilité au pH est toujours fonctionnelle ce qui ouvre la voie à l'utilisation de ces sondes en imagerie *in vivo*.

Chapitre IV

# Auto-assemblage de micelles sensibles au pH pour la détection de tumeurs solides

**Résumé du chapitre**

Ce nouveau projet porte sur l'assemblage de micelles sensibles au pH pour détecter des tumeurs solides par fluorescence. Le principe est de former des micelles à l'aide de polymères contenant un premier bloc de zwitterion sulfobétaine (SB) hydrophile permettant la stabilisation et la furtivité et un bloc de diisopropylamide (DPA), hydrophobe à pH physiologique et hydrophile à pH $< 6{,}5$. Ces micelles peuvent encapsuler des nanoparticules fluorescentes (des QD) initialement totalement éteintes grâce à des transferts d'énergie non radiatifs en présence d'accepteurs (des AuNP). L'objectif est que les micelles circulent jusqu'à leur cible, puis, en présence d'un milieu plus acide, qu'elles se dissocient pour libérer les QD dont la fluorescence serait alors totalement retrouvée, ce qui permettrait alors de localiser les milieux tumoraux.



## Sommaire

**IV.1 Échange de ligands sensibles au pH sur les NP . . . . . 138**
IV.1.1 Synthèse des polymères pDPA et pDPA/LA sensibles au pH . . . . . 138
IV.1.2 Caractérisations des polymères sensibles au pH . . . . . 140
IV.1.3 Échange de ligands sur des AuNP sphériques . . . . . 142
IV.1.4 Échange de ligands sur des QD visibles et SWIR . . . . . 143
**IV.2 Micelles de copolymère pDPA-b-SB sensibles au pH . . . . . 145**
IV.2.1 Synthèse des copolymères surfactants pDPA-b-SB . . . . . 145
IV.2.2 Caractérisations des polymères surfactants pDPA-b-SB . . . . . 147
IV.2.3 Analyse des micelles avec du pyrène . . . . . 150
IV.2.4 Analyses des micelles par DLS . . . . . 154
**IV.3 Auto-assemblage des micelles autour des NP-pDPA/LA . . . . . 155**
IV.3.1 Micelles encapsulant les AuG-pDPA/LA . . . . . 155
IV.3.2 Micelles encapsulant les QD-pDPA/LA . . . . . 156
IV.3.3 Micelles encapsulant les AuNP-pDPA/LA et les QD-pDPA/LA . . . . 157
**IV.4 Micelles fluorescentes sensibles au pH . . . . . 157**
IV.4.1 Influence de la présence du surfactant pH-labile . . . . . 158
IV.4.2 Influence de la quantité du surfactant pH-labile . . . . . 160
IV.4.3 Influence de la taille du polymère surfactant pH-labile . . . . . 160
IV.4.4 Influence de la taille et de la quantité des AuNP . . . . . 161
IV.4.5 Résultats préliminaires avec des sondes visibles et SWIR en mesures ratiométriques . . . . . 165

# Introduction et objectifs du projet

## Présentation du projet

Dans ce projet, contrairement au chapitre III de cette thèse, nous souhaitons développer des nano-objets qui seraient totalement éteints en milieu physiologique (pH 7,3) et qui deviendraient fortement fluorescents en milieu légèrement acide (pH=6). Pour cela un nouveau polymère sensible au pH a été utilisé. Celui-ci se compose de diisopropylamide (DPA) qui possède une amine tertiaire soit protonée et hydrophile car chargée positivement, soit déprotonée, alors neutre et hydrophobe. Des polymères pDPA/LA ont été synthétisés afin de pouvoir accrocher ce polymère à la surface des NP.

Avec ces nouveaux polymères, la première idée a été de réaliser exactement la même nanosonde que dans le chapitre précédent afin d'avoir une sonde cette fois-ci plus brillante à pH acide qu'à pH basique. L'idée était donc d'attacher le polymère pDPA/LA sur des QD visibles (CdSe@CdS/ZnS) puis ensuite d'accrocher les particules d'or de façon covalente sur les QD via le polymère. Ces expériences ont été faites mais ne sont pas présentées dans ce manuscrit car aucune réversibilité n'a été obtenue. En effet, avec le polymères pDPA/LA, contrairement au polymère pSMZ/LA, le changement de conformation du polymère qui passe d'un état hydrophile à hydrophobe est très brutal, il s'effectue sur $\approx$ 0,2 unité pH, ce qui entraîne directement la précipitation du polymère, et s'il est accroché à la surface des QD, une agrégation des NP. Avec le pSMZ/LA, on note une diminution en taille du polymère sur les QD lors de la diminution en pH, puis seulement en dessous de pH = 5, l'agrégation des particules était observée.

Par ailleurs, l'accroche par liaisons covalentes entre des QD et les AuNP est une technique élégante qui permet d'observer que le transfert d'énergie augmente lorsque le polymère change de conformation, cependant nous avons observé que l'efficacité de transfert d'énergie n'est pas optimal car nous n'avons pu obtenir plus de 50% d'extinction de fluorescence. Effectivement, il y a principalement deux inconvénients à accrocher des AuNP sur des QD par liaisons covalentes :

- la présence d'un transfert d'énergie non nul même lorsque le polymère est totalement déplié car les AuNP sont initialement relativement proches des QD,
- une chimie de surface qui est chargée à pH physiologique et pourrait donc entraîner des adsorptions non spécifiques, c'est pourquoi nous avions injecté les nanoparticules dans des érythrocytes.

Ici l'objectif est de créer des nano-sondes qui s'allument en pH acide tout en améliorant l'amplitude de la modulation d'intensité de fluorescence en fonction du pH et également, en utilisant une chimie de surface zwitterionique pour augmenter la stabilité et la furtivité, comme expliqué dans le chapitre II de cette thèse.

Pour cela, nous avons pensé le projet suivant : créer des micelles zwitterioniques très furtives à base de polymères diblocs : pDPA-b-SB avec du diisopropylamide et du sulfobétaïne,

permettant une encapsulation des QD et des AuNP recouverts de polymères pDPA/LA. A pH physiologique le DPA est hydrophobe permettant la formation des micelles encapsulant les QD et AuNP ayant des surface également hydrophobes. Les particules sont alors très proches spatialement entrainant un fort transfert d'énergie, inhibant la fluorescence des QD. Puis, en présence d'un milieu plus acide, tels que les milieux extracellulaires tumoraux, les micelles se dissolvent, libérant les particules qui s'éloignent entre elles et la fluorescence initiale des QD est alors totalement retrouvée.

### Les micelles de polymères pour l'imagerie et la thérapie

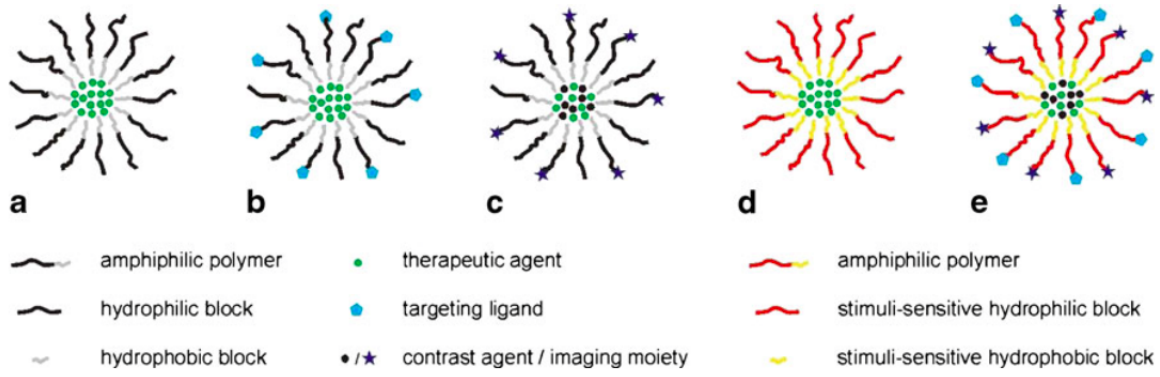



Figure IV.1 – (a) Représentation schématique de micelle à base de polymère. (b) Micelle conjuguée à un ligand de ciblage. (c) Micelle contenant un agent de contraste. (d) Micelle pour la libération contrôlée de médicaments. (e) Micelle sensible soit à un stimulus externe. Cette figure est extraite de [268].

Les nano-micelles à base de polymères sont des particules colloïdales d'une taille d'environ 5 à 100 nm et sont très étudiées pour le "drug delivery" en recherche scientifique. Celles-ci sont constituées de polymères amphiphiles qui peuvent s'auto-assembler et sont souvent conçues pour l'administration contrôlée de médicaments hydrophobes. Grâce à la conception soignée de l'équilibre hydrophobe / hydrophile du polymère, la taille et la morphologie des micelles assemblées peuvent être contrôlées. Le cœur des micelles est hydrophobe et peut être utilisé pour encapsuler des médicaments peu solubles dans l'eau, tandis que la surface extérieure est suffisamment polaire pour permettre la stabilisation des micelles en solution aqueuse. Le PEG (poly(éthylène glycol)) est la partie hydrophile la plus communément utilisée [269] pour toutes les raisons déjà expliquées précédemment dans cette thèse : il est soluble dans l'eau, fortement hydraté, permet une bonne répulsion stérique, il est biocompatible et faiblement toxique [270–272].
L'utilisation de copolymères à blocs amphiphiles a permis de réduire la concentration micellaire critique (CMC) car ils augmentent la stabilité des micelles par rapport à celles habituellement formées avec des tensioactifs [268]. A ce jour, de nombreuses formulations de micelles sont en phase d'essai clinique pour des applications thérapeutiques et certaines d'entre elles ont même été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) pour leur mises sur le marché [273].

Dans le domaine de la recherche contre le cancer, nous pouvons citer par exemple, le Genexol®, qui est en cours d'évaluation clinique pour une utilisation chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

Beaucoup d'équipes de recherche essaient d'améliorer la biodistribution de médicaments à l'aide de micelles. Par exemple, des ligands de ciblage peuvent être attachés aux micelles qui pourraient reconnaitre et se lier spécifiquement aux récepteurs surexprimés dans les cellules tumorales. L'incorporation d'agents d'imagerie est aussi une technique développée afin de suivre des micelles *in vivo* pour des études de biodistribution, **figure IV.1**. De plus, les copolymères sensibles au pH [274], à la température [275,276], aux ultrasons [277] ou encore à la lumière [278] permettant une dissociation contrôlée des micelles et une libération du principe actif, sont en plein essor dans le domaine biomédical.

Les micelles thermosensibles sont basées sur la température de solution critique (LCST) du bloc thermosensible de la micelle. En dessous de la LCST, le polymère est soluble dans l'eau mais au dessus il devient insoluble en raison de la rupture des liaisons hydrogène entre l'eau et les chaînes du polymère. Les polymères les plus utilisés pour faire des micelles thermosensibles sont les poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), qui présentent une transition brutale et réversible atour de 32°C [279].

La lumière peut aussi être un facteur externe qui produirait l'ouverture des micelles. La lumière NIR sera sélectionnée car elle peut pénétrer profondément dans les tissus comme il a été expliqué précédemment. Les micelles sont sensibles à la lumière si elles contiennent un chromophore dans la partie hydrophobe du polymère. En présence de lumière il peut y avoir une photoréaction qui change la polarité du polymère et entraine une déstabilisation de la micelle qui libère alors le médicament [278].

La libération de médicaments déclenchée par la dissociation de micelles provoquée par un changement de pH peut provenir de la rupture de liaisons. Par exemple, Chen *et al.* préparent des micelles de PEG et de polycarbonate [280], et ont démontré que les groupes acétal du polycarbonate étaient hydrolysés, entraînant une libération de paclitaxel ou de doxorubicine (les principes actifs) de 60 à 70% après une exposition à des conditions acides (pH 5,0 à 4,0).

La dissociation de micelle induite par un changement de pH peut aussi être créée par protonation de polymères sensibles au pH qui forment des micelles contenant un noyau hydrophobe à pH physiologique. La dissociation des micelles se produit alors lorsque les fonction acides se protonent et deviennent chargées : lorsque pH $<$ pKa. Cela entraîne, alors, une répulsion électrostatique entre les chaînes de polymères et donc une dissociation des micelles. De nombreux exemples de protonation de polymères déclenchant la dissociation de micelle ont été

rapportés dans la littérature. Par exemple, la poly(L-histidine), les polypyridines et les polysulfonamides [274]. La poly(L-histidine) est le composé sensible au pH le plus couramment utilisé dans les systèmes de libération de médicament. Il a un pKa autour de 6,5, il est biodégradable et peu toxique [239]. Lee *et al.* proposent des micelles à base de copolymère tribloc PLA-b-PEG-b-polyHistidine, qui permettent une libération déclenchée de la doxorubicine lorsque le pH était abaissé de 7,4 à 6,0 [281]. Les polypyridines comme la poly(2-vinylpyridine) (P2VP) et la poly(4-vinylpyridine) (P4VP) sont insolubles dans l'eau à pH neutre ou basique, mais elles se protonent à pH $< 5$ et deviennent solubles [282]. Une formulation micellaire récemment développée contenant du P2VP a été décrite par Karanikolas *et al.* [283]. Un copolymère tribloc de PEO-b-P2VP-b-PEO a été utilisé pour démontrer la dissociation des micelles induite par un changement de pH.

L'équipe de Gao *et al.* s'est beaucoup intéressée à la formation de micelles à différents pH à partir d'amines tertiaires [284, 285]. Ils synthétisent des polymères en bloc avec comme partie hydrophile du PEG et comme partie hydrophobe des amines tertiaires. Ils ont testé différents ratios d'amines tertiaires composées de diéthylaminoéthyle (DEA) et de dipentylaminoethyl (D5A). Le pDEA seul a un point de turbidité autour de pH = 8 et le pD5A autour de pH = 4,5. Par conséquent, Gao *et al.* ont développé de nombreux copolymères (avec des ratios différent entre DEA et D5A) afin d'ajuster l'hydrophobie du bloc hydrophobe ionisable, qui a conduit à l'obtention de micelles ayant un pH de transition entre : $4 <$ pH $< 8$ [286]. De plus, ils encapsulent à l'intérieur des micelles des fluorophores organiques et ils greffent sur le polymère un accepteur qui inhibe la fluorescence par FRET lors de la formation de micelles. Cette équipe a aussi testé ces micelles *in vivo* dans des souris et ils ont montré l'amplification du signal de fluorescence d'un facteur $> 100$ dans le micro-environnement de différentes tumeurs [285].
Dans notre projet, nous nous sommes inspirés des micelles de l'équipe de Gao mais notre objectif ici est d'utiliser des QD SWIR comme fluorophores et des AuNP comme accepteurs d'énergie. De plus, nous n'utilisons pas du PEG mais le zwitterion sulfobétaïne pour permettre la furtivité de nos nano-objets.

### Réalisation du projet

Nous proposons pour cela de développer des polymères surfactants sensibles au pH composés de deux blocs : un composé zwitterionique sulfobétaïne (SB) et un second à base de diisopropylamide (DPA) : pDPA-b-SB.

Par ailleurs, les NP, que ce soit les QD ou les AuNP, seront recouverts d'un nouveau polymère statistique : le DPA/LA, à base de fonctions lipoamides (LA) afin que le polymère soit fortement ancré à la surface des NP et contenant aussi des fonctions DPA sensibles au pH. Ces NP peuvent ensuite être mélangées à une solution de copolymère DPA-b-SB à pH acide, dans laquelle à la fois le DPA et le SB sont solubles dans l'eau.
En passant d'un pH acide à un pH neutre, le DPA devient hydrophobe, ce qui entraine l'auto-

assemblage des NP à l'intérieur du noyau des micelles de DPA-b-SB en formation. La fluorescence des QD est alors fortement atténuée par leur proximité avec les AuNP, par transfert d'énergie non-radiatif. Les micelles ainsi formées seront très furtives grâce au SB qui permet de minimiser les interactions non-spécifiques avec les différents composés du milieu biologique. Ensuite, lorsque ces micelles se trouvent dans un milieu où le pH est inférieur à 7, comme dans le milieu extracellulaire des tumeurs solides, le DPA se protone et devient soluble dans l'eau.

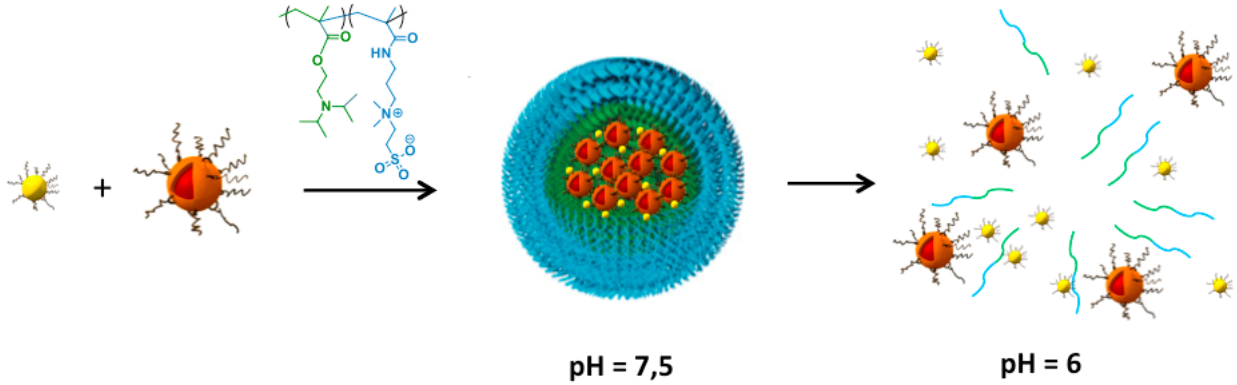



FIGURE IV.2 – Schéma de la formation de l'auto-assemblage des micelles puis de leur dissociation en milieu acide.

Dans ce projet, j'ai effectué la quasi-totalité des expériences et analyses de ce chapitre IV. J'ai réalisé les synthèses de QD et des AuNP, leur passage dans l'eau et leurs caractérisations. J'ai synthétisé les polymères DPA/LA et DPA-b-SB et j'ai effectué les caractérisations en RMN $^1$H, les dosages et les courbes de turbidités. En revanche, les analyses en RMN DOSY ont été réalisées par François Ribot au laboratoire LCMCP au sein de l'Université Pierre et Marie Curie et les analyses GPC (chromatographie par perméation de Gel) ont été effectuées par Mohamed Hanafi du laboratoire SIMM à l'ESPCI. J'ai mesuré les tailles de différents objets par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et j'ai réalisé les mesures de PL (photoluminescence) et de déclin de PL en fonction du temps pour chaque nano-objet en fonction du pH. Toutes les images TEM (microscopie électronique en transmission) ont été obtenues par Xiangchen Xu au sein de notre laboratoire, au LPEM.

Dans ce chapitre, nous étudierons dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation des polymères sensibles au pH (pDPA/LA) à greffer à la surface des NP par échange de ligands, ensuite nous nous intéresserons à la formation de micelles à base de polymères surfactants (pDPA-b-SB) sensibles au pH, puis à l'encapsulation des nanoparticules à l'intérieur des micelles. Enfin, nous étudierons le transfert d'énergie entre les particules au sein des micelles puis lors de leur dissociation.

# IV.1 Échange de ligands sensibles au pH sur les NP

## IV.1.1 Synthèse des polymères pDPA et pDPA/LA sensibles au pH

Dans ce projet, pour que les NP puissent être encapsulées *in fine* dans des micelles, il est nécessaire que les NP soient recouvertes de ligands hydrophobes. Par contre, lorsque les micelles vont libérer les QD et les AuNP, nous ne voulons pas que ces particules s'agrègent, il faut alors qu'elles soient relativement stables dans un milieu aqueux (comme le sang), donc recouvertes de ligands, cette fois, hydrophiles. Le meilleur candidat est alors un polymère sensible au pH composé de DPA (diisopropylamine) et de LA pour l'accroche sur les NP (noté : pDPA/LA). Bien que le pKa du monomère DPA soit autour de 9, le pKa* des polymères à base de DPA se trouve autour du pH physiologique (entre 6,5 et 7), comme nous allons le montrer par la suite.

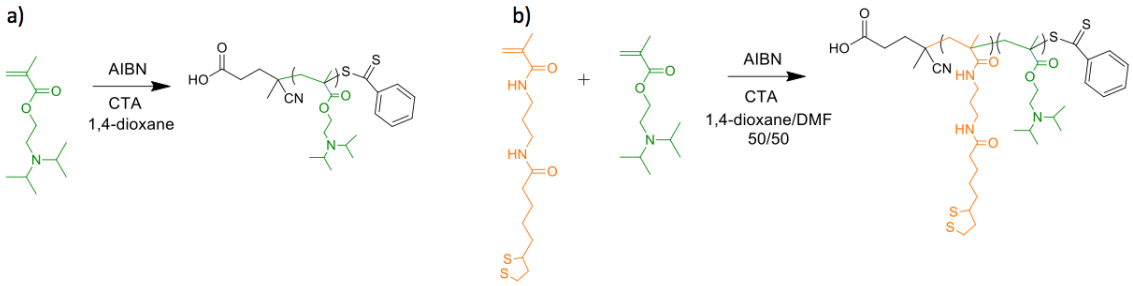



Figure IV.3 – a) Schéma de la synthèse des polymères pDPA et b) des polymères statistiques pDPA/LA.

Trois polymères à base du seul monomère méthacrylate DPA ont été synthétisés avec des tailles croissantes ainsi que deux autres polymères statistiques DPA/LA ayant des tailles différentes. Un résumé des différents polymères obtenus est présenté en table IV.1. Chacune de ces deux polymérisations a été optimisée pour ce projet, afin d'obtenir le meilleur rendement de polymérisation. Par exemple, pour la synthèse des pDPA : plusieurs agents RAFT ont été testés (le CADB (4-cyano-4-(phenylcarbonathiocylthio)pentanoic acid) et le CDP (4-cyano-4[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoic acid)) ; plusieurs solvants également (le DMF, le THF et le 1,4-dioxane) et plusieurs temps de polymérisation (2h, 6h et 10h). Après la synthèse, il a aussi fallu optimiser les solvants de lavage afin de réussir à bien isoler le polymère des monomères restants.

Les synthèses de pDPA et de pDPA/LA retenues sont celles schématisées en **figure IV.3**. Les polymères pDPA ont été obtenus par polymérisation RAFT en utilisant de l'acide 4-cyano-4-(phenylcarbonathiocylthio)pentanoïque (CADB) comme agent de transfert de chaine (CTA), et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) comme initiateur. Le monomère DPA, le CADB et l'AIBN sont dissous dans du 1,4-dioxane. Le mélange est mis à buller sous argon pendant 60 min puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 10 h. Le polymère est ensuite précipité goutte à goutte dans du méthanol (si le polymère est long (DPN>100)) ou dans MeOH/NaOH(1M) à

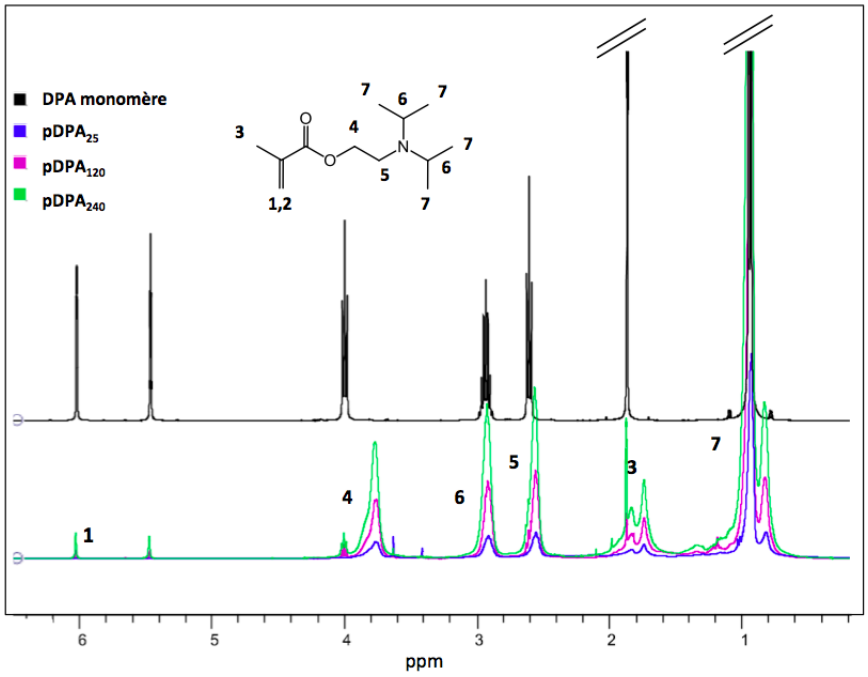



FIGURE IV.4 – Spectre RMN $^1$H ($CDCl_3$, 400MHz) des polymères pDPA ayant différentes tailles. Ces spectres sont normés par rapport aux signaux du benzène de l'agent RAFT.

90/10 (si le polymère est petit) car les monomères sont solubles dans le méthanol. Le polymère est ensuite lavé par trois cycles de dissolution / précipitation dans un minimum d'eau acide et précipitation dans le MeOH (ou MeOH/NaOH(1M) à 90/10). Le polymère est ensuite séché sous cloche à vide pendant une nuit. Le taux de conversion des monomères en polymère mesuré avec des spectres RMN $^1$H est $> 90$ %. Une estimation de la masse molaire de chaque polymère a été déterminée par RMN $^1$H en supposant la synthèse parfaitement monodisperse (Mn=Mw). Les polymères ont aussi été analysés par GPC dans du THF, les résultats sont présentés dans la table IV.1.

TABLE IV.1 – Liste des différents polymères synthétisés : nom du polymère ; masse molaire en poids du polymère (Mw) estimée par RMN $^1$H et obtenue par GPC dans du THF (en g/mol) ; indice de polydispersité obtenu par GPC.

| Nom du Polymère | Mw estimée en RMN $^1$H | Mw obtenue par GPC | Ip |
|---|---|---|---|
| $pDPA_{25}$ | 5 300 | 6 360 | 1,17 |
| $pDPA_{120}$ | 25 560 | 24 500 | 1,02 |
| $pDPA_{240}$ | 51 100 | 41 000 | 1,16 |
| $pDPA_{24}/LA_5$ | 6 800 | - | - |
| $pDPA_{240}/LA_{15}$ | 60 400 | - | - |

Les synthèses des polymères pDPA/LA sont quasiment identiques sauf que le solvant est

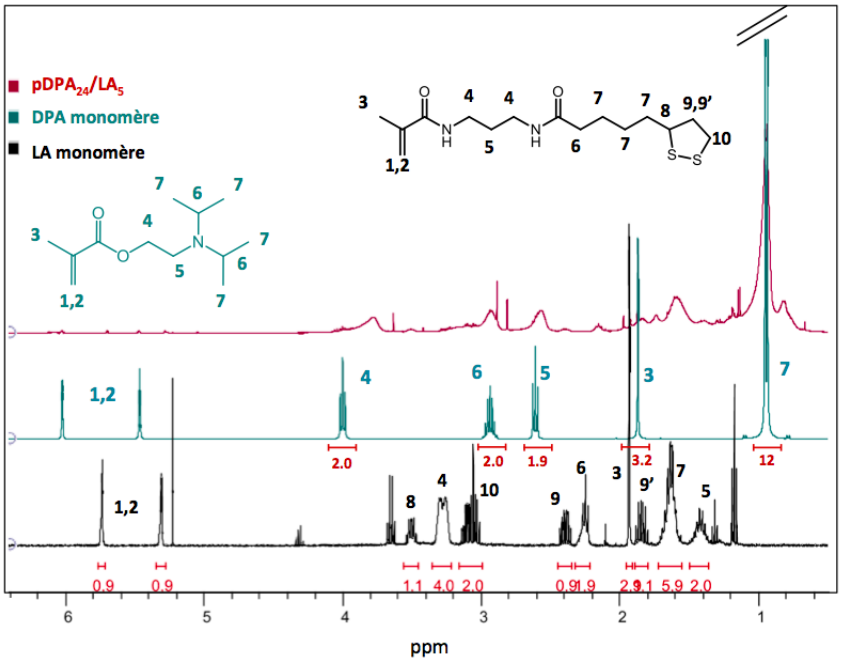



Figure IV.5 – Spectre RMN $^{1}$H ($CDCl_3$, 400MHz) des monomères SB et DPA ainsi que du polymère $pDPA_{24}/LA_5$. L'intégration des différents pics permet de connaître le ratio de DPA/LA dans le polymère.

un mélange de 1,4-dioxane et de DMF (typiquement 2/5) pour aider l'acide lipoïque à se dissoudre. Par ailleurs, comme il s'agit de polymères statistiques, il est nécessaire de prendre en compte la différence de réactivité des deux monomères car les fonctions méthacrylamides sont plus réactives que les méthacrylates (facteur 1,8). Par conséquent, il est nécessaire d'adapter les proportions des deux monomères pour obtenir le polymère souhaité. Le temps de réaction et la purification du polymère se fait de la même façon que pour les pDPA. Le taux de conversion de chaque monomère peut être estimé par RMN $^{1}$H et typiquement dans ces conditions le DPA réagit à 80% et le LA à 65%.

Les spectres RMN $^{1}$H des trois pDPA se trouvent en figure IV.4 et les spectres des polymères pDPA/LA sont présentés en **figure VII.16**. Les résultats de la GPC THF, les masses molaires moyennes en masse (Mw) obtenues sont présentées dans la table IV.1. Il est à noter que les masses molaires estimées par la RMN sont relativement proches de celles obtenues en GPC.

### IV.1.2 Caractérisations des polymères sensibles au pH

Afin de déterminer le pKa du monomère DPA ainsi que les pKa* des polymères, des courbes de dosage ont été effectuées et sont présentées en **figure IV.6**. Lors de ces dosages acido-basiques la solution titrée correspond à une quantité connue du composé à base de DPA dissous en milieu acide, et la solution titrante est une solution de soude à 1 mol/L. Le pKa du monomère obtenu est conforme aux données de la littérature et se trouve autour de 8,9. Pour ce qui est des

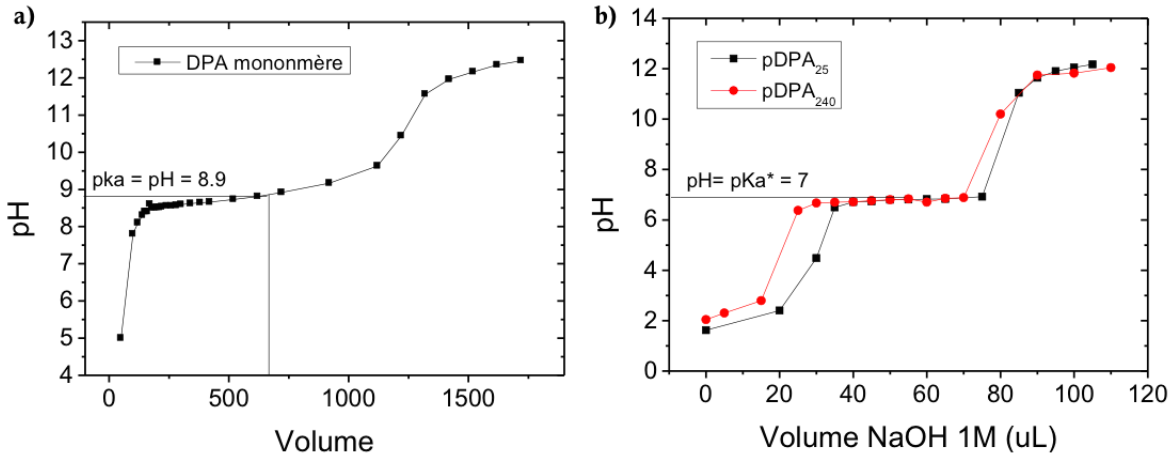



FIGURE IV.6 – Courbes de dosage de la fonction DPA par ajout de soude (NaOH) à une concentration de 1M dans une solution contenant le DPA monomère en (a) et les polymères $pDPA_{25}$ et $pDPA_{240}$ en (b).

polymères, tout comme il l'a été remarqué dans le chapitre précédent, ceux-ci ne présentent pas le même pKa que le monomère, on parle désormais de pKa* et celui-ci est décalé vers des pH plus bas, peu importe la taille du polymère (entre 6 000 et 41 000 g.mol$^{-1}$) ou la salinité (entre 0 et 3 000 mM), il semble être autour de 7. Comme le pKa correspond au pH où il y a autant de DPA protoné que déprotoné, ceci signifie que les fonctions DPA dans un polymère se déprotonent plus facilement que dans le monomère. Les courbes de dosage ne sont pas toutes présentées mais pour chaque polymère, le pKa* obtenu était le même.

Des courbes de turbidité ont aussi été réalisées afin de déterminer le point de Turbidité (pT) de chaque polymère en fonction de leur taille et de la salinité de la solution. Ceci permet

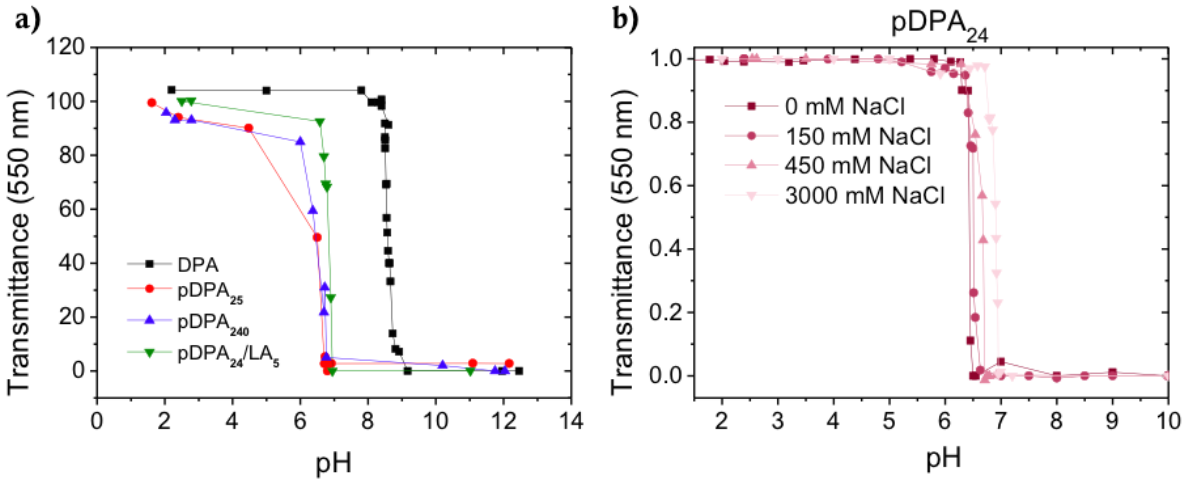



FIGURE IV.7 – Courbes de turbidité en fonction du pH (a) pour le monomère DPA et des polymères pDPA ou pDPA/LA de différentes tailles, dans des conditions physiologiques ([NaCl] = 150 mM) et (b) différentes concentrations en sel NaCl pour le polymère $pDPA_{24}$.

de connaître le pH auquel chaque polymère précipite. Ces courbes sont présentées en **figure IV.7**. Les résultats de ces analyses sont tout à fait cohérents avec leur courbe de dosage. Le monomère possède un pT autour de 9 alors que dans le cas des polymères, le pT est entre 6,5 et 7. Pour ce polymère-ci et contrairement à ce qui avait été observé dans le chapitre précédent avec les polymères pSMZ (sulfamethazine), la taille du polymère ne semble pas influencer de façon significative ce pT (entre 5 000 et 50 000 g/mol). Il en est de même avec la salinité de la solution, même en augmentant de façon drastique la concentration en NaCl, le pT reste toujours entre 6,5 et 7.

### IV.1.3 Échange de ligands sur des AuNP sphériques

Les synthèses des germes d'or (environ 2 nm de diamètre) et des AuNP de 5 ou de 8 nm ou encore de 20 nm de diamètre que nous noterons par la suite respectivement AuG, Au5, Au8 et Au20 sont détaillées en annexe de cette thèse. Après synthèse, les AuG sont recouverts de ligands phosphines ou oxydes de phosphine et les Au5, Au8 et Au20 de citrates et les solutions présentent un pH acide $\approx 5$.

Les échanges de ligands pDPA/LA sur des nanoparticules d'or ont tout d'abord été complexes car, bien que les thiols possèdent une forte affinité pour l'or, les particules après synthèse sont chargées négativement. Or le polymère pDPA/LA en milieu acide est chargé positivement. L'ajout du polymère directement sur les particules d'or entrainait l'agglomération irréversible des particules en raison des interactions électrostatiques. Pour éviter cela il est nécessaire d'ajouter des particules d'or (typiquement 1 mL à une concentration de 1 nM pour les Au8) lentement en goutte à goutte dans une solution sous vive agitation de polymères pDPA/LA en très large excès (environ 100 µg/mL dans 1 mL). En général pour recouvrir l'intégralité d'une nanoparticule, la quantité de ligands nécessaire est autour de 1 mg/m$^2$. Dans ce protocole le large excès correspond environ à 100 fois cette quantité (*i.e.* 100 eq).

En effectuant des spectres d'absorption des solutions soit des AuG, des Au5, des Au8 encore des Au20 juste après la synthèse (donc respectivement recouverts de phosphines ou de citrates) et d'autres juste après échange avec le polymère pDPA/LA, un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde d'environ 2 nm peut être observé. Cet effet provient d'un changement d'indice de réfraction de l'environnement proche de la surface des AuNP dû à la présence de polymère en surface.
En modifiant ensuite le pH de ces solutions, nous pouvons confirmer que l'échange a bien eu lieu. En modifiant le pH de 5 (après synthèse) à 7,5 puis à 6, les particules s'agrègent et ceci est réversible. L'agrégation s'observe par l'augmentation de l'absorbance aux grandes longueurs d'onde, caractéristique de l'agrégation des particules. Ces résultats sont présentés en **figure IV.8**.

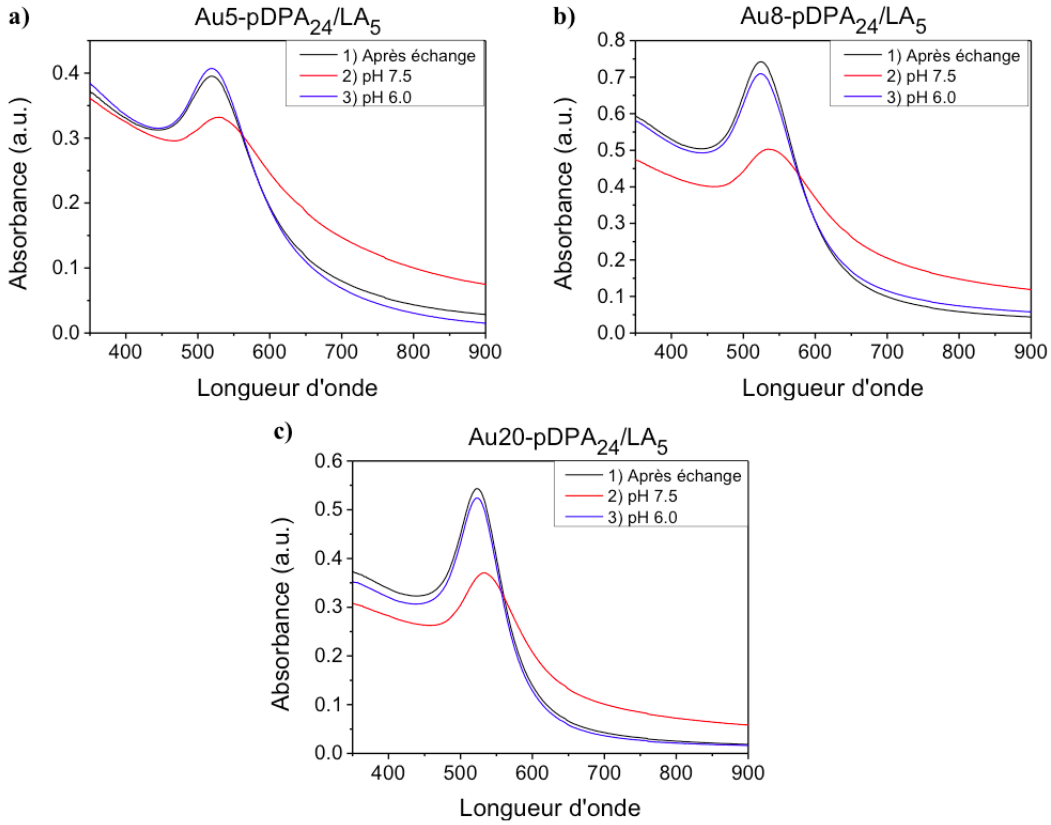



FIGURE IV.8 – Spectres d'absorbance des AuNP-pDPA/LA à différents pH : après échange (i.e. pH 5), puis pH 7,5 et enfin pH 6. (a) Cas des Au5. (b) Cas des Au8. (c) Cas des Au20.

### IV.1.4 Échange de ligands sur des QD visibles et SWIR

L'étape suivante a été de réussir à greffer le ligand polymère sensible au pH : pDPA/LA sur les QD. Cet échange n'a pas été trivial. Comme il l'a été expliqué dans le chapitre d'introduction de cette thèse, habituellement les QD sont transférés dans l'eau par un premier échange avec du MPA (l'acide mercaptopropionique). Les ligands organiques qui se trouvent à la surface des QD après la synthèse colloïdale sont remplacés par le MPA. Les QD-MPA sont ensuite solubilisés en milieu tamponné dans une solution ayant un pH $>$ 10. Les MPA sont accrochés à la surface du QD par leur fonction thiol déprotonée (pKa thiol $\approx$ 9-10) et ils permettent la stabilisation colloïdale des QD par répulsion entre les charges négatives de leur fonction carboxylate (pKa $\approx$ 5). Généralement, une seconde étape d'échange de ligands est alors possible en milieu basique entre le MPA et le polymère adéquat mis en large excès. Ici, cela a été plus complexe car le polymère pDPA/LA n'est pas soluble en milieu basique.

Plusieurs protocoles ont alors été testés afin de réussir cet échange. Nous pouvons ci-

ter par exemple, des essais inspirés de protocoles utilisés par Matoussi *et al.* ou par Zou *et al.* [287, 288]. Ils proposent un échange de ligand *in situ* par transfert de phase. Par exemple, avec un échange biphasique : chloroforme/eau. Nous avons essayé cet échange biphasique car le polymère (pDPA/LA) déprotoné est soluble dans le chloroforme et les QD recouverts de ligands organiques aussi, sous vive agitation avec de l'eau acide. Si l'échange de ligands a lieu alors les QD changent de phase. Ici, un changement de phase a bien été observé mais l'échange à la surface des QD n'a pas été total. En effet, les QD s'agrègent en milieu basique mais il n'a pas été possible ensuite de les solubiliser à nouveau en milieu acide.

D'autres échanges ont été essayés comme par exemple avec du NMF (N-méthylformamide) ou du THF (tétrahydrofurane) car le polymère et les QD organiques sont solubles dans ces solvants. D'autres essais ont été réalisés en passant d'abord les QD dans l'eau avec du MPA puis en les faisant tomber par centrifugation avec de l'éthanol et enfin en les reprenant dans de l'eau/THF ou dans du chloroforme pur contenant le polymère. D'autres tentatives encore ont été menées en essayant de passer par un plus petit ligand moléculaire comme du TA-SB ou un monothiol-PEG. Aucun de ces échanges n'a été totalement concluant car souvent une partie des QD s'agrège. Ces échanges ne semblent donc que partiels.

Le seul protocole qui a été vraiment concluant est le suivant. Après un échange MPA classique sur 4 nmol de QD, ces derniers sont lavés dans 1 mL de chloroforme puis centrifugés afin d'enlever le MPA en excès. Ils sont ensuite re-dispersés dans 1 mL de DMF puis après ajout de quelques milligramme de tert-butoxide de potassium, ils précipitent à nouveau par centrifugation. Un dernier lavage à l'éthanol puis centrifugation permet d'enlever toutes les dernières impuretés et de les reprendre dans 200 µL d'eau acide, tamponnée à pH = 6,1, et non pas basique comme habituellement. Les QD-MPA sont alors très peu stables et il faut les faire réagir très vite avant qu'ils ne s'agrègent. Dans un autre tube le polymère pDPA/LA est préparé à 5 mg/mL (en très large excès) dans une solution tampon à un pH = 5,6. Les QD-MPA sont ajoutés en goutte à goutte sous agitation. Après quelques minutes à température ambiante les QD peuvent être lavés par ultracentrifugation sur gradient de sucrose comme il l'a déjà été détaillé lors d'un échange de ligands classique. Les QD sont stables et ne s'agrègent pas en milieu acide. L'échange a bien eu lieu car, comme on peut l'observer sur la **figure IV.9**, lorsque l'on passe les QD en milieu basique tamponné à pH = 7,5 ils s'agrègent et ceci est réversible en revenant à une solution tamponnée à pH = 6,0.

Ce protocole d'échange fonctionne aussi avec des QD SWIR : PbS@CdS comme observé sur la **figure IV.10**.

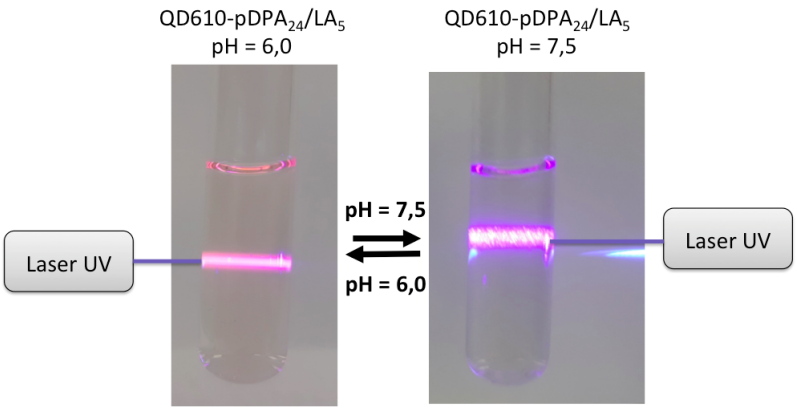



FIGURE IV.9 – QD610 (CdSe@CdS/ZnS) après l'échange réussi avec le polymère pDPA/LA. Sous illumination UV, il est possible d'observer l'agrégation des QD-pDPA/LA en milieu basique et leur re-dispersion en milieu acide. Cette réversibilité est observée sur un grand nombre de cycles.

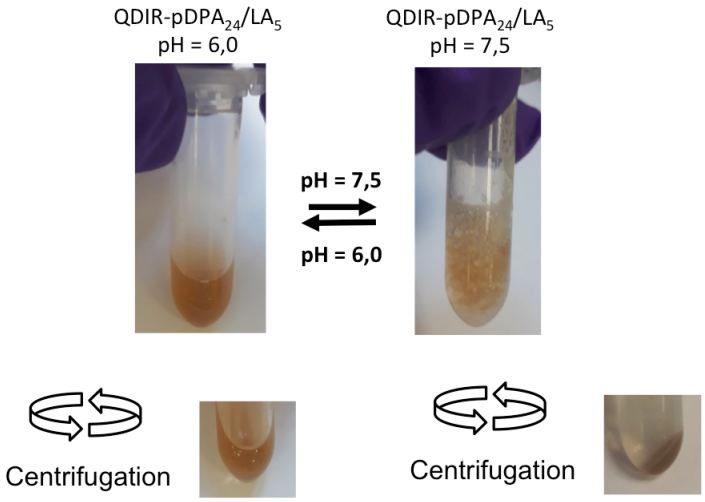



FIGURE IV.10 – QDIR (PbS@CdS) après l'échange réussi avec le polymère pDPA/LA. Il est possible d'observer l'agrégation des QD-pDPA/LA en milieu basique et leur re-dispersion en milieu acide. Cette réversibilité est observée sur un grand nombre de cycles. Par centrifugation, il est encore plus facile d'observer l'agrégation des particules.

## IV.2 Micelles de copolymère pDPA-b-SB sensibles au pH

### IV.2.1 Synthèse des copolymères surfactants pDPA-b-SB

Pour former des micelles, il est nécessaire de développer un polymère surfactant possédant une partie hydrophile et une hydrophobe. Le polymère sélectionné se compose d'un bloc de zwitterion sulfobetaïne, car cette fonction chimique possède d'excellentes propriétés de furtivité comme il l'a été démontré dans le chapitre II de cette thèse. Le second bloc de ce polymère surfactant sera un bloc de DPA. L'objectif est que le polymère pDPA-b-SB soit amphiphile

uniquement à un pH $> 7$ mais totalement hydrophile à un pH $< 7$. Ainsi, lors de la formation des micelles le bloc DPA de ce polymère surfactant deviendra hydrophobe en même temps que les pDPA/LA se trouvant à la surface des NP, ce qui permettra de les encapsuler.

Il a tout d'abord fallu développer un protocole de polymérisation de pDPA-b-SB avec un bon taux de conversion. Plusieurs solvants ont été testés et la polymérisation en bloc a été essayée dans les deux sens : DPA-b-SB et SB-b-DPA. Le protocole sélectionné est celui permettant d'obtenir chaque bloc avec le meilleur rendement possible, la synthèse est présentée en **figure IV.11**, en commençant par le premier bloc de DPA dans le 1,4-dioxane puis le second bloc de SB dans de l'acide acétique.

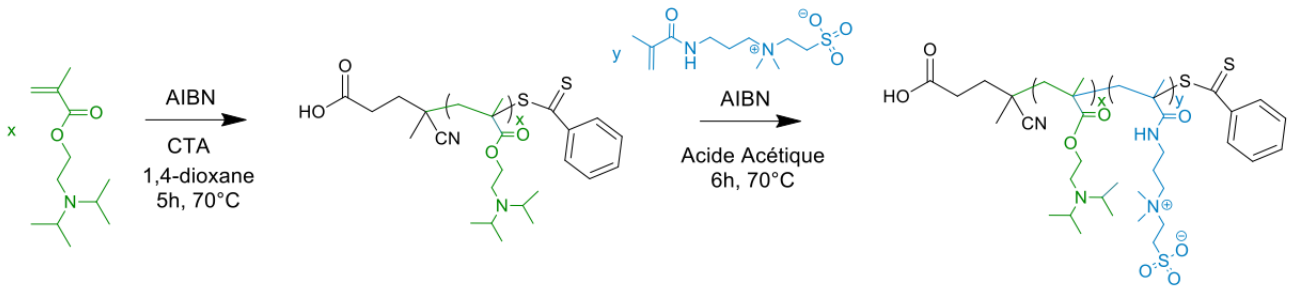



Figure IV.11 – Schéma de la synthèse du polymère bloc pDPA-b-SB.

La première étape est la synthèse du premier bloc de DPA. Ce protocole est le même que celui présenté dans la partie précédente dont la synthèse est schématisée est **figure IV.3**. Cette synthèse est faite dans le 1,4-dioxane et le polymère est ensuite précipité dans du MeOH/NaOH(1M) à 9/1. Après avoir séché le polymère, par comparaison entre les intégrations des $^1$H de l'agent RAFT par rapport à ceux du DPA sur les spectres RMN, il peut être affirmé que l'agent RAFT est toujours présent. Il est donc possible de rajouter un deuxième bloc à ce pDPA. Lors de la deuxième étape, chaque chaine de polymère va être réamorcée et va agir comme des macro-agents RAFT pour que la polymérisation continue afin de former un deuxième bloc de sulfobétaine (SB). Pour la synthèse de ce second bloc, le polymère pDPA est dissous dans

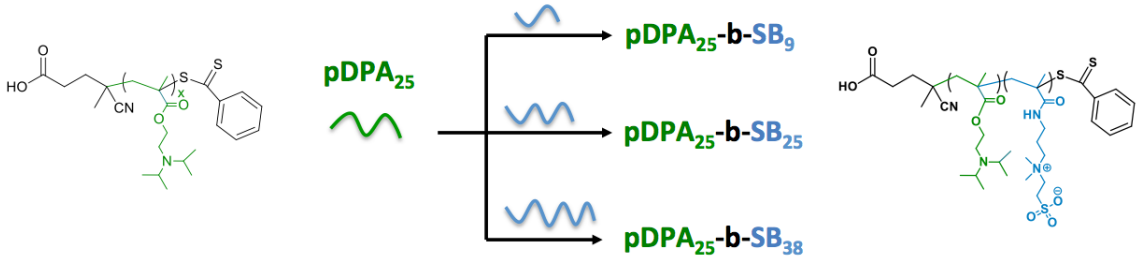



Figure IV.12 – Schéma de principe montrant que chaque premier bloc synthétisé a permis de synthétiser trois polymères pDPA-b-SB avec des ratios différents de DPA/SB.

l'acide acétique (pDPA est alors hydrophile) qui permet aussi de solubiliser le monomère SB méthacrylamide et l'amorceur AIBN qui va permettre de former de nouveaux radicaux libres afin d'entrainer, à nouveau, l'étape d'initiation de la polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon pendant 1 h puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 6 h. Le polymère est ensuite lavé avec 3 cycles de précipitation dans un mélange MeOH/NaOH ou bien du diéthyléther (en fonction du ratio DPA/SB, les polymères ne précipitent pas tous dans le MeOH/NaOH) et de re-solubilisation dans de l'eau acide. Le polymère obtenu est de couleur rose (provenant du groupement dithiobenzénique de l'agent RAFT). Le rendement de polymérisation de la synthèse du premier bloc est $> 90\%$ et celui du second bloc vaut $\approx 70\%$.

### IV.2.2 Caractérisations des polymères surfactants pDPA-b-SB

TABLE IV.2 – Liste des différents polymères synthétisés : nom du polymère avec le nombre de DPA et de SB estimé par RMN $^1$H ; masse molaire en poids du polymère (Mw) estimée par RMN $^1$H (en g/mol) ; ratio (DPA/SB) initial, ratio (DPA/SB) estimé par RMN$^1$H.

| 1er bloc utilisé | Nom du Polymère | Mw estimée en RMN $^1$H (g.mol$^{-1}$) | Ratio (DPA/SB) initial | Ratio (DPA/SB) obtenu RMN $^1$H |
|---|---|---|---|---|
| $pDPA_{25}$ | $pDPA_{25}$-b-$SB_9$ | 7 950 | 3 | 2,8 |
| | $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ | 10 600 | 1,5 | 1,5 |
| | $pDPA_{25}$-b-$SB_{38}$ | 16 400 | 0,75 | 0,65 |
| $pDPA_{120}$ | $pDPA_{120}$-b-$SB_{70}$ | 46 000 | 1,5 | 1,7 |
| | $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$ | 72 300 | 0,75 | 0,75 |
| $pDPA_{240}$ | $pDPA_{240}$-b-$SB_{100}$ | 80 300 | 3 | 2,4 |
| | $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$ | 95 000 | 1,5 | 1,6 |
| | $pDPA_{240}$-b-$SB_{200}$ | 109 500 | 1 | 1,2 |

Une liste de tous les polymères obtenus est présentée en table IV.2 Trois premiers blocs ont été synthétisés avec des tailles différentes (Mw = 5 300 g.mol$^{-1}$ ; 25 560 g.mol$^{-1}$ et 51 100 g.mol$^{-1}$) puis à partir de ces premiers blocs plusieurs polymères pDPA-b-SB ont été obtenus avec à chaque fois des ratios différents en DPA/SB entre 3 et 0,75.

Les ratios initiaux ne sont pas exactement les ratios obtenus. Il a été nécessaire de calculer pour chaque polymère le ratio obtenu grâce aux spectres RMN $^1$H, en comparant les intégrations des pics provenant des DPA par rapport à ceux provenant des SB. Les spectres RMN de $pDPA_{240}$-b-$SB_x$ avec des ratios R = DPA/SB différents sont présentés en **figure VII.17**. Ces spectres sont normés par rapport aux signaux du DPA. En regardant les intensités relatives des pics provenant des $^1$H du SB, on remarque que ceux-ci augmentent plus le nombre de SB augmente donc plus le ratio R=DPA/SB diminue. Par ailleurs, ces spectres RMN permettent d'observer qu'il reste encore $\approx 10\%$ de monomères SB même après plusieurs lavages au diéthyléther. Ceci suggère qu'une partie des monomères SB précipite aussi et que ces lavages ne sont pas optimums, cependant cela ne sera pas un obstacle pour la poursuite du projet car une fois les micelles formées elles seront beaucoup plus grandes qu'un monomère et par lavage sur

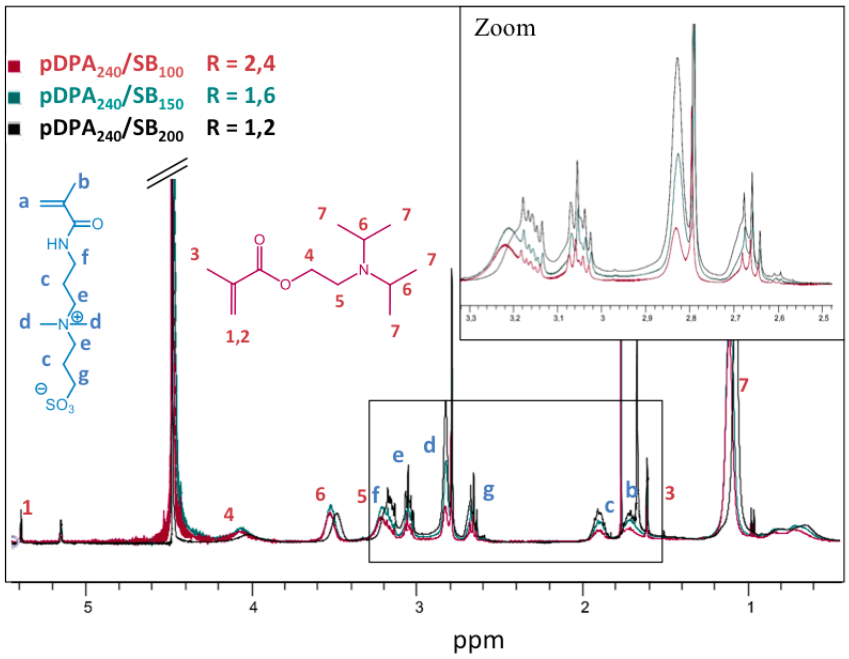



FIGURE IV.13 – Spectres RMN $^1$H ($D_2O$, 400MHz) des polymères pDPA$_{240}$-b-SB$_x$ avec des ratios différents. Ces spectres sont normés par rapport aux signaux du DPA.

vivaspin, ultracentrifugation ou dialyse, il sera facile d'éliminer les monomères SB restants. Il est à noter que la présence de ces monomères est à prendre en compte dans le calcul du ratio R pour ne pas surestimer le nombre de SB dans le polymère.

Pour que ces polymères diblocs soient parfaitement caractérisés, il aurait fallu les analyser par GPC comme il l'a été fait pour les premiers blocs de pDPA. Malgré nos tentatives, il a été impossible de passer ces polymères en GPC car les blocs de pDPA peuvent être passés sur la colonne de GPC en THF mais ils collent sur la colonne de GPC aqueuse à cause de leur charges positives. Au contraire, les blocs de pSB sont très solubles dans l'eau et peuvent être analysés en GPC aqueuse, cependant ils ne sont pas très solubles dans du THF... Nous n'avons donc pas pu caractériser ces polymères diblocs : pDPA-b-SB par GPC. Il a tout de même été possible de savoir si les premiers blocs de pDPA ont été réamorcés en effectuant une analyse fine par RMN DOSY $^1$H (Diffusion Ordered SpectroscopY), dont les résultats et les spectres sont présentés par la suite. En effet, Grubbs *et al.* et Delsuc *et al.* ont montré que le RMN DOSY permet d'estimer la masse molaire et l'indice de polydispersité d'un polymère [289, 290].

Notre collaboration avec François Ribot, au laboratoire du LCMCP, nous a permis d'obtenir de nombreux spectres RMN DOSY $^1$H afin de pouvoir caractériser au mieux nos polymères sans GPC. La RMN DOSY est une expérience de RMN à deux dimensions. Une dimension correspond classiquement aux déplacements chimiques RMN des $^1$H et l'autre dimension aux coefficients de diffusion (cf technique de RMN DOSY expliquée en annexe). Nos objectifs, en effectuant ces

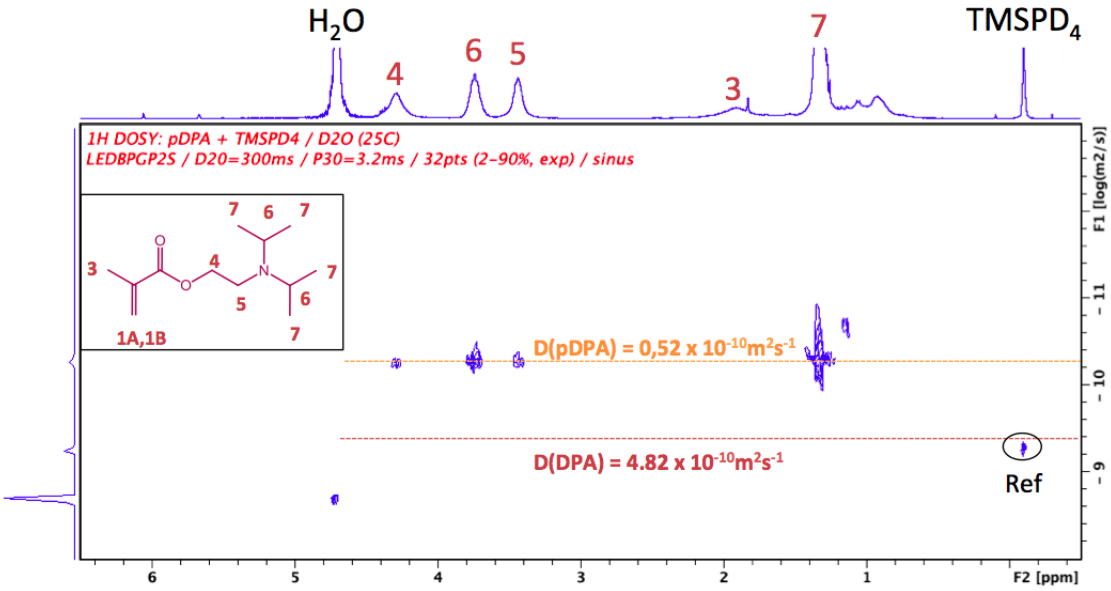



FIGURE IV.14 – Spectre RMN DOSY 2D du premier bloc $pDPA_{120}$ dans 600 µL de $D_2O$ avec 5 µL d'HCl à 5M et avec 1,5 mg/mL de TMSP-$d^4$.

expériences, étaient de savoir si les premiers blocs de pDPA (qui ont été analysés par GPC) sont réamorcés lors de la synthèse du deuxième bloc de SB et si les pDPA-b-SB sont tous à peu près de la même taille. Nous avons analysé en RMN DOSY les échantillons suivants :

- le monomère DPA,
- le monomère SB,
- le premier bloc de $pDPA_{120}$,
- le dibloc de $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$.

Ces échantillons ont tous été préparés de la même façon : le monomère (ou polymère) a été dissous dans 600 µL de $D_2O$ avec une référence (le TMSP-$d^4$) à 1,5 mg/mL et 5 µL de HCl à 5M afin que les DPA soient tous protonés. Chacun de ces échantillons a été analysé avec une référence (le TMSP-$d^4$, 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-$d^4$) qui ne possède qu'un seul déplacement chimique à $\delta = 0$ ppm et dont le coefficient de diffusion est connu. Ceci permet de s'assurer que les polymères ne modifient pas la viscosité de la solution et donc que tous les coefficients de diffusion obtenus sont bien comparables, ce qui a été le cas dans nos expériences.

Grâce aux spectres de chacun des deux monomères, il a été possible de connaître leur coefficient de diffusion respectif, dans $D_2O$. Ces derniers sont très proches car il s'agit de deux molécules ayant approximativement les mêmes masses molaires. Le coefficient de diffusion du monomère DPA obtenu vaut $D = 4{,}8.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$ et celui du monomère SB : $D = 5{,}6.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$. Sur la **figure IV.14**, se trouve le spectre RMN DOSY du premier bloc $pDPA_{120}$. Ce spectre confirme qu'il ne reste plus de monomères DPA après lavage du polymère et permet d'obtenir le coefficient de diffusion du premier bloc $pDPA_{120}$ : $D = 0{,}5.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$. Plus le polymère

est grand plus son coefficient de diffusion est petit, il est bien normal que le polymère ait un coefficient de diffusion plus petit que le monomère. Par ailleurs, sur le spectre, les signaux correspondant au polymère semblent ne représenter qu'une seule population. En effet, la distribution du coefficient de diffusion obtenu pour chaque pic est très limité, ce qui montre que le polymère est relativement monodisperse, comme cela avait été prouvé par GPC avec un $I_p = 1{,}02$.

Sur la **figure IV.15**, se trouve le spectre RMN DOSY du deuxième bloc de $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$. Trois conclusions majeures peuvent être tirées de ce spectre. La première est qu'il reste encore du monomère SB même après lavage du poymère dibloc ($\approx$ 10 %), ceci avait été déjà observé en RMN $^1$H. La seconde conclusion est qu'il ne reste plus du tout de $pDPA_{120}$, ce qui prouve que tous les premiers blocs ont bien été réamorcés. La troisième observation est que les pics provenant du $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$ ont des coefficients de diffusions très proches (variations $<$ 10 %), donc ce deuxième bloc semble également relativement monodisperse.
Nous n'avons, pour l'instant, pas pu mesurer tous les spectres RMN DOSY de chaque polymère. Cependant, étant donné que tous les polymères pDPA-b-SB présentés dans la table IV.2, ont été obtenus dans les mêmes conditions de synthèse, nous supposons par la suite que chaque premier bloc est entièrement réamorcé et que tous les polymères di-blocs sont relativement monodisperses.

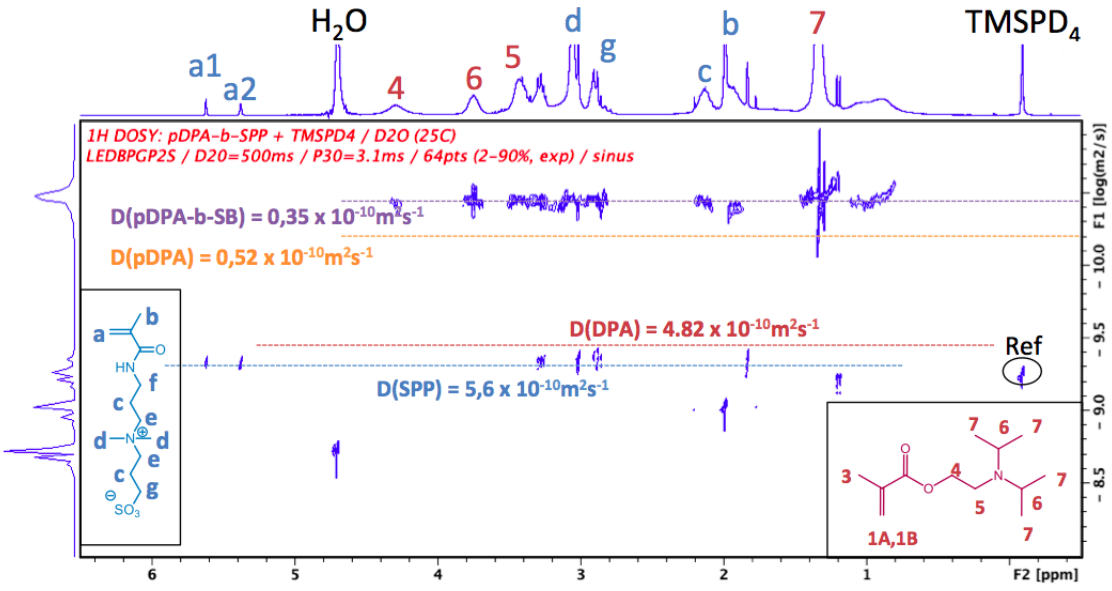



FIGURE IV.15 – Spectre RMN DOSY 2D du deuxième bloc $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$ dans 600 µL de $D_2O$ avec 5 µL d'HCl à 5M et avec 1,5 mg/mL de TMSP-$d^4$.

### IV.2.3 Analyse des micelles avec du pyrène

Après avoir obtenu tous les copolymères surfactants, nous allons nous intéresser à la formation des micelles. Afin de former ces micelles, il est nécessaire de passer d'un milieu acide à un

milieu basique et cela peut être effectué en ajoutant en goutte à goutte et sous vive agitation une solution basique (NaOH 1 M ou tampon) ou alors en ajoutant le polymère surfactant en goutte à goutte dans une solution basique.
Afin de caractériser au mieux les micelles formées, une première analyse a été effectuée et utilise une molécule fluorescente : le pyrène, qui permet de déterminer la concentration micellaire critique mais aussi à quel pH les micelles se forment.

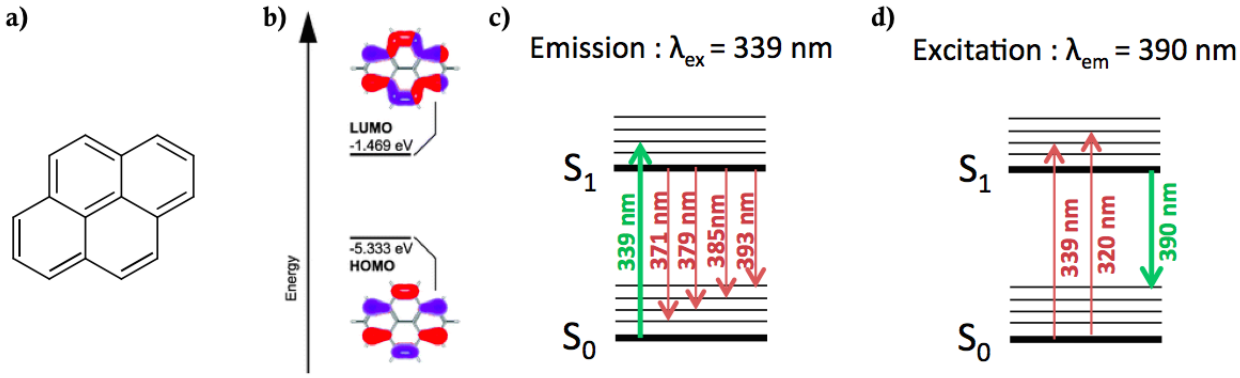



FIGURE IV.16 – (a) Molécule de pyrène. (b) Représentation des orbitales HO (Haute Occupée) et BV (Basse Vacante) du pyrène, en anglais respectivement HOMO et LUMO. $\Delta E_{HO-BV}$ = 3,86 eV (correspondant à 321 nm). (c) Schéma simplifié du diagramme de Perrin-Jablonski représentant certaines transitions d'émission du pyrène après avoir fixé la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex}$ = 339 nm. (d) Schéma simplifié du diagramme de Perrin-Jablonski représentant certaines transitions d'excitation du pyrène après avoir fixé la longueur d'onde d'émission $\lambda_{em}$ = 390 nm.

Le pyrène est souvent utilisé pour étudier la formation de micelles [291]. Sur la **figure IV.16** la molécule de pyrène est dessinée ainsi que ses orbitales HO et BV. Deux diagrammes de Perrin-Jablonski simplifiés sont aussi présentés afin de mieux comprendre les transitions du pyrène observées en spectroscopie d'émission et d'excitation de fluorescence.

Lors de la formation de micelles, les spectres d'émission et d'excitation du pyrène sont légèrement modifiés à cause d'un changement de polarité de l'environnement autour de la molécule fluorescente. En effet, le pyrène va préférentiellement aller dans des milieux hydrophobes. Par conséquent, il ira dans le cœur hydrophobe des micelles si celles-ci se forment. Le pyrène est donc à mettre en défaut dans ces expériences.
Lors de la formation de micelles, sur le spectre d'excitation, la bande à 333 nm se décale vers 339 nm par effet bathochrome à cause du changement de polarité du solvant. Par conséquent, si l'on trace le rapport des intensités des pics d'excitation de fluorescence à 339 nm et à 333 nm en fonction de la concentration du polymère surfactant pH-labile, il va être possible de déterminer la CMC (Concentration Micellaire Critique). De plus, sur les spectres d'émission avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 339 nm en fonction de la concentration en polymère, on observe une augmentation de l'intensité d'émission lors de la présence de micelles car à 339 nm la

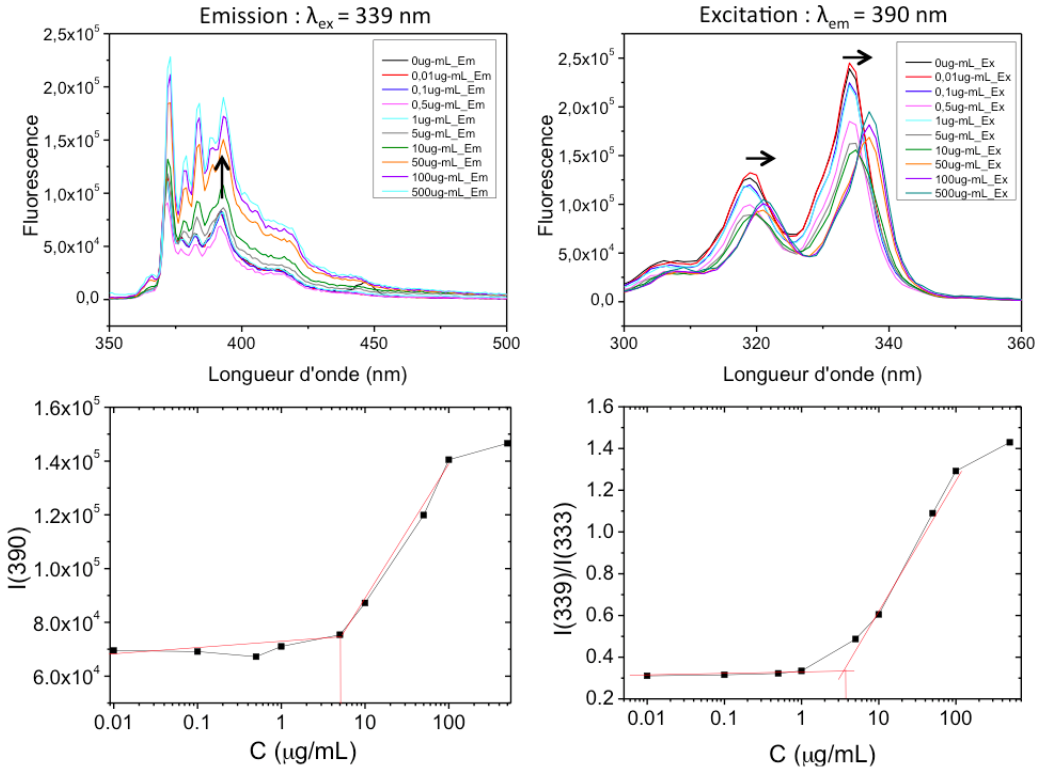



FIGURE IV.17 – (a) Spectres d'émission de fluorescence du pyrène (avec $\lambda_{ex}$ = 339 nm) pour des concentrations croissantes de polymères diblocs pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ à pH 7,4. (b) Spectres d'excitation du pyrène (avec $\lambda_{em}$ = 390 nm) pour des concentrations croissantes de polymère diblocs pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ à pH 7,4.(c) Intensité du bande à 390 nm sur le spectre d'émission de fluorescence en fonction de la concentration du polymère pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. (d) Le rapport des intensités à 339 nm et à 333 nm sur le spectre d'excitation de fluorescence en fonction de la concentration du polymère pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$.

molécule de pyrène absorbe plus qu'en absence de micelles. En traçant l'intensité de l'émission à 390 nm en fonction de la concentration de polymère il est aussi possible d'obtenir la CMC.
Sur la **figure IV.17**, se trouvent tous les spectres d'émission et d'excitation du pyrène en présence du polymère surfactant : pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ à différentes concentrations. Des spectres similaires ont été effectués pour tous les différents polymères surfactants.
Les solutions ont été réalisées à chaque fois à partir d'une solution mère de 500 µg/mL de polymère dans un tampon d'HEPES/NaCl (100 mM / 150 mM) à pH = 7,4. Des dilutions ont été effectuées avec la solution tampon pour avoir de nombreuses concentrations différentes dans des volumes de 2 mL. Dans chaque solution, 5 µL de pyrène préparé à $2.10^{-4}$ mol/L dans du THF a été ajouté. Chaque solution a ensuite été totalement homogénéisée par ultrasons pendant au moins 1 min.
Dans l'exemple présenté sur les courbes IV.17, le polymère pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ présente une CMC qui semble être inférieure à 5 µg/mL. Les autres polymères présentaient des CMC du même ordre de grandeur. Dans la suite de ce projet les polymères surfactants seront toujours utilisés

à des concentrations supérieures à leur CMC.

Par ailleurs, il est possible de faire exactement le même type d'expérience avec chaque polymère surfactant à une concentration fixée (et supérieure à la CMC) mais cette fois-ci en fonction du pH. Ainsi pour chaque polymère, le pH de formation des micelles pourra être obtenu. Les résultats sont présentés en **figure IV.18**. Pour chaque polymère le protocole suivant a été effectué. Sept tubes à essais sont préparés avec 1,9 mL de solution tampon ayant des pH différents (pH = 6,10 ou 6,60 ou 6,85 ou 7,10 ou 7,35 ou 7,60 ou 8,10) avec une concentration saline de [NaCl] = 150 mM afin d'être dans des conditions physiologiques. Dans chaque tube est ajouté 3 µL de pyrène préparé dans du THF à une concentration de $2.10^{-4}$ mol/L. Puis, le polymère est ajouté : 100 µL à 2 mg/mL (*i.e.* 100 µL/mL après dilution). Le polymère est, à chaque fois, ajouté en goutte à goutte lorsque la solution est sous vive agitation.

Sur la **figure IV.18**, il peut être observé que tous les polymères ayant un ratio R = DPA/SB > 1 semblent avoir le même comportement : formation de micelles dans une gamme de pH entre 6,6 et 7,1. Ce qui est très proche de leur pKa* (environ 7). En revanche, pour les polymères surfactants dont le ratio R est inférieur à 1 : les polymères $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$ et $pDPA_{25}$-b-$SB_{38}$, il semble que les micelles se forment à un pH supérieur à leur pKa* : autour de 7,35 pour le $pDPA_{120}$-b-$SB_{160}$ (ratio R = 0,75) et 7,6 pour le $pDPA_{25}$-b-$SB_{38}$ (ratio R = 0,65). Ceci suggère que lorsqu'il y a plus de SB que de DPA dans le polymère, il semble nécessaire de déprotoner une plus grande fraction du bloc DPA pour obtenir un cœur hydrophobe.

Lors de ces expériences, une autre observation a été faite : contrairement aux polymères pDPA, ces polymères ne précipitent pas à pH basique puisqu'ils forment des micelles. Ceci est vrai pour tous les polymères pDPA-b-SB étudiés sauf ceux ayant un R > 2 : le $pDPA_{25}$-b-$SB_9$ (R = 2,8) et $pDPA_{240}$-b-$SB_{100}$ (R = 2,4), où on observe l'apparition d'un précipité car les

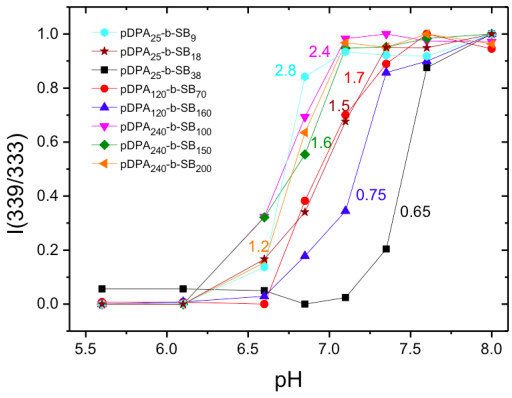



FIGURE IV.18 – Courbes présentant le rapport des intensités à 339 nm et à 333 nm sur les spectres d'excitation de fluorescence du pyrène en fonction du pH pour chaque polymère dibloc à une concentration de 100 µL/mL. Ces courbes montrent à partir de quel pH les différents polymères surfactants diblocs forment des micelles. Les ratios R = DPA/SB sont rajoutés sur les courbes pour plus de lisibilité.

solutions se troublent en milieu neutre ou basique. Pour tous les autres polymères pDPA-b-SB, l'absence de turbidité semble être un bon signe quant à la présence de micelles. Ceci va être confirmé par des analyses de DLS (Dynamic Light Scattering).

### IV.2.4 Analyses des micelles par DLS

Tous ces polymères pDPA-b-SB ont ensuite été analysés par DLS en milieu acide (pH 6,0) et en milieu basique (pH 7,5) à 150 mM de NaCl. La **figure IV.19** montre ces résultats avec en (a) les polymères se trouvant dans une tampon acide et en (b) les polymères qui ont été ajoutés en goutte à goutte dans des solutions tampons basiques sous vive agitation.
Les résultats de la DLS en milieu acide semblent suggérer que nos estimations par RMN $^1$H de la masse molaire de nos polymères ne sont pas trop éloignées de la réalité car on observe que le rayon hydrodynamique des polymères augmente avec leur masse molaire (g/mol) lorsqu'ils se trouvent en bon solvant. Les polymères synthétisés ont des Mw qui varient entre 7950 et 109 500 g/mol pour des rayons hydrodynamiques entre $\approx$ 2 et 8 nm $\pm$1 nm.

En milieu basique, les rayons hydrodynamiques des polymères pDPA$_{25}$-b-SB$_9$ et pDPA$_{240}$-b-SB$_{100}$ ne sont pas représentés sur la **figure IV.19(b)** car les tailles sont très grandes : de l'ordre du micromètre, ce qui confirme que ces polymères précipitent et ne forment pas de micelles. En revanche, pour les six autres polymères, des tailles de rayons hydrodynamiques pouvant correspondre à des micelles sont obtenus. Nous pouvons remarquer que pour un ratios R = DPA/SB très proche, plus le polymère est grand et plus les micelles formées sont grandes. Et aussi : pour un même premier bloc de pDPA, plus le nombre de SB est grand et plus les micelles semblent petites. Avec ces 6 polymères surfactants, nous obtenons des micelles ayant des rayons hydrodynamiques qui varient entre 10 et 40 nm. Les courbes de DLS à pH basique montrent que les objets formés sont monodisperses, comme montré avec le polymère pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ dans la **figure IV.19(c)**. Il serait nécessaire ici de faire du TEM à coloration négative pour bien connaître la morphologie de nos nano-objets. Par la suite, nous allons essayer de

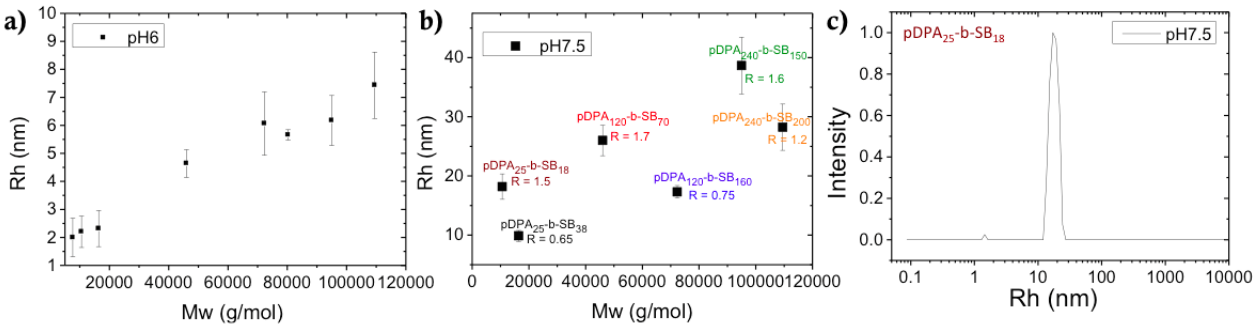



FIGURE IV.19 – Rayons hydrodynamiques des polymères surfactants pH-labiles obtenus par DLS : (a) en milieu tamponné acide avec [NaCl] = 150 mM et (b) en milieu tamponné basique avec [NaCl] = 150 mM. (c) Rayon hydrodynamique des micelles formées par le polymère pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ obtenu par DLS à pH basique.

stabiliser des agrégats contrôlés de NP avec ces micelles.

## IV.3 Auto-assemblage des micelles autour des NP-pDPA/LA

D'après les résultats précédents, les polymères surfactants ayant un ratio R = DPA/SB inférieur à 1 semblent avoir un pH de transition légèrement trop haut (> 7) par rapport à notre objectif : entre 6,5 et 7. Les ratios R > 2 ne semblent pas non plus convenir car ils s'agrègent au lieu de former des micelles. Pour la suite seuls deux polymères surfactants pDPA-b-SB sont sélectionnés : le $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ (R=1,5) et le $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$ (R=1,6). Ils ont un ratio similaire et des tailles différentes. Toutes les études de cette partie ont été effectuées avec le $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$. Par ailleurs, les NP étudiées dans cette partie sont toutes recouvertes du polymère $pDPA_{25}/LA_5$. Ici, nous allons aussi faire un abus de langage en parlant de micelles, il s'agit plutôt d'agrégats stabilisés par la présence du polymère surfactant.

### IV.3.1 Micelles encapsulant les AuG-pDPA/LA

La formation des micelles autour des AuG-pDPA/LA a été confirmée grâce à des analyses par DLS et des images TEM. Des micelles encapsulant uniquement des AuG-pDPA/LA ont d'abord été formées afin d'étudier la quantité de polymères surfactants à ajouter en fonction de la quantité de nanoparticules d'or pour la formation des micelles.

Dans la table IV.3, se trouvent différentes tailles de rayon hydrodynamique obtenues par DLS à pH 5,5 et à pH 7,5 de 0,45 nmol de AuG-pDPA/LA dans un volume de 2 mL avec différents équivalents de polymère surfactant. Ce dernier, seul, à pH basique forme des micelles d'environ une vingtaine de nanomètres. Pour simplifier les notations, 1 eq de pDPA-b-SB correspond à la quantité de polymères estimée nécessaire pour encapsuler ≈ 10 AuG et former un agrégat d'or d'environ 20 nm de diamètre. Ici, 1 eq correspond à 45 nmol de polymères pDPA-b-SB. Sans polymère surfactant, les AuG s'agrègent totalement en quelques minutes lors de leur passage en milieu basique. En DLS, la taille obtenue pour 0 eq est supérieure à > 5000 nm, ce qui confirme l'agrégation observée.

TABLE IV.3 – Rayons hydrodynamiques de différents systèmes obtenus par DLS (Dynamic Light Scattering) à différents pH. Dans la deuxième colonne, se trouve le rayon hydrodynamique de $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ à pH 5,5 et à pH 7,5. Dans les colonnes suivantes se trouvent les rayons hydrodynamiques de 0,45 nmol de AuG-pDPA/LA en présence de différents équivalents de $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ à pH 5,5 et à pH 7,5.

| **pH** | $pDPA_{25}$-$SB_{18}$ seul | AuG-pDPA/LA **0 eq** pDPA-b-SB | AuG-pDPA/LA **0,1 eq** pDPA-b-SB | AuG-pDPA/LA **1 eq** pDPA-b-SB | AuG-pDPA/LA **10 eq** pDPA-b-SB |
|---|---|---|---|---|---|
| **5,5** | 2,2 ± 1 nm | 9 ± 3 nm | 9 ± 3 nm | 9 ± 3 nm | 9 ± 3 nm |
| **7,5** | 23 ± 5 nm | > 5000 nm | 520 ± 30 nm | 130 ± 20 nm | 35 ± 10 nm |

Lorsque suffisamment de polymères surfactants sont ajoutés, plus aucune agrégation n'est observable à l'œil nu. Il est aussi intéressant de remarquer que plus le polymère surfactant est en quantité importante plus les micelles formées sont de petites tailles. Ceci a été remarqué en DLS, table IV.3 et en microscopie TEM IV.20.

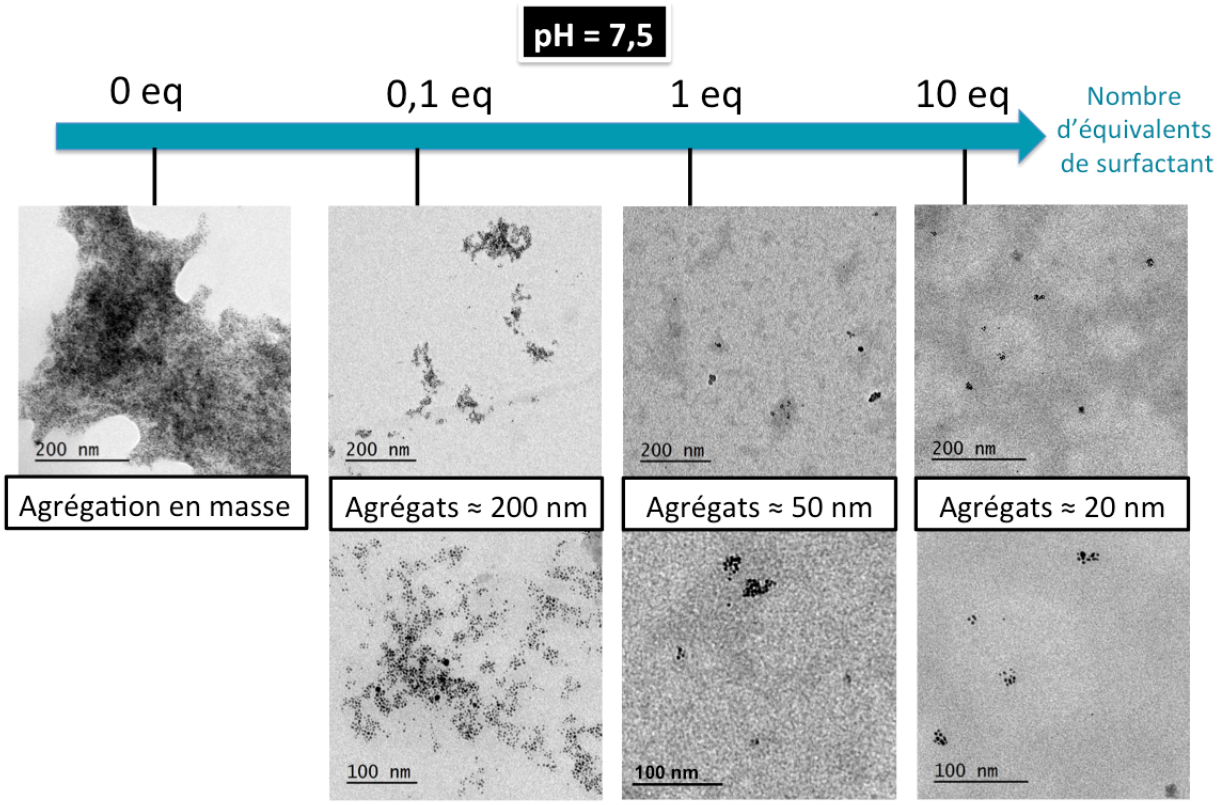



Figure IV.20 – Images de microscopie électronique en transmission (TEM) de la solution avec AuG-pDPA/LA avec un nombre croissant d'équivalents de polymères surfactants $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$, réalisées à pH 7,5.

### IV.3.2 Micelles encapsulant les QD-pDPA/LA

Nous avons étudié un système composé de QD-pDPA/LA purifiés et de polymères surfactants : $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$. Des analyses de DLS montrent aussi la formation de micelles à pH 7,5 autour de petits agrégats de particules en présence du polymère surfactant, alors qu'il y a une agrégation massive en son absence. Des analyses de fluorescence ont été réalisées à la fois en mesure de PL et d'intensité de PL afin de vérifier qu'il n'y a pas de transfert d'énergie entre QD lorsque ceux-ci se trouvent sous forme d'agrégats stabilisés à l'intérieur de micelles. Comme observé sur la **figure IV.21**, en absence de particules d'or, aucune diminution de fluorescence ni d'accélération du temps de vie n'est observée.

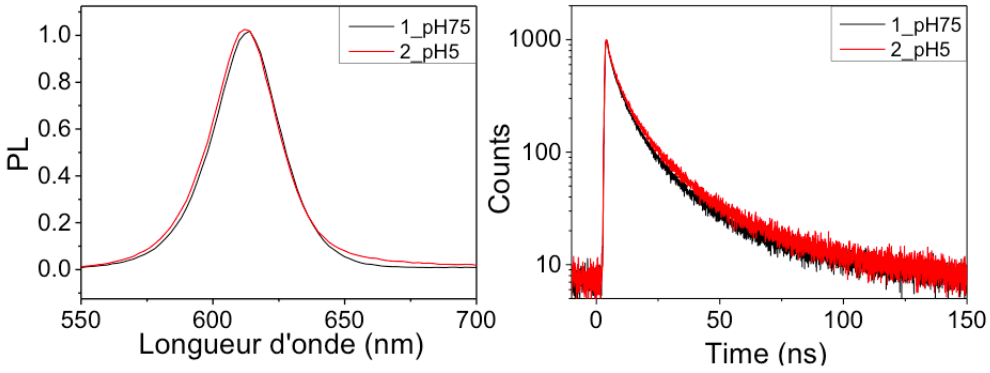



FIGURE IV.21 – Spectres de PL et d'intensité de PL résolue en temps avec des QD-pDPA/LA et 1 eq de polymère surfactant $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$.

### IV.3.3 Micelles encapsulant les AuNP-pDPA/LA et les QD-pDPA/LA

Désormais nous voulons former des micelles encapsulant à la fois des QD-pDPA/LA et des AuG-pDPA/LA. Les micelles semblent là aussi se former. Typiquement, 0,1 nmol de QD-pDPA/LA purifiés sont ajoutés dans une solution tampon (pH 5,5 ou 7,5) contenant 0,45 nmol de AuG-pDPA/LA ; puis 10 eq de $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ ont été ajoutés en goutte à goutte sous vive agitation. Les images TEM montrent que des micelles sont bien formées et que celles-ci encapsulent bien à la fois des QD et des AuNP. Toutefois, les tailles de micelles obtenues n'ont pas l'air très monodisperses : des tailles allant de 50 à 100 nm ont été obtenues.

Par microscopie TEM, nous avons pu confirmer la formation de micelles avec différents types de nanoparticules d'or : des AuG, des Au8 mais aussi des Au5 et aussi avec différents types de QD : CdSe@CdS/ZnS et aussi avec des PbS/ZnS. Des images TEM seront montrées dans la partie suivante.

## IV.4 Micelles fluorescentes sensibles au pH

Grâce à toutes les analyses réalisées précédemment, l'étude du transfert d'énergie à l'intérieur des micelles entre les QD-pDPA/LA et les AuG-pDPA/LA est rendue possible. Plusieurs types de micelles semblent prometteurs dans ce projet. Il a été très intéressant de faire varier plusieurs paramètres afin de comprendre au mieux la formation de ces micelles avec, pour objectif, que celles-ci soient les plus stables possibles et qu'il y ait un maximum de différence de fluorescence entre pH 7,5 (présence de micelles) et pH 6,0 (dissolution des micelles et libération des NP). Dans cette partie j'ai pu étudier l'influence de :

- la présence ou l'absence du surfactant pH-labile (*i.e.* le pDPA-b-SB) ;
- la quantité ajoutée de ce surfactant ;
- la taille du polymère surfactant pH-labile ;
- la taille des AuNP pour le transfert d'énergie ;
- le ratio AuNP/QD.

### IV.4.1 Influence de la présence du surfactant pH-labile

Tout d'abord, l'influence de la présence du polymère surfactant pH-labile a été étudiée. La **figure IV.22** résume tous les résultats obtenus avec ou sans polymère surfactant $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ pour le système suivant : 0,1 nmol de QD-$pDPA_{24}/LA_5$ (CdSe@CdS/ZnS) avec 0,45 nmol de AuG-$pDPA_{24}/LA_5$ dans un volume de 2 mL . La colonne de droite présente les résultats de ce système sans polymère surfactant, dans celle de gauche ont été ajoutés 10 eq du polymère surfactant.

Sans polymère surfactant, en milieu basique ou neutre, les particules s'agrègent en masse et cela est observable même à l'œil nu comme observé sur la photo IV.22(d). Ces agrégats ne sont pas stables. En présence de polymères surfactants (ici 10 équivalents), il n'y a pas d'agrégation massive des particules, ce qui confirme la formation de micelles qui viennent stabiliser des petits agrégats de NP qui sont alors hydrophobes. Grâce aux images TEM, on remarque que, sans polymère surfactant, de gros agrégats sont formés : ceux-ci sont très compacts et ne cessent de grossir jusqu'à atteindre des tailles micro- voire millimétriques !

Pour ce qui est de l'efficacité du transfert d'énergie, il est plus important sans surfactant : 90% de la fluorescence est inhibée en passant de pH 6 à pH 7,5, contre 50% avec 10 eq de surfactant. Bien qu'il y ait le même ratio de AuG/QD initialement dans la solution, avec autant d'équivalent de surfactant, il est probable qu'il y ait un certain nombre de QD seuls ou avec très peu de AuG au sein d'une même micelle. En présence de surfactants, la taille de la micelle va limiter le nombre moyen de particules d'or proches d'un QD. En revanche, en l'absence de polymère surfactant il y a dans les agrégats un nombre très important de AuG et de QD.

Lorsque le surfactant est présent, en passant en milieu basique, des micelles de la centaine de nanomètres sont formées en piégeant des QD et des AuG entrainant ici 50% de transfert d'énergie. Puis, lorsque ces micelles se trouvent à nouveau dans un milieu tamponné à pH 6,0, celles-ci se dissolvent. Les QD retrouvent leur fluorescence initiale et toutes les NP sont alors stables en solution. Trois cycles de pH ont été réalisés *in vitro*, et cette réversibilité est observée à chaque cycle.

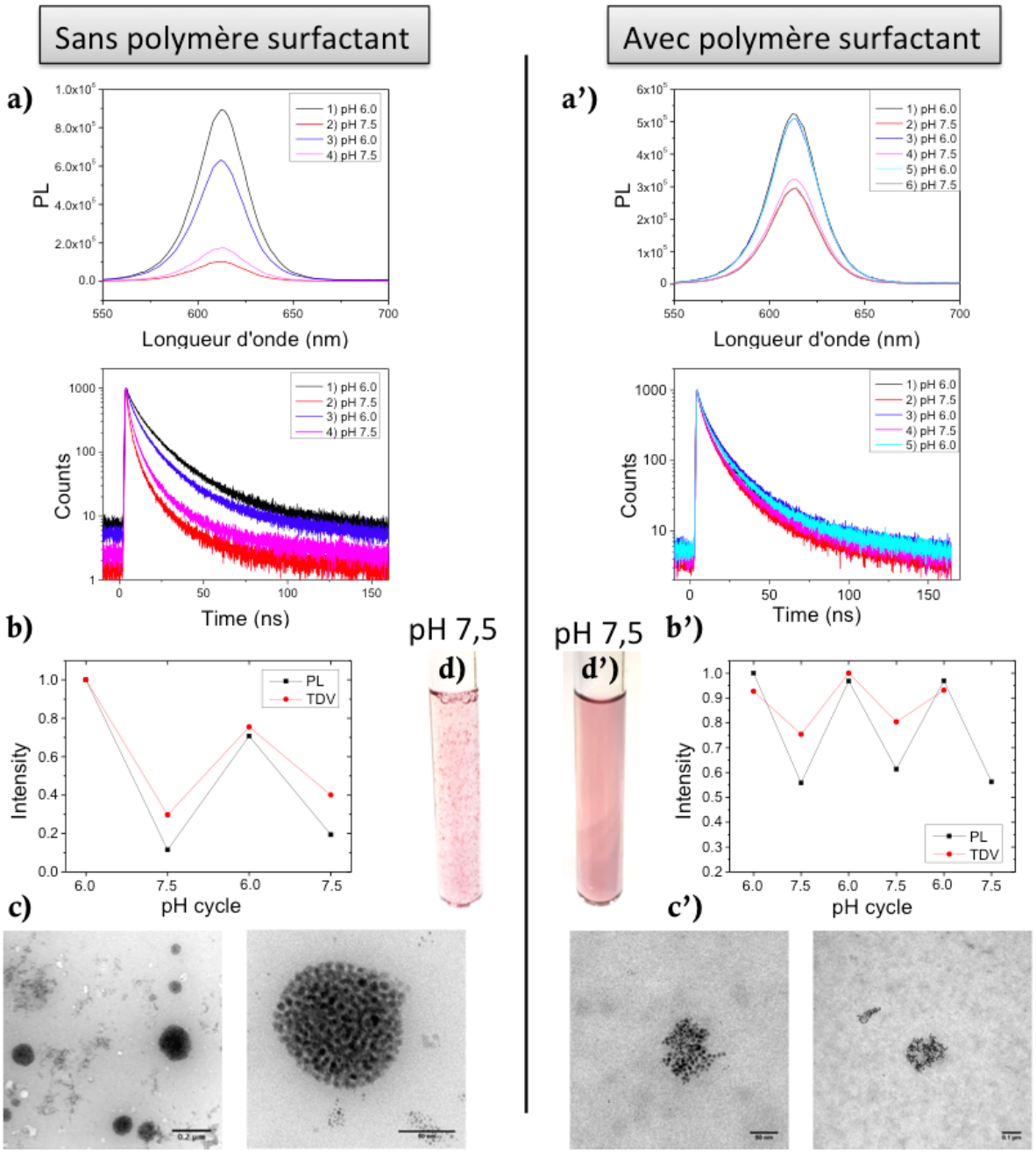



FIGURE IV.22 – Système étudié : 0,1 nmol de QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 0,45 nmol de AuG-pDPA$_{24}$/LA$_5$, avec ou sans 10 eq de polymères surfactants : pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. (a) et (a') Spectres de PL (haut) et intensité de PL résolue en temps (bas) à différents pH effectués successivement (2 ou 3 cycles entre pH 7,5 et 6,0). (b) et (b') Intensité du transfert d'énergie obtenue avec les courbes de PL et d'intensité de PL résolue en temps (avec le TDV = Temps de vie moyen avec $\tau$ estimé) en fonction du pH. (c) et (c') Images TEM obtenues en préparant initialement des solutions à pH 7,5. (d) et (d') Photo des tubes obtenus : une agrégation massive est observée seulement lorsque le surfactant n'est pas présent. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

### IV.4.2 Influence de la quantité du surfactant pH-labile

Il est ensuite possible d'étudier l'influence de cette quantité de polymères surfactants pH-sensibles. Le même système que précédemment est préparé (0,1 nmol de QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 0,45 nmol de AuG-pDPA$_{24}$/LA$_5$) mais avec des quantités en polymères surfactants pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ différentes : 1 ou 10 équivalents (dans un volume de 2 mL). Les résultats sont présentés en **figure IV.23**. Dans chacun de ces deux cas, aucune agrégation massive n'est observée, des micelles sont bien formées mais ayant des tailles différentes : comme montré précedemment, plus il y a de surfactants plus les micelles sont de petites tailles. Plus les micelles sont grandes, plus il peut donc y avoir de particules d'or proches d'un QD ce qui augmente le transfert d'énergie. Ce transfert d'énergie est d'environ 70 % lorsqu'il y a 1 eq de polymères surfactants contre 50 % lorsqu'il y a 10 eq de polymères surfactants. Ce transfert d'énergie est toujours réversible peu importe la quantité de surfactant.

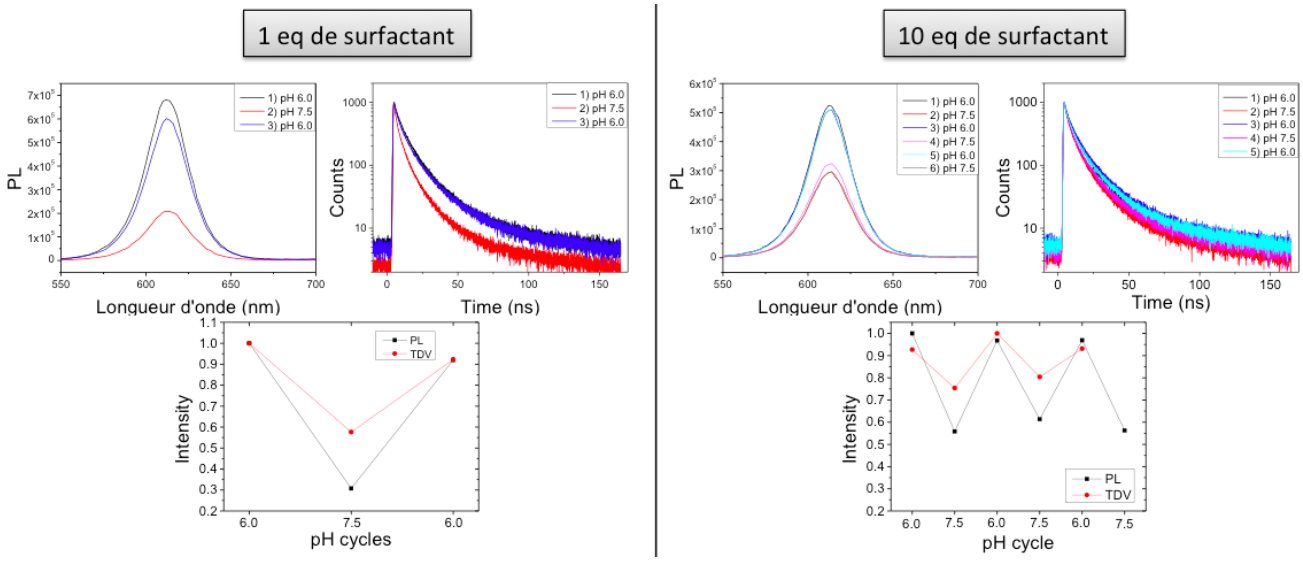



FIGURE IV.23 – Système étudié : 0,1 nmol de QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 0,45 nmol de AuG-pDPA$_{24}$/LA$_5$, avec soit 1 eq soit 10 eq de polymères surfactants : pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. Les spectres de PL et d'intensité de PL résolue en temps sont présentés en fonction du pH pour un cycle (6,0 puis 7,5 puis 6,0). L'intensité du transfert d'énergie obtenue avec les courbes de PL et le TDV est aussi présentée dans chacun des deux cas. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

### IV.4.3 Influence de la taille du polymère surfactant pH-labile

Deux tailles de polymères surfactants pH-labiles ont été testées : le pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ (R=1,5) et le pDPA$_{240}$-b-SB$_{150}$ (R=1,6), ils possèdent le même ratio et ont des tailles différentes ce qui leur permet de former des micelles vides de différentes tailles : environ 20 nm de rayon hydrodynamique pour le plus petit et 40 nm pour le plus grand. Ces rayons proviennent des mesures de DLS montrés en **figure IV.19**.

Ici, un premier système est étudié avec des AuG : il se compose de 0,1 nmol de QD-

$pDPA_{24}/LA_5$ dans un volume de 2 mL. Une première étude a été réalisée en ajoutant 0,45 nmol AuG-$pDPA_{24}/LA_5$ en testant chacun des deux polymères surfactants ($pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ et $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$) avec 1 équivalent. Dans les deux cas, une diminution de la fluorescence des QD de 70 % a été mesurée entre pH 7,5 et pH 6. Il n'y a pas de différence entre les deux polymères surfactants utilisés.

En revanche, la même étude a été effectuée avec des Au5 (à la place des AuG) en présence aussi de 1 équivalent polymères surfactants (soit $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ soit $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$). Cette fois-ci une différence de transfert d'énergie a été observée. Avec le polymère $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$ il a y 75% de transfert d'énergie entre les formes basique et acide alors qu'il n'y en a que 50% avec le polymère $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$. Cette différence est certainement due à une différence de taille de micelles formées entre les deux polymères surfactants : avec des micelles plus grandes il doit y avoir en moyenne plus de particules dans une micelle. Avec des micelles plus petites, il y a un plus forte probabilité pour que les particules soient plus isolées les unes des autres.

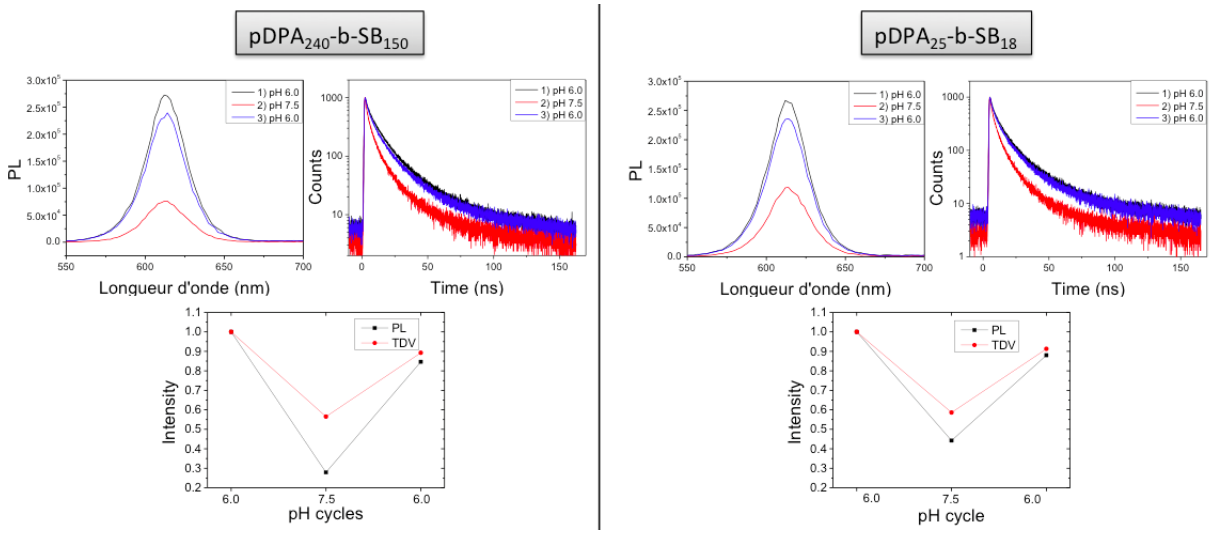



FIGURE IV.24 – Système étudié : 0,1 nmol de QD-$pDPA_{24}/LA_5$ avec 0,1 nmol de Au5-$pDPA_{24}/LA_5$, avec 1 eq de polymères surfactants soit $pDPA_{25}$-b-$SB_{18}$ soit $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$. Les spectres de PL et d'intensité de PL résolue en temps sont présentés en fonction du pH pour un cycle (6,0 puis 7,5 puis 6,0). L'intensité du transfert d'énergie obtenue avec les courbes de PL et le TDV est aussi présentée dans chacun des deux cas. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

### IV.4.4 Influence de la taille et de la quantité des AuNP

Afin de pouvoir comparer l'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la taille des particules d'or, il faut se mettre dans les meilleures conditions observées jusqu'alors : le polymère surfactant utilisé sera le $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$ car il forme des micelles plus grandes à pH basique, ce qui permet d'assembler plus de particules dans une micelle. Les systèmes comparés comportent tous : 0,1 nmol de QD-$pDPA_{24}/LA_5$, x nmol de AuG(ou Au5)-$pDPA_{24}/LA_5$ (avec x variable)

et 1 équivalent de $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$.

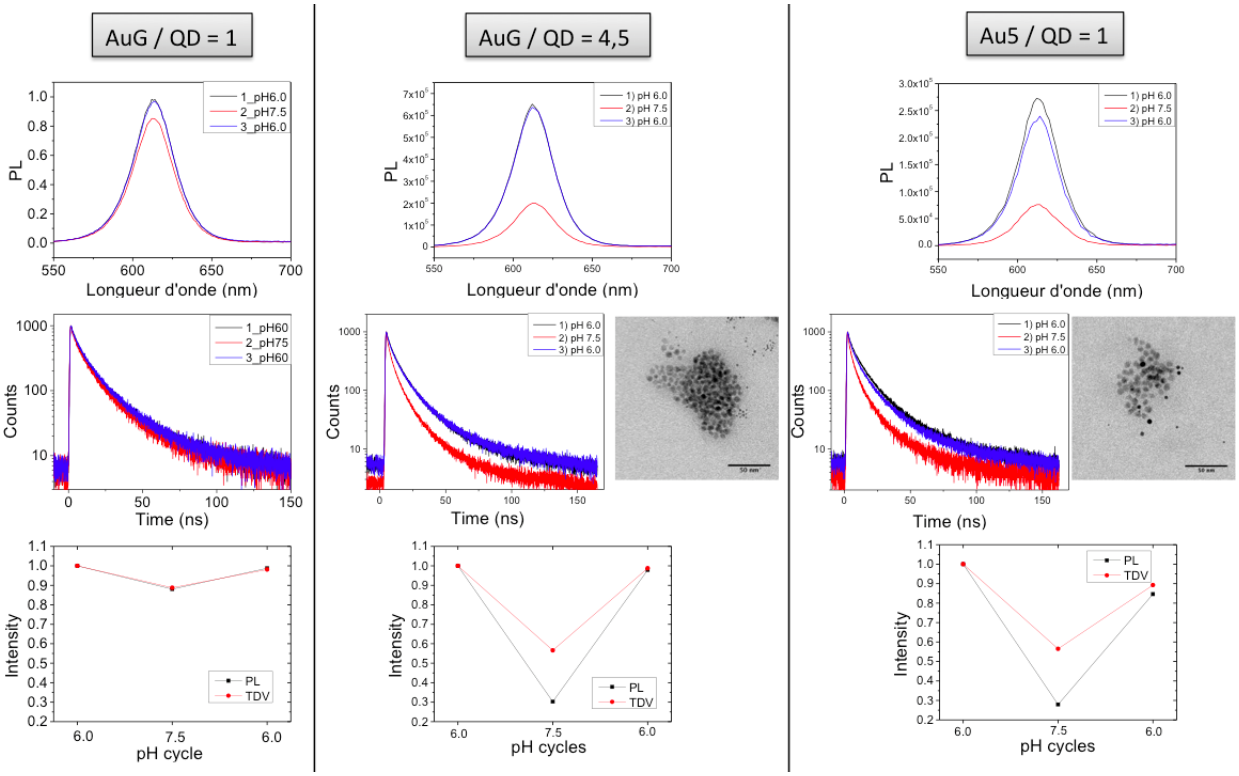



FIGURE IV.25 – Système étudié : 0,1 nmol de QD-$pDPA_{24}/LA_5$ avec soit 0,1 nmol de AuG-$pDPA_{24}/LA_5$, soit 0,45 nmol de AuG-$pDPA_{24}/LA_5$, soit 0,1 nmol de Au5-$pDPA_{24}/LA_5$, avec 1 eq de polymères surfactants $pDPA_{240}$-b-$SB_{150}$. Les spectres de PL et d'intensité de PL résolue en temps sont présentés en fonction du pH pour un cycle (6,0 puis 7,5 puis 6,0). L'intensité du transfert d'énergie obtenue avec les courbes de PL et le TDV est aussi présentée dans chacun des deux cas. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

Il est possible, tout d'abord, d'effectuer une comparaison du transfert d'énergie avec N = 1 et N = 4,5 avec des AuG-$pDPA_{24}/LA_5$, à gauche et au centre de la **figure IV.25**. Une différence importante est observée. L'efficacité de ce transfert d'énergie n'atteint que 15 % avec N = 1 alors qu'il vaut 75 % pour N = 4,5. En continuant à augmenter la quantité d'or ce pourcentage n'augmente quasiment pas. Pour N = 10, le transfert d'énergie obtenu est de 80 %.

Expérimentalement, il a aussi été observé que le système composé de 0,45 nmol de AuG est très proche du système composé de 0,1 nmol de Au5. Les transferts d'énergie obtenus dans ces deux cas semblent très proches expérimentalement. Les résultats sont présentés en **figure IV.25**. Dans les deux cas, il y a environ 75% de transfert d'énergie. Par ailleurs, les particules d'or de 8 nm ont aussi été testées mais même à pH acide un transfert d'énergie non négligeable a été observé.

Afin de voir si ces résultats sont cohérents avec la théorie, j'ai pu tracer les courbes d'efficacité de transfert d'énergie par NSET ($E_{NSET}$) pour notre système, en équation rappelée en IV.1. Le

$d_0$ correspond à la distance caractéristique où l'efficacité du transfert vaut 0,5. Cette distance caractéristique se calcule à l'aide d'équations précédemment détaillées.

$$E_{NSET} = \frac{N}{N + \left(\frac{d}{d_0}\right)^4} = \frac{1}{1 + \left(\frac{d}{d_0.N^{1/4}}\right)^4} \tag{IV.1}$$

Ces équations permettent de déterminer le $d_0$ de chaque système, les valeurs obtenues sont les suivantes avec comme donneurs les QD visibles CdSe@CdS/ZnS ($\lambda_{Em}$ = 610 nm ; QY = 0,3 ; $\epsilon_1$ = 1.76 ; $n_m$ = 1.33 ; $n_r$ = 0.226) et comme accepteurs, des particules d'or de différentes tailles :

- avec AuG (r=1 nm ; $\epsilon_{610}$=1,87.10$^5$M$^{-1}$cm$^{-1}$) : $d_0$ = 4,7 nm
- avec Au5 (r=2,5 nm ; $\epsilon_{610}$=1,94.10$^6$M$^{-1}$cm$^{-1}$) : $d_0$ = 6,6 nm
- avec Au8 (r=4 nm ; $\epsilon_{610}$=10,3.10$^6$M$^{-1}$cm$^{-1}$) : $d_0$ = 9,0 nm.

Grâce à ces valeurs de $d_0$ pour chaque système (ici chaque taille de AuNP) il est possible de tracer la courbe d'efficacité de transfert d'énergie en fonction du nombre de particules d'or, en **figure IV.26(a)**. Ce que l'on remarque tout d'abord est que plus la particule d'or est grande plus le transfert est efficace car il a lieu à une distance qui est plus grande.

Aussi, il est compréhensible qu'expérimentalement un transfert d'énergie non nul ait été observé avec les Au8 même à pH acide car sur la courbe IV.26(d) on remarque que le transfert d'énergie a lieu déjà pour de grandes distances (>20 nm) entre Au8 et QD. Dans ce cas, lorsqu'il y a un transfert d'énergie non nul même quand les particules sont libres en solution et mobiles (grâce aux mouvement Brownien), nous appellerons ce phénomène : un transfert d'énergie dynamique.

Théoriquement, nous pouvons également comparer les courbes d'efficacité de transfert d'énergie pour N=1 avec les Au5 et N=1 puis N=4,5 pour les AuG (N = nombre de AuNP/QD). Ces courbes sont présentées en **figure IV.25**, avec la même échelle en abscisse que les courbes présentées précédemment. Le transfert d'énergie est effectivement moins efficace dans le cas des AuG avec N=1 que dans les deux autres cas. De plus, les courbes pour Au5 avec N=1 et AuG avec N=4,5 sont très proches. Théoriquement, ces deux systèmes ont effectivement des courbes d'efficacité de transfert d'énergie similaires. Ces résultats théoriques semblent être en bonne adéquation avec les résultats expérimentaux. Attention, il faut cependant bien se souvenir que ce modèle théorique "parfait" ne correspond pas exactement à notre expérience : ici dans chaque micelle nous ne connaissons pas exactement le nombre de AuNP par QD et ce nombre n'est qu'une moyenne. De plus les synthèses des NP et des polymères ne sont pas parfaitement monodisperses donc toutes les particules d'or ne se trouvent pas exactement à la même distance d'un QD.

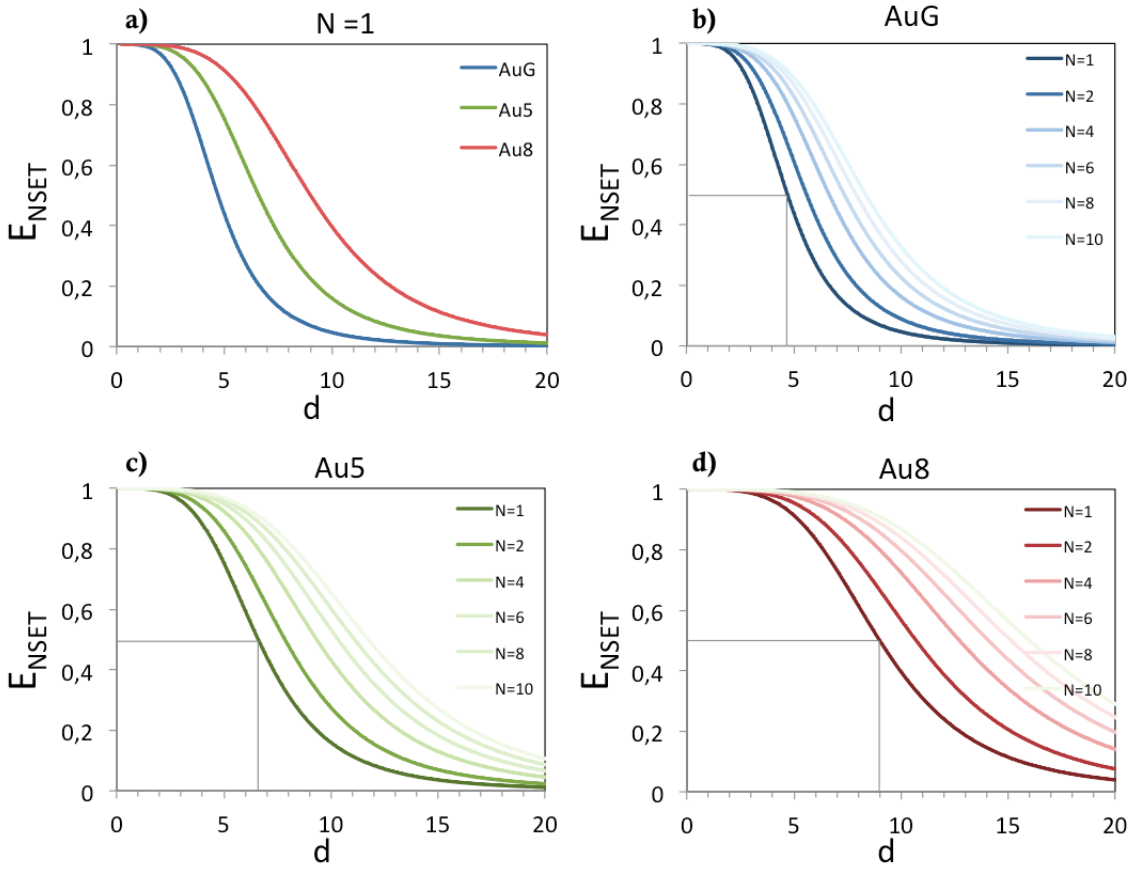



FIGURE IV.26 – Courbes d'efficacité de transfert d'énergie en fonction de la distance entre donneur et accepteur obtenues avec la théorie du NSET pour chacun des systèmes avec comme donneur : CdSe@CdS/ZnS et comme accepteur : AuNP. a) Comparaison des courbes de $E_{NSET}$ pour les trois tailles de AuNP avec N=1 (nombre d'accepteur par donneur). b) Courbes de $E_{NSET}$ avec comme accepteur : AuG, en fonction de N. c) Courbes de $E_{NSET}$ avec comme accepteur : Au5, en fonction de N. d) Courbes de $E_{NSET}$ avec comme accepteur : Au8, en fonction de N.

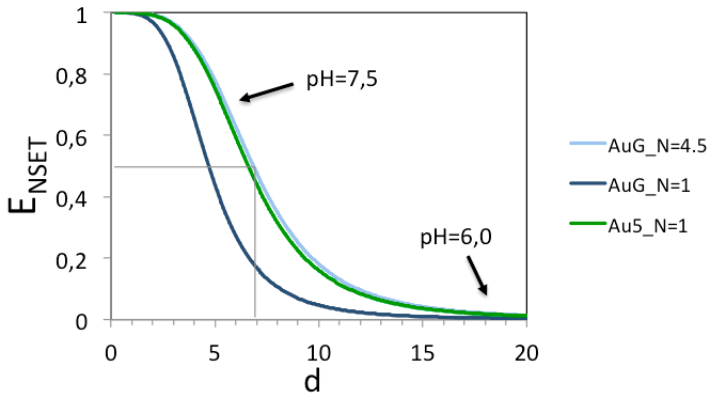



FIGURE IV.27 – Courbes théoriques d'efficacité de transfert d'énergie de NSET en fonction de la distance entre donneur et comme accepteur soit AuG avec N=4,5 ou N=1 ; soit Au5 avec N=1.

### IV.4.5 Résultats préliminaires avec des sondes visibles et SWIR en mesures ratiométriques

Les systèmes développés dans ce projet pourraient certainement être utilisés *in vivo* seuls mais à condition d'avoir un contraste très important entre pH acide et basique. Sinon, ces systèmes peuvent aussi être testés *in vivo* par mesures ratiométriques avec une seconde population de QD insensibles au pH.
Afin d'ajouter une preuve de concept supplémentaire nous montrons que ces systèmes fonctionnent en mesures ratiométriques.

#### QD visibles

Avec les QD visibles, il a été possible d'obtenir des micelles à l'intérieur desquelles le transfert d'énergie atteint 75% à pH neutre, la fluorescence est donc fortement diminuée. Puis, après passage en milieu acide, la fluorescence est totalement retrouvée.

Des analyses ratiométriques ont été réalisées par la suite et le résultat est présenté en **figure IV.28**. Notre système se compose de 0,1 nmol de QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$, de 0,45 nmol de AuG-pDPA$_{24}$/LA$_5$ et de 1 équivalent de polymères surfactants pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. Ce système a été mis en présence d'une seconde population de QD émettant à 650 nm et recouverts d'un petit ligand non sensible au pH : le TASB. A pH 7,5, les micelles sont formées, cela correspond à la courbe bleue de la **figure IV.28(a)**, puis à pH 6,0 les micelles se dissocient et libèrent les QD et les AuG ce qui augmente le fluorescence de 40% ici. En retournant ensuite à pH 7,5 les micelles se forment à nouveau sans encapsuler les QD-TASB qui restent toujours en solution et conservent leur fluorescence initiale.

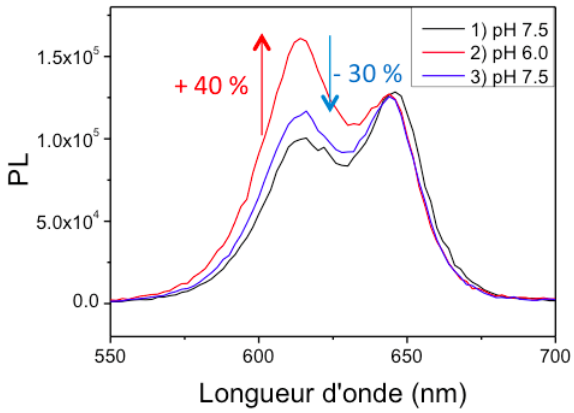



FIGURE IV.28 – Mesures ratiométriques bicolores avec les micelles formées par le surfactant pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ et encapsulant des QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$ et des AuG-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec émission maximale à 610 nm et des QD-TASB non sensibles au pH ayant une émission maximale à 650 nm. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

### QD SWIR

Les meilleures conditions sélectionnées pour les QD SWIR sont les suivantes : 0,1 nmol de QD-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 1,0 nmol de AuG-pDPA$_{240}$/LA$_{15}$ (donc N = 10) et 1 équivalent de polymères surfactants pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. Ce système permet de former des micelles dont la fluorescence est inhibée à presque 80% et ceci est réversible sur plusieurs cycle de pH comme il peut être observé sur la **figure IV.29**.

Comme ce système fonctionne, des mesures ratiométriques ont été effectuées en présence d'une seconde population de QD émettant à 1100 nm et recouverts de ligands non sensibles au pH : le TASB. Les résultats des mesures ratiométriques bicolores sont présentés en **figure IV.30**. Lors du passage d'un pH 7,5 à 6,0, les micelles s'ouvrent et libèrent les NP ce qui augmente la fluorescence de 60% et ceci est réversible.

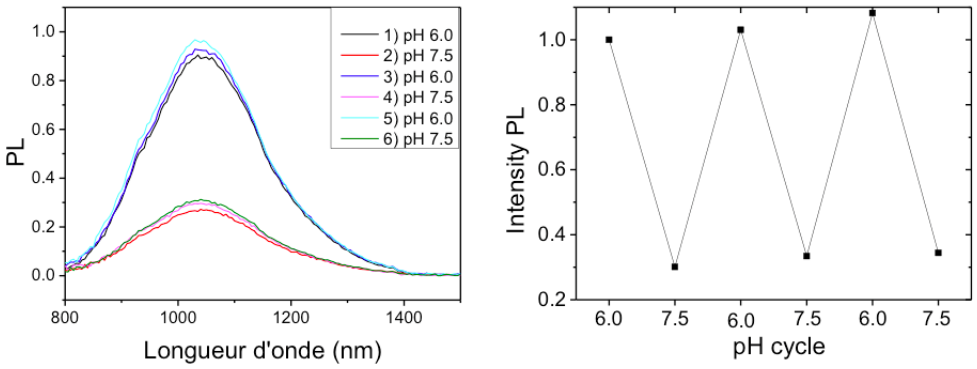



FIGURE IV.29 – Système étudié : 0,1 nmol de QDSWIR-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 0,5 nmol de AuG-pDPA$_{240}$/LA$_{15}$ et avec 1 eq de polymères surfactants pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$. Les spectres de PL sont présentés en fonction du pH pour plusieurs cycles (6,0 entre 7,5). L'intensité du transfert d'énergie obtenue avec les courbes de PL est aussi présentée. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

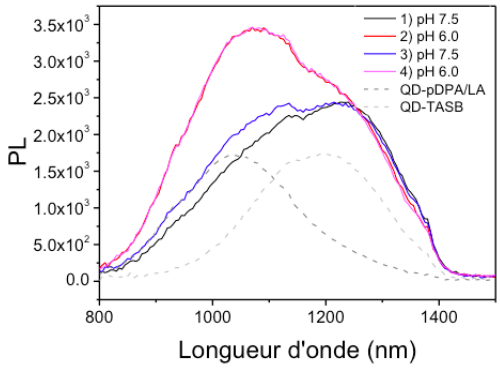



FIGURE IV.30 – Mesures ratiométriques bicolores avec les micelles formées par 1 eq de surfactant pDPA$_{25}$-b-SB$_{18}$ et encapsulant 0,1 nmol de QDSWIR-pDPA$_{24}$/LA$_5$ avec 0,5 nmol de AuG-pDPA$_{240}$/LA$_{15}$ avec émission maximale à 1100 nm et des QDSWIR-TASB non sensibles au pH ayant une émission maximale à 1250 nm. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

## Conclusion du chapitre IV

En résumé, dans ce chapitre, j'ai proposé un concept nouveau de micelles formées à partir de polymère surfactant pH-labile pDPA-b-SB qui permet d'encapsuler à pH neutre ou basique des NP recouvertes d'un autre polymère sensible au pH : le pDPA/LA. Ces micelles devraient être très furtives car leur partie hydrophile extérieure se compose de blocs zwitterioniques de sulfobétaines, ce qui devrait réduire fortement les interactions non spécifiques lors de leur injection dans le sang pour des applications *in vivo*. L'objectif ici était de fabriquer des sondes de pH qui s'activent uniquement dans des milieux acide (à un pH $< 7$), comme par exemple le milieu extracellulaire des tumeurs solides. Pour cela les NP encapsulées dans les micelles sont des QD (visibles ou SWIR) et des AuNP qui peuvent inhiber la fluorescence des QD par transfert d'énergie non radiatif, si celles-ci sont proches spatialement des QD. Ces particules ne sont pas liées de façon covalente, donc dès l'ouverture des micelles, les QD retrouvent leur fluorescence initiale.

Après une optimisation des différents paramètres de ces nouveaux nano-objets, il est possible de créer des micelles dont la fluorescence des QD (visibles ou SWIR) est initialement diminuée de 75% puis lors de l'ouverture des micelles en milieu acide, la fluorescence initiale est totalement retrouvée. Les résultats expérimentaux obtenus dans ce chapitre semblent plutôt bien correspondre à la théorie du NSET détaillée dans le chapitre I de cette thèse. Ces résultats sont prometteurs car ils fonctionnent pour différents types de QD (visibles et SWIR) mais aussi avec différents types de particules d'or. Par ailleurs, des premiers résultats expérimentaux ont été obtenus avec des GNR et les résultats semblent très encourageants.

## Perspectives du chapitre IV

Cette nouvelle nano-sonde de pH semble prometteuse d'après les résultats *in vitro*, d'autant plus qu'elle est adaptable à tout type de QD et de particules d'or, ce qui ouvre de nouvelles perspectives dans l'imagerie du pH *in vivo*. Il est toutefois nécessaire de continuer à optimiser le ratio N = AuNP/QD pour voir s'il est possible d'augmenter encore le contraste de la fluorescence en milieu acide et basique.

Pour aller encore plus loin dans ce projet les particules d'or utilisées peuvent aussi être des nano-batônnets car, au niveau de leur bande plasmonique longitudinale, elles présentent un très grand coefficient d'extinction molaire, ce qui leur permettrait d'être d'excellent accepteur de NSET. Ceci permettrait très certainement d'augmenter encore la différence de fluorescence entre pH 6 et pH 7,5.

Par ailleurs, les AuNP libérées peuvent également servir pour faire de la thérapie. Cette sonde pourrait permettre à la fois de faire de l'imagerie optique *in vivo* et de la thérapie des

tumeurs solides.

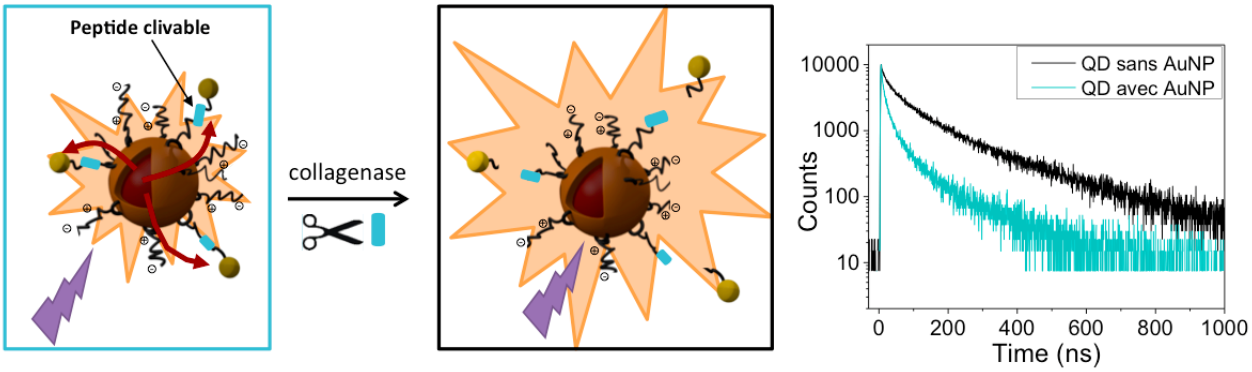
Lorsque les micelles se dissocient, libérant les nanoparticules : les QD retrouvent leur fluorescence initiale et les AuNP, grâce à leur chimie de surface désormais chargée positivement, pourraient pénétrer à l'intérieur des cellules cancéreuses. En effet, l'équipe de Park *et al.* montre que la chimie de surface des NP influe sur leur endocytose et que les NP recouvertes de ligands chargés positivement se font plus endocyter que celles recouvertes de ligands neutres ou négatifs [292]. Il pourrait, éventuellement, être possible de faire par la suite de la radiothérapie ou de la photothermie afin de détruire les cellules cancéreuses.

Chapitre V

# Détection de l'activité enzymatique par imagerie à fenêtre temporelle

**Résumé du chapitre**

L'objectif de ce projet est la détection d'enzymes collagénases par imagerie à fenêtres temporelles. La collagénase est une enzyme capable de cliver certains assemblages d'acide aminées. Dans ce projet, nous proposons de greffer sur des Quantum Dots un ou plusieurs peptide(s) clivable(s), chacun accroché à un accepteur d'énergie : soit une molécule organique soit des nanoparticules d'or. Par transfert d'énergie (soit FRET soit NSET) la fluorescence des QD diminue ainsi que son temps de vie à l'état excité (obtenu en mesurant l'intensité de PL résolue en temps). En présence d'enzyme collagénase, le peptide est clivé ce qui éloigne le QD de ses accepteurs et la fluorescence ou le temps de vie retrouvent leur état initial. Dans ce projet nous montrons que des études de cinétique enzymatique peuvent être réalisées uniquement avec l'intensité de PL résolue en temps, ce qui ouvre la voie à des applications en imagerie à fenêtre temporelle.



## Sommaire

**V.1 Les Quantum Dots $CuInSe_2$@ZnS . . . . . 173**
V.1.1 Synthèse et caractérisations . . . . . 173
V.1.2 Passage des QD dans l'eau et échange de ligands . . . . . 176
V.1.3 Fluorescence et temps de vie des QD NIR . . . . . 177
V.1.4 Stabilité des particules *in vivo* . . . . . 178
**V.2 L'imagerie à fenêtre temporelle . . . . . 179**
V.2.1 Principe et montage optique . . . . . 179
V.2.2 Imagerie à fenêtre temporelle *in vivo* . . . . . 181
**V.3 Détection d'activité enzymatique par imagerie à fenêtre temporelle 182**
V.3.1 Principe de la nano-sonde . . . . . 182
V.3.2 Principe de l'imagerie à fenêtre temporelle pour la mesure de transfert d'énergie . . . . . 183
V.3.3 Nano-sonde avec des accepteurs organiques . . . . . 185
V.3.4 Nano-sonde avec des accepteurs inorganiques : AuNP . . . . . 188
V.3.5 Optimisation de la détection à fenêtres temporelles . . . . . 189
V.3.6 Détection de la collagénase et mesure de l'activité enzymatique . . . . 191

## Introduction et objectifs du projet

Les principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins lors du développement d'une tumeur solide) sont les suivantes :

1. Les tumeurs sécrètent diverses molécules endothéliales qui sont exportées hors des cellules tumorales et diffusent à travers le tissu pour atteindre les vaisseaux sanguins.
2. Les molécules angiogéniques stimulent la production de collagénases et de l'activateur du plasminogène (enzyme permettant d'entrainer la fibrinolyse c'est à dire la dégradation des fibrines) par les cellules endothéliales. Ces deux enzymes permettent de dégrader la membrane basale entourant le vaisseau sanguin.
3. Les cellules endothéliales vont alors migrer vers la source du stimulus, c'est à dire la tumeur, et amorcer le bourgeonnement du vaisseau sanguin parental.
4. Les cellules endothéliales prolifèrent rapidement pour permettre aux vaisseaux de prendre une expansion puis permettre un remodelage du réseau capillaire [293].

La tumeur est alors vascularisée et peut continuer à croître.

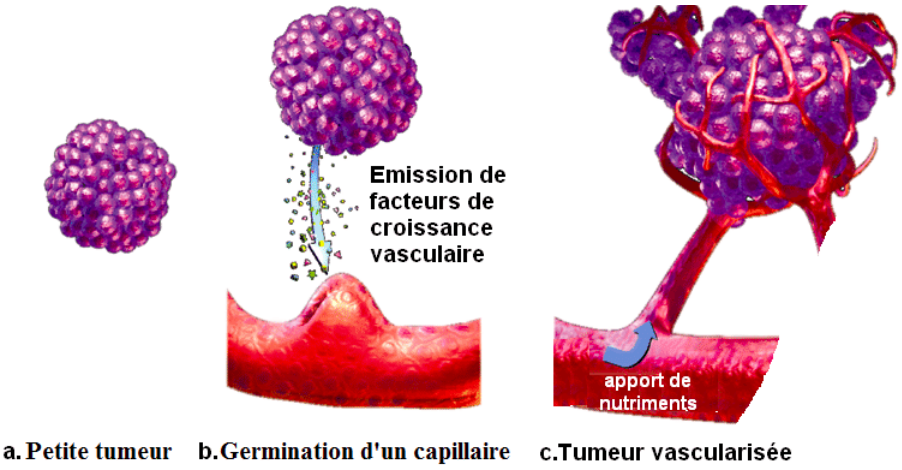



FIGURE V.1 – Schéma de la vascularisation d'une tumeur solide lors de l'angiogenèse. Cette figure provient de la référence [294].

Les enzymes collagénases jouent donc un rôle clé dans le processus d'angiogenèse lors du développement de tumeurs solides.

De nombreuses équipes de recherche s'intéressent à l'activité enzymatique de la collagénase [295, 296]. Certains comme Matoussi *et al.* utilisent le transfert d'énergie pour mesurer cette activité enzymatique. Par exemple, ils accrochent à une sonde fluorescente un peptide (clivable par la collagénase) sur lequel se trouve en plus un accepteur d'énergie. Par des mesures de fluorescence il est ensuite possible d'étudier cette cinétique de clivage. L'utilité du

transfert d'énergie est de pouvoir mesurer l'activité enzymatique sans aucun lavage et sans étape de séparation : enzymes/substrats. Une simple lecture de la fluorescence permet de remonter au nombre de peptides clivés.

L'objectif de ce projet est de montrer qu'il est possible de faire de la détection d'enzymes collagénases et d'étudier leur cinétique de clivage par imagerie à fenêtre temporelle au lieu d'utiliser l'intensité de fluorescence. Comme nous allons le voir par la suite, l'imagerie à fenêtre temporelle permet de s'affranchir de l'autofluorescence, ce qui représente un atout majeur pour faire de l'imagerie *in vivo* dans le proche IR.

Dans ce projet, il est nécessaire d'utiliser des QD et non des molécules organiques fluorescentes car ces dernières ont des temps de vie de l'état excité similaires à la fluorescence des tissus biologiques. Nous verrons dans ce chapitre que l'imagerie à fenêtre temporelle permet de séparer les fluorescences de fluorophores ayant des temps de vie différents. Dans ce projet, nous utiliserons des QD I-III-VI : $CuInSe_2$@ZnS car ils possèdent un temps de vie beaucoup plus grand que les molécules organiques (2-3 ordres de grandeurs) et plus grand aussi que les QD visibles CdSe@CdS (1 ordre de grandeur).

Dans ce projet du chapitre V, j'ai réalisé les synthèses de QD, leurs caractérisations et les échanges de ligands mais tous les protocoles avaient déjà été optimisés au laboratoire au cours des thèses de Gary Sitbon, d'Elsa Cassette et de Sophie Bouccara avec Thomas Pons [297]. L'optimisation et le développement du montage optique pour faire de l'imagerie à fenêtre temporelle ont été effectués pendant la thèse de Sophie Bouccara [298] avec Vincent Loriette, Alexandra Fragola et Thomas Pons. Dans ce projet, j'ai développé les nano-sondes pour la détection d'enzymes par transfert d'énergie soit FRET soit NSET en fonction du type d'accepteur. J'ai aussi travaillé sur l'étude de la cinétique de l'activité enzymatique. Comme ma thèse se termine, ce projet est ensuite repris, pour étudier d'autres peptides clivables et d'autres enzymes à partir du protocole que j'ai pu développer, par un doctorant au laboratoire : Subha Jana.

## V.1 Les Quantum Dots $CuInSe_2$@ZnS

Les rendements quantiques élevés et la grande photostabilité des QD en font des sondes particulièrement intéressantes pour l'imagerie *in vitro* comme *in vivo*. Les matériaux tels que $CuInSe_2$ ou $CuInS_2$ ont été développés par l'équipe de Pons *et al.* [297, 299], de Nakamura *et al.* [300] ou encore de Li *et al.* [301]. Il s'agit de matériaux de type I-III-VI, stables dans le temps et ayant une fluorescence dans la gamme d'énergie sélectionnée : entre 700 et 900 nm. Les éléments chimiques de ces QD présentent le très grand avantage d'être composés d'éléments chimiques moins toxiques que d'autres QD tels que : CdSe, HgSe...

L'intérêt de $CuInSe_2$ réside dans le fait qu'il possède une bande interdite relativement petite pour les matériaux massifs : 1,04 eV. Cette bande interdite permet d'obtenir des spectres d'absorption qui couvrent toute la gamme du visible jusque dans le proche IR noté par la suite NIR ("Near Infrared").

### V.1.1 Synthèse et caractérisations

#### Synthèse des cœurs de $CuInSe_2$

L'équipe du LPEM à l'ESPCI a développé la synthèse des coeurs de $CuInSe_2$. Il a été observé que l'incorporation de zinc dans ces coeurs permet l'augmentation du rendement quantique des QD I-III-VI. Cependant il conduit aussi à une augmentation de la bande interdite donc à un déplacement hypsochrome de l'émission (vers les plus petites longueurs d'onde) [302]. Par la suite, pour plus de clarté, cette présence de zinc sera négligée dans l'écriture des coeurs mais il faut se souvenir que nos coeurs de $CuInSe_2$ sont en réalité un mélange de $CuInSe_2$ et de ZnSe.

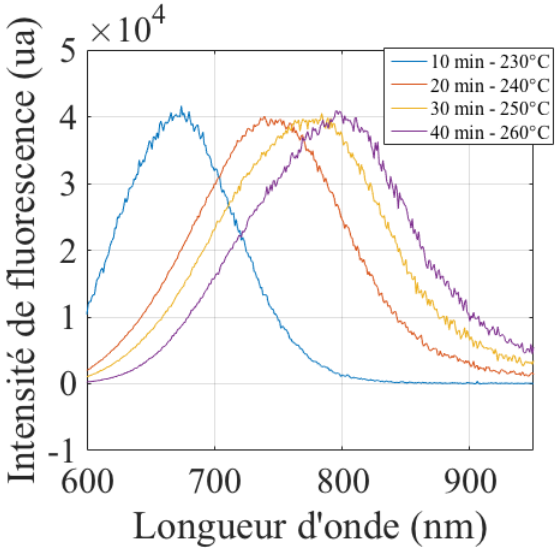



FIGURE V.2 – Evolution des spectres d'émission de fluorescence lors de la croissance des coeurs. En bleu : après 10 min de synthèse à une température de 230°C. En rouge : après 20 min de synthèse à 240°C. En jaune : après 30 min de synthèse à 250°C. En violet : après 40 min de synthèse à 260°C. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

Pour cette synthèse de coeurs, les précurseurs suivants ont été placés dans de l'octadécène (qui joue le rôle de solvant) : chlorure de cuivre I (1 eq), trichlorure d'indium (1 eq), sélénourée (2 eq) et de l'acétate de zinc (2 eq). Sont ensuite ajoutés à la synthèse, de la trioctylphosphine en tant qu'antioxydant, de l'oléylamine et du dodecanethiol afin de former des complexes intermédiaires stables ou des ligands de surface pour stabiliser les QD. La synthèse se fait dans un ballon tricol. La synthèse est réalisée sous argon après avoir dégazé la solution afin d'éviter un maximum d'oxydation. La température est réglée sur 230°C puis lorsque celle-ci est atteinte, il faut augmenter de 10°C toutes les 10 min et faire des prélèvements afin d'observer le décalage d'émission de fluorescence. Les différents spectres sont représentés sur la **figure V.2.**

A la fin de la synthèse, les QD sont lavés grâce à une succession de précipitation/dispersion. Les QD précipitent dans l'éthanol contrairement aux précurseurs que l'on peut alors séparer par centrifugation. Les QD sont ensuite repris dans de l'hexane pour les disperser à nouveau. Afin de connaître la taille et la concentration de ces coeurs, j'ai réalisé un diffractogramme obtenu par diffraction des rayons X (DRX). La DRX permet d'obtenir de nombreuses informations sur les matériaux : la structure cristalline des objets, son paramètre de maille, la distance interréticulaire, les différents alliages présents mais aussi la taille des nano-objets. Ici, ces coeurs de $CuInSe_2$ cristallisent avec une structure sphalérite. Le déplacement des pics par rapport à la structure de sphalérite pure indique la présence de ZnSe. En utilisant la Loi de Vegard, il a pu être déterminé que les coeurs contiennent 40% de ZnSe et 60% $CuInSe_2$. Par ailleurs, la loi de Scherrer permet de relier la largeur des pics du diffractogramme avec la taille des objets selon l'équation V.1.

$$H = \frac{K \cdot \lambda}{\tau \cdot cos\theta} \tag{V.1}$$

K est un facteur qui dépend de la forme des cristaux, $\lambda$ : la longueur d'onde du faisceau incident

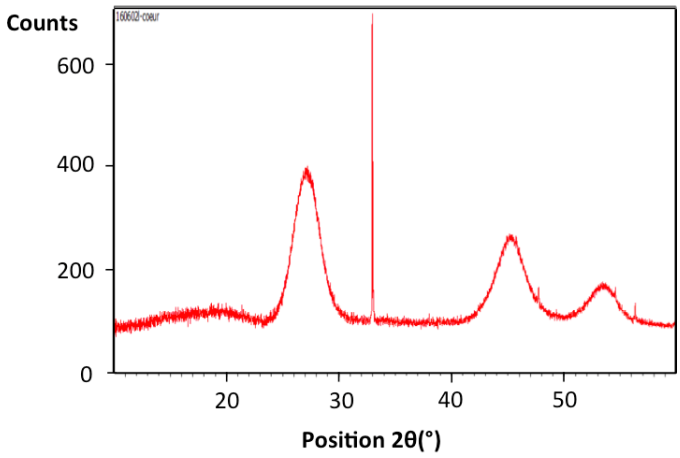



FIGURE V.3 – Diffractogramme des coeurs $CuInSe_2$ obtenu par DRX. Structure sphalérite (cubique face centrée). Groupe d'espace : $F\bar{4}3m$. Les trois pics représentent les raies (hkl) respectivement de gauche à droire : (111), (220) et (311).

(raie $K_\alpha$ du cuivre), $\tau$ : la taille des particules, $\theta$ : l'angle de diffraction et H est la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction. Le diffractogramme obtenu est présenté **figure V.3**. Il a finalement pu être conclu que ces coeurs ont un diamètre de 3,2±0,4nm.

Afin de connaitre la concentration de ces QD, j'ai pu réaliser une analyse par ICP AES sur la plateforme de Jussieu, avec l'aide de Emmanuel Aubry. En connaissant la composition exacte des coeurs et la taille des particules grâce à la DRX ainsi que la concentration de chaque élément grâce à l'ICP, il est possible de remonter à la concentration des QD. Les calculs sont présentés dans l'équation V.2. La quantité de matière d'un seul QD est noté $n$, sachant que celui-ci est composé de 60% de $CuInSe_2$ et 40% de ZnSe. Cette concentration est d'environ 25 ± 5µM dans la solution stock (*i.e.* l'hexane).

$$n = \frac{\rho \cdot V}{M} \quad \text{avec} \quad \rho = \rho_{\mathrm{CuInSe_2}} \cdot 0,6 + \rho_{\mathrm{ZnSe}} \cdot 0,4 \quad \text{et} \quad M = M_{CuInSe_2} \cdot 0,6 + M_{ZnSe} \cdot 0,4 \quad \text{(V.2)}$$

**Synthèse des coques : $CuInSe_2$@ZnS**

Sur les coeurs de $CuInSe_2$ synthétisés, l'ajout d'une coque telle que ZnS permet de passiver les liaisons pendantes présentes en surface des QD qui peuvent agir comme des pièges pour les charges (permettant des recombinaisons non radiatives) et ainsi diminuer le rendement quantique. ZnS cristallise sous forme de sphalérite ce qui va permettre une croissance épitaxiée sans création de défauts. Par ailleurs, ZnS possède une bande interdite plus grande en énergie (3,54 eV) que celle de $CuInSe_2$ , ceci améliore le confinement de l'électron dans le coeur. Ce matériau est aussi biocompatible, ce qui en fait un excellent candidat pour nos applications dans le domaine d'agents de contraste *in vivo*.

Cette synthèse de coque de ZnS est délicate car il faut éviter la nucléation secondaire. Pour cela les précurseurs (diethyldithiocarbamate et oléate de zinc) ont été injectés lentement à l'aide d'un pousse seringue en chauffant à 150$^o$C pendant 1 heure. Les QD sont ensuite lavés par succession de précipitation/dispersion comme expliqué précédemment.

Ces QD sous forme de coeur/coque ont été analysés par spectroscopie d'absorption et de fluorescence ainsi que par microscopie à transmission électronique (TEM). Un calcul de rendement de fluorescence a été effectué. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser une référence. Celle utilisée est l'ICG (infracyanine) car c'est une sonde fluorescente dans le domaine proche IR. Le rendement quantique obtenu pour ces nanoparticules : $CuInSe_2$/ZnS est de 51 ± 5 %.

La **figure V.4** présente des images TEM en (A) et (B) de cette synthèse de QD et en (C) se trouve une distribution en taille. Les QD obtenus ont finalement un diamètre de 7,4 ± 1,8 nm or nous avons vu précédemment que les coeurs font environ 3,2 ± 0,4 nm donc les coques ont des épaisseurs d'environ 4,2(±1,8)/2 = 2,1 ± 0,9 nm.

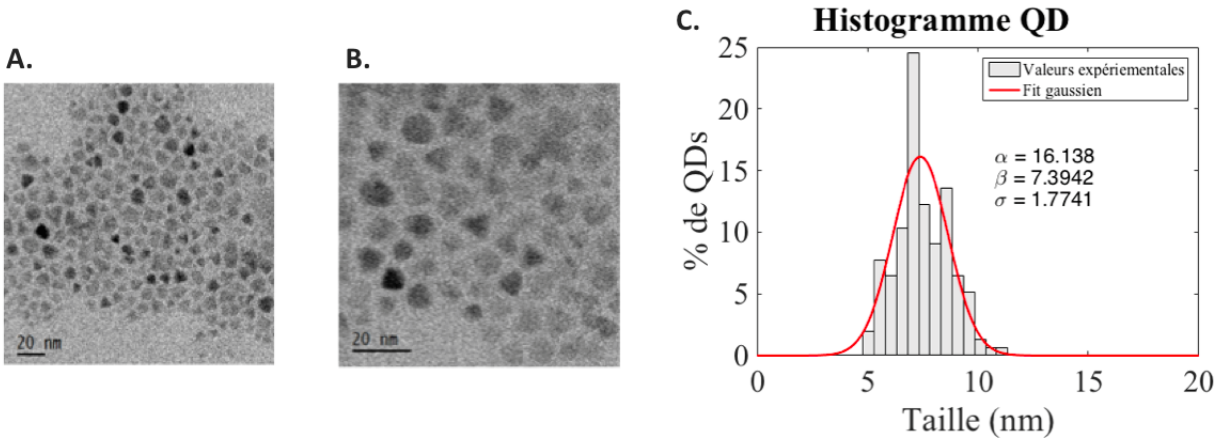



Figure V.4 – (A) et (B) Images TEM des QD $CuInSe_2/ZnS$, les échelles sont de 20 nm. (C) Histogramme de la distribution en taille des QD $CuInSe_2/ZnS$ et Fit Gaussien en rouge.

Les études spectroscopiques couplées à la DRX et à la microscopie électronique ont permis de confirmer la croissance épitaxiale de cette coque sur nos nanoparticules.

### V.1.2 Passage des QD dans l'eau et échange de ligands

Pour greffer des ligands hydrophiles à la surface des QD NIR, il est nécessaire de procéder en deux étapes classiques déjà présentées préalablement (détaillées en annexe) : la première étape est le transfert dans l'eau avec du MPA puis la deuxième étape est l'accroche soit de ligands courts, soit de polymères hydrophiles.

Dans ce projet, nous verrons par la suite que nous souhaitons accrocher à la surface des QD NIR soit le ligand de petite taille sulfobétaïne noté TA-SB (déjà rencontré dans le chapitre III de cette thèse) soit du TA (acide thioctique). Avec ces derniers, il est possible de faire un échange de ligands et un passage dans l'eau en une seule étape. Ce nouvel échange s'effectue en milieu biphasique : eau/chloroforme. Les QD sont tout d'abord lavés une fois dans de l'éthanol puis centrifugés. Ils sont ensuite repris dans du chloroforme. En même temps, le TA-SB (ou le TA) sont dissous dans de l'eau et les ponts disulfures sont réduits par du $NaBH_4$ sous agitation pendant environ 30 min. Les solutions de ligands réduits et de QD sont ensuite mélangées sous vive agitation pendant 30 min puis placées pendant 6 h à 60°C. Les QD sont ensuite lavés sur gradient de saccharose comme expliqué précédemment (détaillé en annexe).

Après passage dans l'eau, ces QD ont typiquement des rendements quantiques de fluorescence de l'ordre de 20-30 %.

### V.1.3 Fluorescence et temps de vie des QD NIR

Les spectres d'absorption et de fluorescence (PL) des QD NIR sont présentés en **figure V.5(a)**. Ces nanocristaux I-III-VI ont des spectres d'émission de PL ayant une grande largeur à mi-hauteur comprise entre 110 et 150 nm. Ceci provient de plusieurs facteurs : la dispersion en taille des QD, la dispersion de leur composition et d'une émission non excitonique.

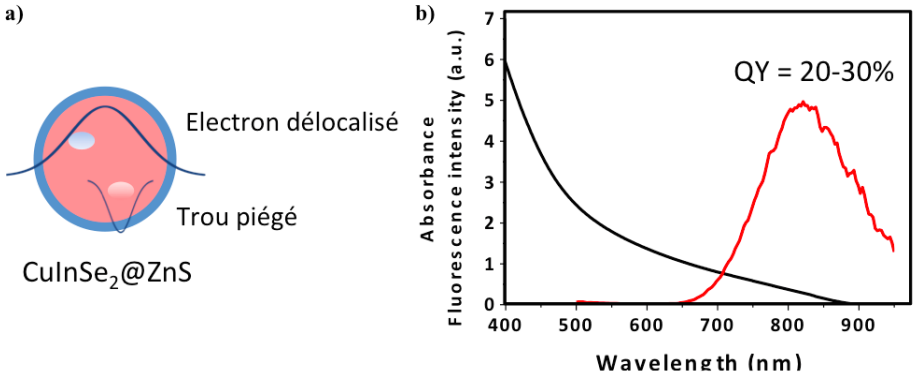



FIGURE V.5 – (a) Schéma du QD NIR avec l'électron délocalisé dans la bande de conduction et le trou piégé. (b) Spectres d'absorbance (en noir) et d'émission de fluorescence (en rouge).

Dans les deux premiers cas, l'élargissement est dû à un effet d'ensemble tandis que le dernier élargissement est intrinsèque au nanocristal et serait visible même en effectuant des mesures de spectroscopie sur QD unique. Ceci est dû à la présence de défauts dans la structure cristalline et notamment d'écart à la stœchiométrie [303]. Comme pour les matériaux II-IV, il existe une émission directe entre les bandes de valence et de conduction. Cependant, ici, cette transition se produit très peu à température ambiante à cause du nombre de défauts dans les structures I-III-VI [304]. Pour ces matériaux, il y a de nombreuses transitions entre les bords de bandes (soit de valence soit de conduction) et de nouveaux niveaux sont créés à cause des défauts dans la bande interdite [305], comme représenté sur la **figure V.6**.

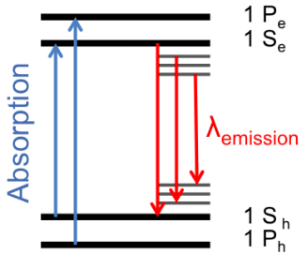



FIGURE V.6 – Schéma des différentes transitions radiatives possibles. De nouveaux niveaux d'énergie peuvent être créés à proximité des bandes de conduction et/ou de valence en raison des défauts de la structure de ces nanocristaux I-III-VI. Cette figure provient de [298].

Il s'agirait probablement de la formation de paires de défauts ($2V'_{Cu}$ + $In^{\circ\circ}{}_{Cu}$) c'est à dire

deux lacunes de $Cu^{+}$ et un $In^{3+}$ substitués à la place d'un $Cu^{+}$ qui créeraient des niveaux proches de la bande de valence et conduiraient au piégeage des trous [304, 306].

Le recouvrement des fonctions d'onde des trous et des électrons est alors plus faible, ce qui pourrait expliquer que les temps de vie de fluorescence des quantum dots I-III-VI soient plus longs, de l'ordre de quelques centaines de nanosecondes, que ceux à base de II-VI, de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes [305]. Une comparaison du temps de vie de fluorescence des $CuInSe_2$@ZnS (I-III-IV) et des CdSe@CdS/ZnS (II/VI) est présentée en **figure V.7**.

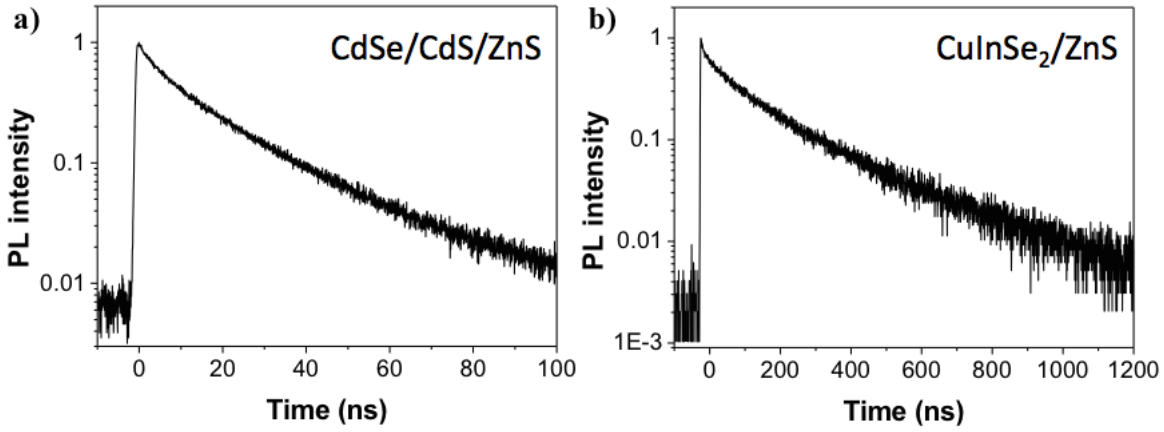



Figure V.7 – Intensité de PL résolue en temps pour : (a) des QD visibles CdSe@CdS/ZnS et (b) des QD NIR $CuInSe_2$@ZnS.

### V.1.4 Stabilité des particules *in vivo*

Au sein de notre laboratoire, Sophie Bouccara *et al.* ont développé l'imagerie à fenêtre temporelle et ont beaucoup travaillé sur les QD $CuInSe_2$@ZnS. Ils ont prouvé que ces QD conservent leur long temps de vie après passage dans l'eau et en milieu intracellulaire [137]. Les QD ont été transférés dans l'eau par échange MPA classique, puis un échange de ligands a eu lieu avec un polymère zwitterionique sulfobétaïne.

La **figure V.8** montre des images de cellules HeLa vivantes électroporées avec des QD NIR, obtenues à différents moments après l'électroporation (5, 24 et 48 h). Afin de compenser visuellement la diminution du signal de fluorescence induite par la dilution des QD après chaque division cellulaire, le niveau d'intensité de l'image du milieu (après 24 h) a été doublé et le niveau de la dernière image (après 48 h) a été quadruplé selon le nombre de divisions cellulaires. Les images originales présentent des niveaux moyens compatibles avec une puis deux étapes de division cellulaire et aucune fuite de QD. Les images de la **figure V.8** montrent aussi que les QD NIR recouverts de VIM-b-SB restent brillants et répartis de manière homogène dans le cytoplasme cellulaire pendant plusieurs jours. Cette expérience a confirmé la faible toxicité de ces particules.

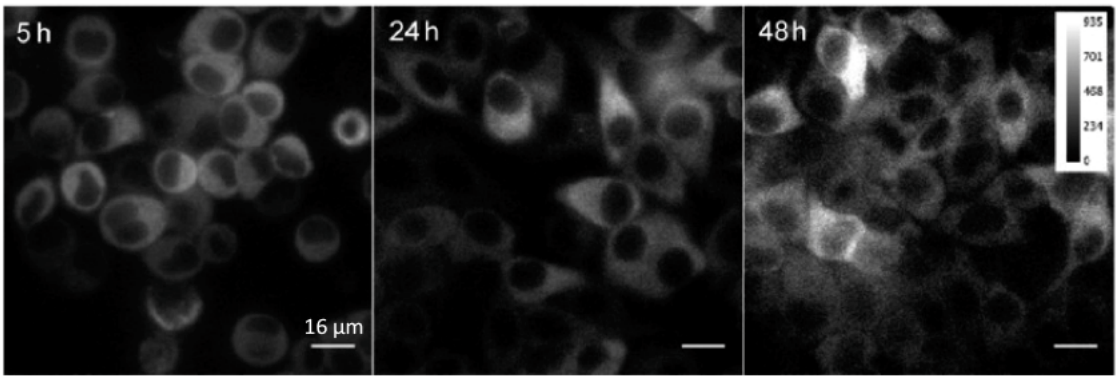



FIGURE V.8 – Images de microscopie à fluorescence de cellules HeLa électroporées avec des QD NIR recouverts de polymère VIM-b-SB à différents moments après l'électroporation : 5, 24 et 48 h (échelle : 16 µm). [137]

L'imagerie optique de fluorescence est une technique d'imagerie de choix pour imager des cellules et plus globalement pour faire de l'imagerie *in vivo*. Le choix des QD $CuInSe_2$@ZnS par rapport à des molécules organiques permet de diminuer la diffusion de la lumière par les tissus et donc d'augmenter la résolution spatiale. Ces QD émettent entre 800 et 900 nm, ce qui représente une fenêtre de transparence biologique où les tissus absorbent faiblement. Et l'on observe, même dans le NIR, une forte autofluorescence des tissus. Ceci va créer un signal parasite et il sera donc plus difficile de distinguer la fluorescence des QD une fois injectés *in vivo*. L'autofluorescence diminue le rapport signal/bruit.

Par pallier ces problèmes, nous allons utiliser l'imagerie par fenêtre temporelle. Au laboratoire, un montage optique permettant de faire de l'imagerie par fenêtre temporelle a été développé pendant la thèse de Sophie Bouccara [298].

## V.2 L'imagerie à fenêtre temporelle

### V.2.1 Principe et montage optique

L'imagerie à fenêtre temporelle est utilisée pour isoler un signal de déclin de fluorescence ayant un temps plus long ou plus court que d'autres signaux parasites. Il est généralement utilisé pour éliminer le signal d'autofluorescence et augmenter la sensibilité [248, 307]. Il y a donc une séparation des signaux de fluorescence en fonction de leur temps de vie. Pour que cette séparation soit efficace, il est nécessaire que les différents fluorophores aient au moins un ordre de grandeur de différence dans leur temps de vie. La durée de vie de fluorescence provenant de l'autofluorescence des tissus est inférieure à 5 ns c'est pourquoi nous utilisons les QD NIR. Par ailleurs, les QD utilisés sont particulièrement intéressants car il est aussi possible de les exciter dans le rouge ou le proche IR, ce qui va améliorer la sensibilité.

Le montage optique du laboratoire est représenté en **figure V.9**.

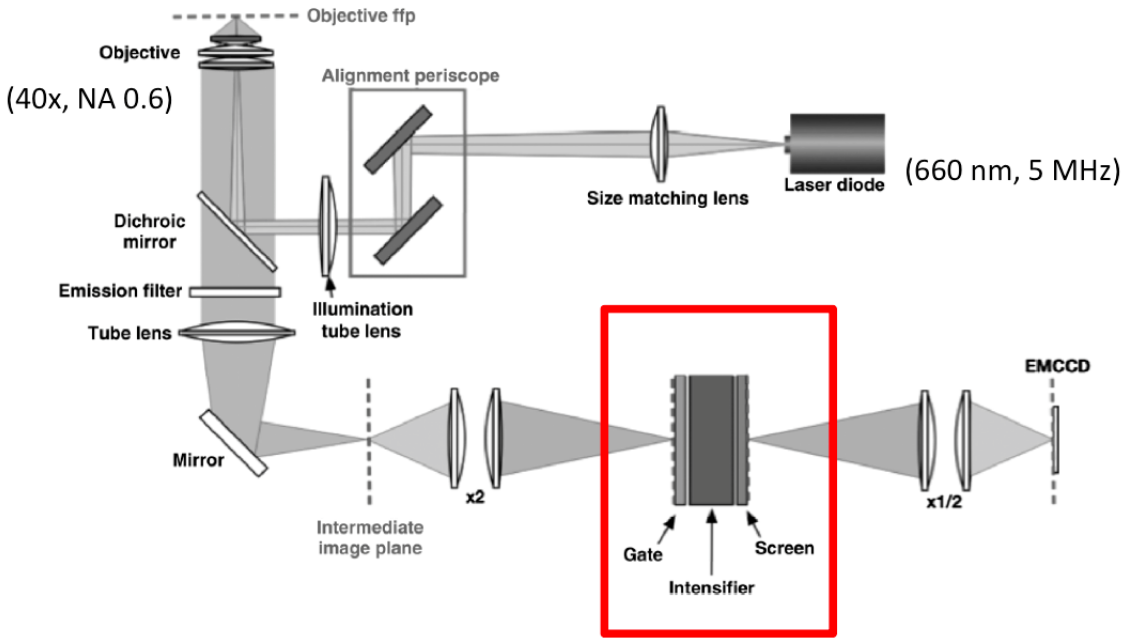



FIGURE V.9 – Scéma optique de l'imagerie à fenêtre temporelle. [137]

Un laser pulsé à 660 nm est envoyé sur l'échantillon à travers un objectif. La fluorescence est collectée par le même objectif, puis est détectée à l'aide d'une caméra CCD devant laquelle on a placé un intensificateur synchronisé avec le laser.

Dans ce montage optique, l'intensificateur agit comme une fenêtre temporelle avec une largeur, $\Delta$, et un décalage temporel, $\tau$ programmable par rapport aux impulsions laser.

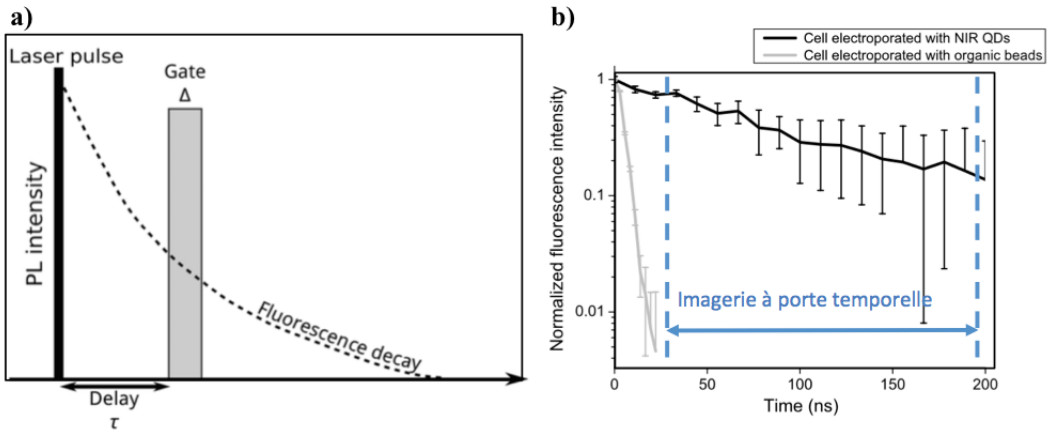



FIGURE V.10 – (a) Principe des mesures de déclin de fluorescence. Dans chaque expérience, l'emplacement de la fenêtre temporelle ainsi que sa largeur seront choisis de façon à maximiser le rapport signal/bruit. (b) Mesures de décroissance de l'intensité de fluorescence des QD NIR et de billes fluorescentes dans les cellules HeLa. Pour se débarrasser de la fluorescence des molécules organiques, il faudra attendre un délai $\tau$ qui dépendra du temps de vie des molécules organiques fluorescentes qui créent du signal parasite [137].

### V.2.2 Imagerie à fenêtre temporelle *in vivo*

Il est ainsi possible de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus *in vivo* en réalisant de l'imagerie à fenêtre temporelle, comme le montre la **figure V.11**.

Dans cette expérience, des QD NIR ont été électroporés dans des cellules HeLa. Ces dernières ont ensuite été déposées sur une tranche de tissu *ex vivo* de muscle de bœuf. L'échantillon est alors éclairé avec la source pulsée à 5 MHz et l'image est obtenue avec une fenêtre temporelle ayant une largeur : $\Delta = 160$ ns. Les images sont présentées sur la **figure V.11**. Deux images sont montrées ici, la première avec un délai $\tau = 0$ ns et la seconde avec un délai $\tau = 20$ ns. Sur l'image du haut, avec $\tau = 0$ ns, il est très clair que le signal de fluorescence des QD NIR est superposé au signal parasite d'autofluorescence du tissu. En revanche, en ajoutant le délai $\tau = 20$ ns, observable sur l'image du bas, on remarque que l'autofluorescence a été éliminée à plus de 99 %, alors que la fluorescence des QD est conservée à 65 %.

Ce montage optique développé par Bouccara *et al.* permet donc de faire de l'imagerie *in vivo* à fenêtre temporelle afin d'éliminer quasiment totalement l'autofluorescence des tissus [137,308].

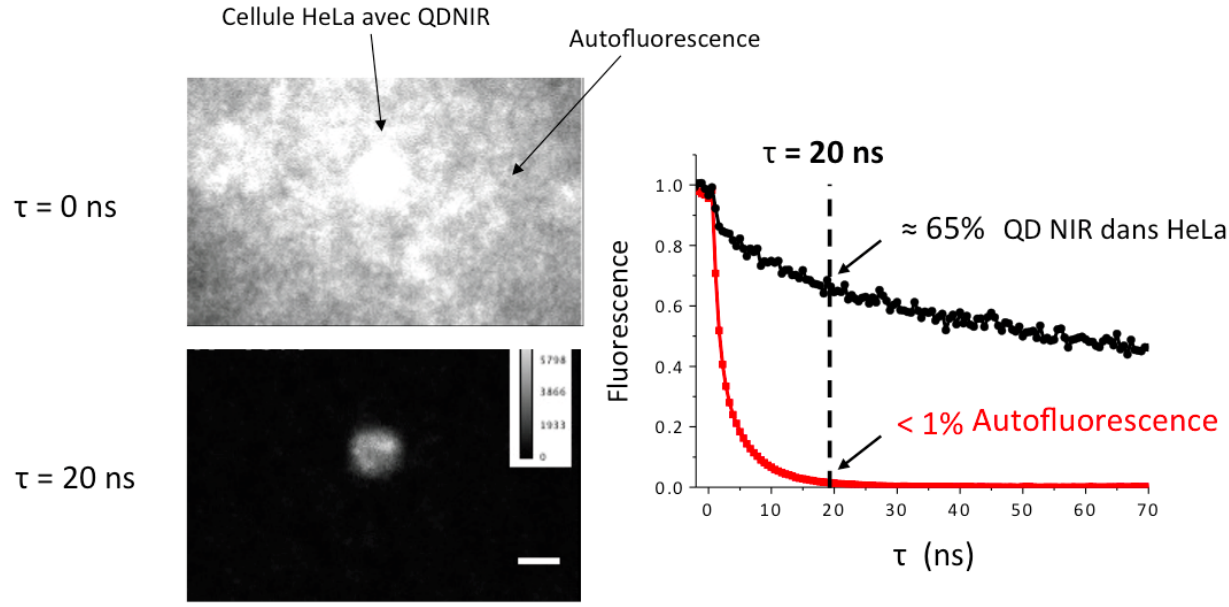



FIGURE V.11 – Images de cellules contenant des QD NIR pour différentes positions de la fenêtre temporelle $\tau$ (en ns) (échelle : 10 µm). [137,308]

Dans la suite de ce chapitre, nous souhaitons développer des nano-sondes pour détecter l'activité enzymatique à l'aide de l'imagerie à fenêtre temporelle. L'objectif est d'étudier des cinétiques d'activité enzymatique à l'aide uniquement des temps de vie de fluorescence.

## V.3 Détection d'activité enzymatique par imagerie à fenêtre temporelle

### V.3.1 Principe de la nano-sonde

Nous souhaitons dans ce projet détecter la présence de la collagénase (enzyme qui joue un rôle clé dans le développement des tumeurs solides) mais aussi étudier son activité enzymatique. Pour cela nous allons développer une nano-sonde dont le temps de vie de fluorescence peut être modulée en présence de l'enzyme. Cette modulation nous permettra aussi d'étudier l'activité enzymatique par imagerie à fenêtre temporelle. Les avantages de cette technique sont de permettre une mesure *in vivo* de la cinétique enzymatique impossible habituellement à cause de l'autofluorescence. De plus, il ne faudra ici qu'une seule longueur d'onde infrarouge de détection, ce qui élimine les problèmes liés à la diffusion de différentes longueurs d'onde par les tissus.

Pour la synthèse et le développement de la nano-sonde, toutes les études et analyses ont été réalisées sur le spectrofluorimètre du laboratoire qui est couplé à un laser pulsé qui permet d'obtenir des mesures d'intensité de PL résolue de temps des QD. En conséquence, toutes les mesures du temps de vie ont été d'abord faites *in vitro* sur le spectrofluorimètre. L'objectif de ce projet est ensuite de pouvoir réaliser le même type de mesures mais *in vivo* avec de l'imagerie

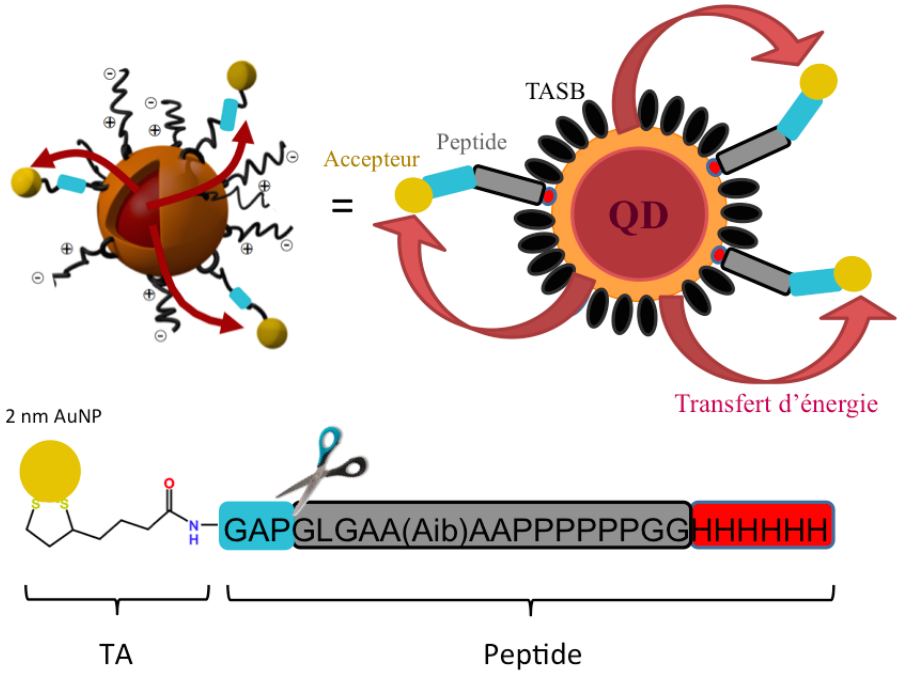



Figure V.12 – Schéma de la nano-sonde : au centre un QD NIR recouvert de petits ligands pour le stabiliser dans l'eau (en noir), un (ou plusieurs) peptide (dont la séquence d'acide aminées est décrite) couplé à un accepteur (en jaune) est attaché sur le QD ce qui entraine un transfert d'énergie et diminue l'intensité de fluorescence du QD et son temps de vie.

à fenêtre temporelle. Ce projet est encore en cours et pour l'instant les résultats ne portent que sur les synthèses des nano-sondes et les premiers résultats *in vitro*.

Dans ce projet, nous voulons observer par transfert d'énergie l'activité enzymatique de la collagénase. Pour cela, notre idée est de développer une nouvelle nano-sonde à base d'un donneur d'énergie fluorescent (ici : le QD NIR) sur lequel sera accroché un peptide qui pourra être clivé en présence de collagénase. Ceci sera observable par fluorescence ou par mesure de durée de vie car sur le peptide sera attaché un accepteur d'énergie. Par conséquent, en l'absence de collagénase, la sonde fluorescente présentera une intensité de PL diminuée et un temps de vie plus court à cause d'un transfert d'énergie avec l'accepteur. En revanche, en présence de collagénase, le peptide sera clivé et les accepteurs seront éloignés des QD NIR, ce qui permettra d'augmenter la fluorescence et d'obtenir un temps de vie plus long.

Sur la **figure V.12** est présenté le concept de la nano-sonde. Un QD NIR au centre sur lequel sont attachés des peptides via la séquence d'acides aminés d'Histidine $(His)_6$. Ces peptides sont couplés à des accepteurs d'énergie. Les QD NIR sont stabilisés dans l'eau par des petits ligands. La partie en bleu dans ce schéma représente la séquence d'acides aminées qui sera reconnue puis clivée par la collagénase.

### V.3.2 Principe de l'imagerie à fenêtre temporelle pour la mesure de transfert d'énergie

Comme expliqué dans le chapitre I de cette thèse, en présence de transfert d'énergie, le temps de vie des QD diminue. Dans ce projet nous allons utiliser l'imagerie à fenêtre tempo-

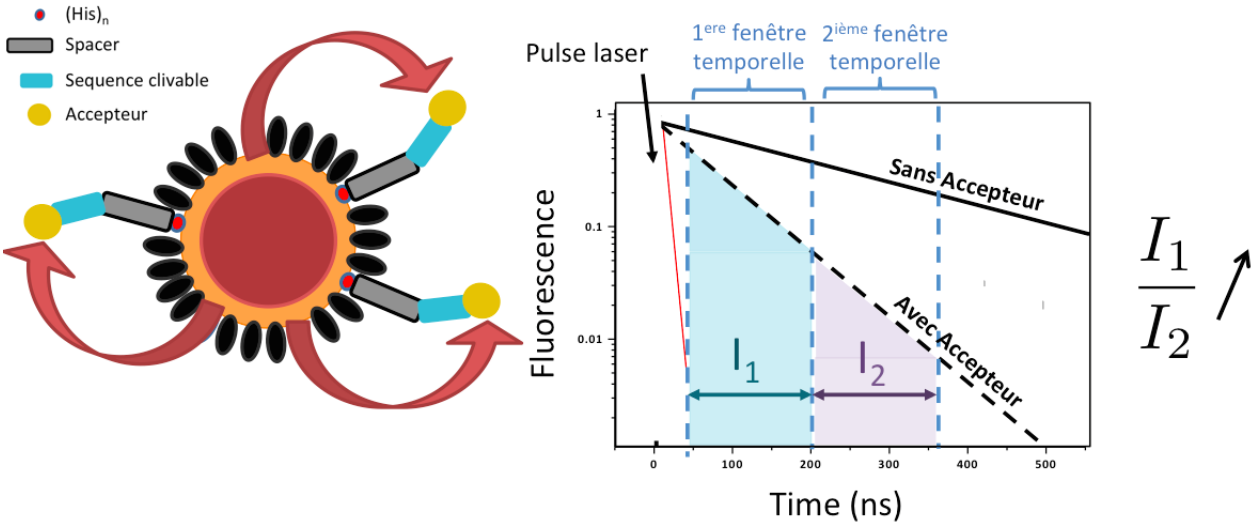



FIGURE V.13 – Schéma de la nano-sonde lorsque le peptide n'est pas clivé. Plus il y a de peptides donc d'accepteurs sur chaque QD plus le temps de vie diminue et plus $I_1/I_2$ augmente.

relle pour mesurer ce transfert d'énergie. Nous utiliserons le même montage optique que celui présenté dans la partie II mais cette fois-ci nous utiliserons deux fenêtres temporelles au lieu d'une seule. Après chaque pulse laser, un délai $\tau$ d'attente sera toujours présent, afin d'éliminer au maximum l'autofluorescence des tissus, puis après ce délai une première fenêtre temporelle permettra de collecter les photons arrivant sur le détecteur entre $\tau$ et $\tau+\Delta$ puis une seconde fenêtre temporelle collectera les photons entre $\tau+\Delta$ et $\tau+2\Delta$, comme montré sur la **figure V.13**. Sur cette figure en bleu est représenté le signal qui sera détecté pendant l'ouverture de la première fenêtre temporelle, noté $I_1$ ; et en violet le signal qui sera détecté pendant l'ouverture de la seconde fenêtre temporelle, noté $I_2$.

Plus il y aura de peptides, donc d'accepteurs par QD NIR, plus le temps de vie de ces derniers sera faible et plus le rapport $I_1/I_2$ augmentera. Lors de ces expériences, il sera nécessaire de savoir quel est le nombre d'accepteurs à accrocher par QD, noté N ; mais aussi quelle est la largeur de la fenêtre $\Delta$ optimale.

Dans un second temps, lorsque la nano-sonde sera synthétisée et caractérisée, celle-ci sera mise en présence de la collagénase qui viendra cliver le peptide avec une certaine cinétique. Cette cinétique sera suivie grâce au rapport $I_1/I_2$ qui sera obtenu en réalisant de l'imagerie à 2 fenêtres temporelles pour des mesures *in vivo* ou bien avec des spectres de PL résolue en temps dans un premier temps pour des mesures *in vitro*.

Le schéma de la **figure V.14** montre que lors du clivage du peptide le temps de vie des QD augmente à nouveau et le rapport $I_1/I_2$ diminue.

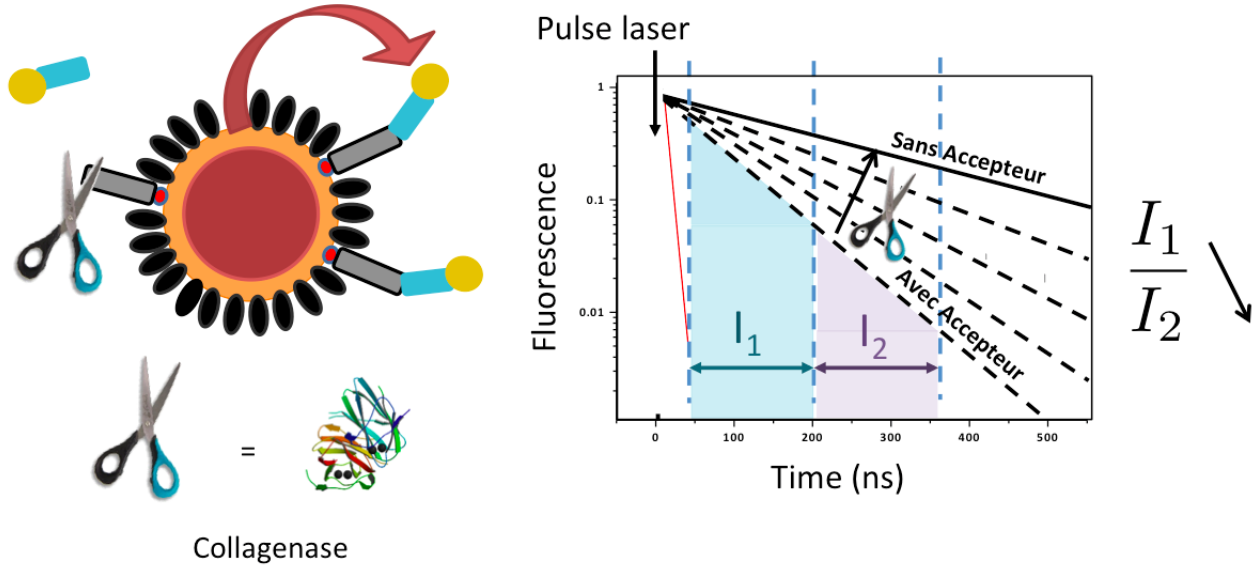



FIGURE V.14 – Schéma de la nano-sonde lorsque le peptide est clivé en présence de collagénase. Plus les peptides seront clivés plus le temps de vie des QD augmente et plus $I_1/I_2$ diminue.

### V.3.3 Nano-sonde avec des accepteurs organiques

#### QD NIR recouverts de TA-SB

Notre première idée a été d'étudier le transfert d'énergie entre un QD NIR et un accepteur organique non fluorescent (une DyeIR-QC1) pour éviter les signaux parasites de ré-émission de l'accepteur. Cette DyeIR est dessinée en **figure V.15**. Il s'agira donc d'un transfert d'énergie entre un donneur et un seul ou plusieurs accepteurs par désexcitation non radiative.

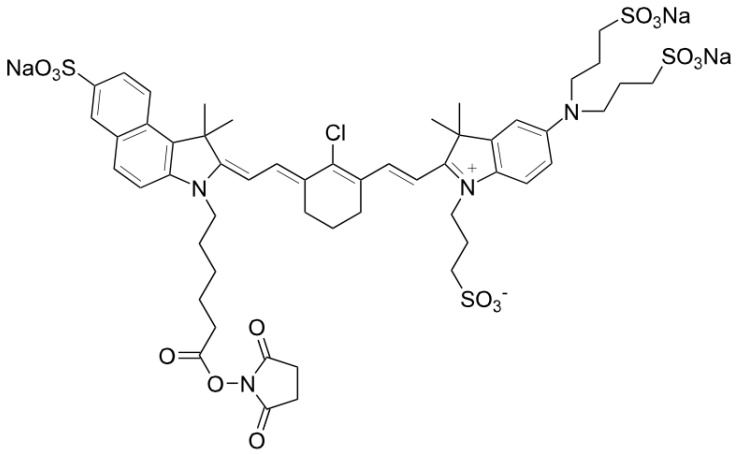



FIGURE V.15 – Schéma de la DyeIR.

La première étape a été le couplage peptidique du peptide avec la DyeIR. Le peptide se termine avec une fonction amine primaire (à l'opposé des histidines) et la DyeIR possède un ester activé par le N-hydrosuccinimide (NHS). Un couplage peptidique dans le DMSO a été effectué pour greffer une DyeIR sur chaque peptide. En parallèle, les QD NIR ont été passés dans l'eau par échange biphasique (détaillé en annexe) avec du TA-SB. Les QD sont alors recouverts de ligands sulfobétaïnes accrochés par une fonction dithiol. Ici, des petits ligands et non des polymères sont greffés à la surface des QD afin qu'il y ait peu de gène stérique pour que des peptides puissent être greffés par la suite.

L'étape suivante a été de coupler le peptide-Dye sur les QD NIR. Pour cela, 1 nmol de QD-TASB est placée dans 600 µL de solution tampon (pH 7,5) puis des quantités croissantes de peptides-Dye sont ajoutées. Les courbes de PL résolue en temps sont présentées en **figure V.16(a)** avec la courbe de $\tau_{DA}/\tau_D$ (respectivement le temps de vie moyen des QD en présence ou en absence d'accepteurs) en fonction de N (le nombre d'accepteurs par QD) **V.16(b)**.

Sur ces courbes, nous observons une diminution du temps de vie uniquement pour des temps de vie très courts alors que la composante longue ne change pas. De plus, la diminution du temps de vie, présenté en **figure V.16(b)** est trop rapide par rapport au nombre N ajouté.

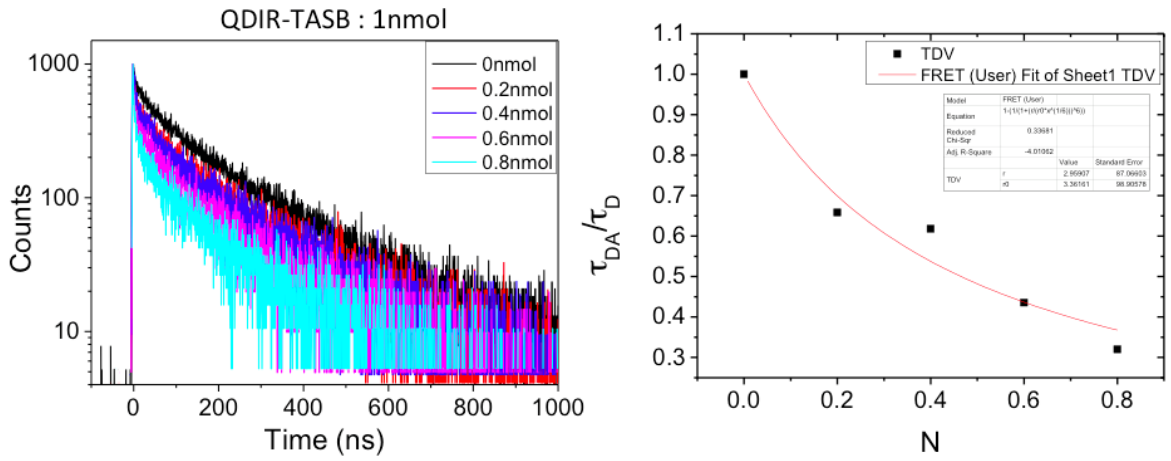



FIGURE V.16 – A gauche : courbes de PL résolue en temps de QD NIR-TASB (1 nmol) en fonction du nombre de mol de peptides-Dye ajouté. A gauche : courbe de diminution du temps de vie en fonction de N, normé par le temps de vie initial des QD (*i.e.* sans accepteur). ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

Ceci suggère probablement qu'il n'y a pas seulement du transfert d'énergie par FRET mais aussi éventuellement un transfert électronique qui pourrait se produire si les DyeIR sont directement adsorbées à la surface des QD NIR. Il y a certainement ici deux populations distinctes : une faible proportion de QD n'aurait pas d'accepteur et garderait leur temps de vie longs ; tandis qu'une plus grande proportion contiendrait des DyeIR "collées" à leur surface, réduisant drastiquement leur temps de vie.

Par ailleurs, ici, l'ajout de la collagénase n'a pas permis d'augmenter le temps de vie. Cette chimie de surface des QD ne semble donc pas idéale pour ce projet.

### QD NIR recouverts de TA

Par la suite, les QDIR ont été recouverts par des ligands de petites tailles chargés négativement afin de repousser, par interactions électrostatiques, les DyeIR de la surface des QD. Notre objectif est que seuls les peptides s'accrochent à la surface des QD via leur fonction $(His)_6$ et non les DyeIR. Les DyeIR dans l'eau possèdent 4 charges négatives. Par conséquent, les QD ont été recouverts d'acide thioctique (TA) réduit qui possède une fonction dithiol pour l'accroche sur les QD et se terminent avec une fonction carboxylate (à pH 8,5), donc une charge négative, dans le but de repousser les Dye loin de la surface, et d'avoir un peptide en extension.

Sur la **figure V.17**, se trouvent les courbes de PL résolue en temps des QD-TA lors d'ajout croissant d'équivalents de peptides-Dye. Cette fois-ci, la diminution du temps de vie ressemble plus à du transfert d'énergie. Le temps de vie est diminué aux temps à la fois courts et longs. La courbe V.17(b) représente ce transfert d'énergie en fonction de N.

Pour prouver que ce transfert d'énergie provient bien de l'accroche de la Dye via le peptide sur les QD, une expérience contrôle a été effectuée, présentée en **figure V.18(b)**. Les peptides-Dye

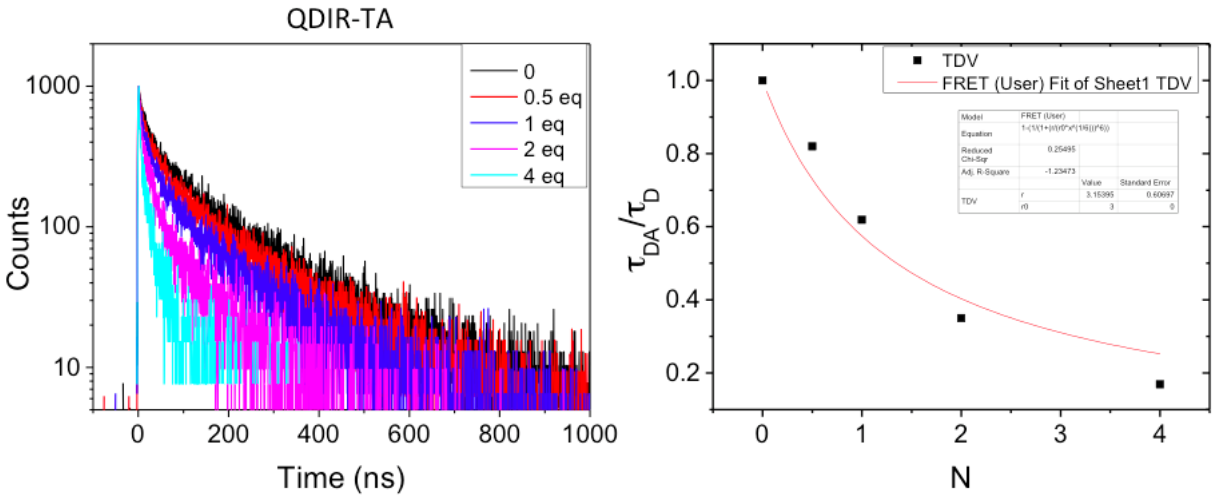



FIGURE V.17 – A gauche : courbes de PL résolue en temps de QD NIR-TA en fonction de N. A gauche : courbe de diminution du temps de vie en fonction de N, normée par le temps de vie initial des QD (*i.e.* sans accepteur). ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

ont tout d'abord été clivés par la collagénase (mise en excès) puis seulement après, les peptides-Dye ont été mélangés aux QD. Cette fois-ci on peut observer qu'il n'y pas quasiment pas de transfert d'énergie.

L'étape suivante a été l'ajout d'un excès de collagénase après le transfert d'énergie observé pour N = 4 Peptides-Dye (non clivé initialement). Le résultat est présenté en **figure V.18(a)**. Le temps de vie remonte, ce qui laisse penser que certains peptides sont effectivement clivés. Cependant, même après un temps conséquent (plusieurs jours), le temps de vie n'a pas été

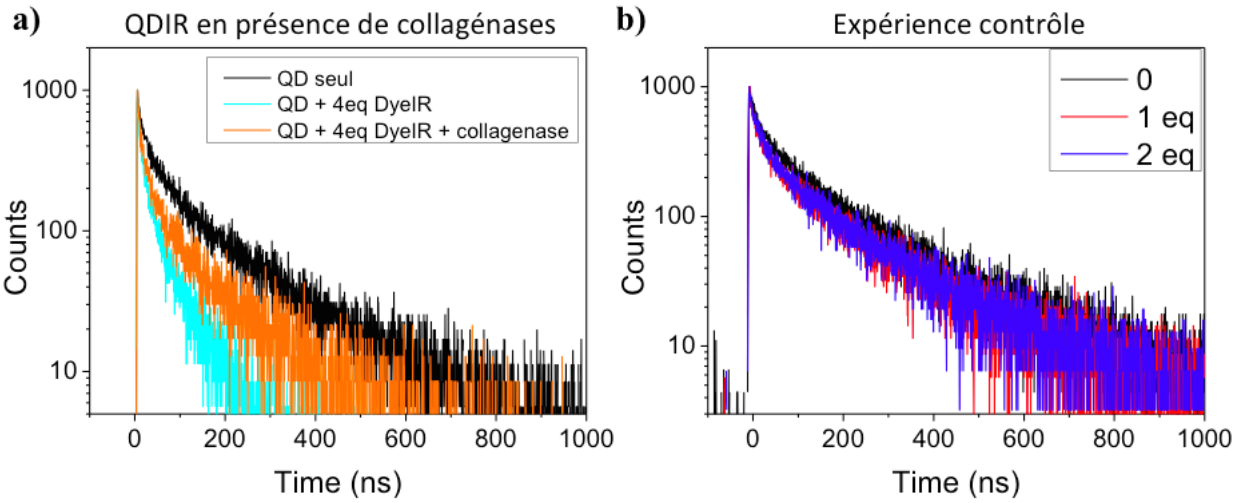



FIGURE V.18 – (a) Courbes de PL résolue en temps de QD NIR-TA en fonction de N. (b) Courbe de diminution du temps de vie en fonction de N, normée par le temps de vie initial des QD (*i.e.* sans accepteur). ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

retrouvé totalement par rapport à l'instant initial, sans Dye.

A ce jour, nous ne sommes pas certains de savoir pourquoi l'ajout de la collagénase n'a pas permis de retrouver le temps de vie initial des QD. Il pourrait y avoir peut-être des interactions non spécifiques entre la surface des QD chargée négativement et la collagénase, empêchant son activité enzymatique.

### V.3.4 Nano-sonde avec des accepteurs inorganiques : AuNP

Pour la suite de ce projet, nous avons décidé de changer d'accepteur d'énergie : de remplacer les molécules organiques par des AuG (germes d'or, comme présentés dans les chapitre III et IV). Ceci permet d'éliminer les problèmes d'interactions entre le colorant et la surface des QD et cela permet aussi de pouvoir travailler à pH physiologique alors qu'avec une surface de TA il est nécessaire de rester en milieu basique (pH $\approx$ 8,5 - 9).

Pour cela, nous avons fait un couplage peptidique entre l'amine primaire du peptide et l'acide carboxylique de l'acide thioctique. Tous les composés sont initialement préparés dans du DMSO anhydre. Le peptide est mélangé avec l'acide lipoïque, suivi de l'agent de couplage EDC,HCl, puis de NHS et de $NEt_3$. Après agitation pendant un jour à l'abri de la lumière, il a été possible de faire un dosage fluorimétrique avec de la fluorescamine afin de connaitre le nombre d'amines primaires restants. Le taux de couplage de cette réaction a atteint $\approx$ 60%. Ce produit sera appelé peptide-AuG

L'étape suivante est de coupler les AuG aux peptides. Les AuG après synthèse sont recouverts de phosphine qui sont des ligands qui se décrochent très rapidement en présence de thiol. Il suffit de placer 1 équivalent de particules AuG en présence de 1 équivalent de peptides-TA pour que ceux-ci s'accrochent à la surface de l'or. Pour que les particules d'or soient très stables, il est nécessaire ensuite d'ajouter un excès de ligands TA-SB. Ces derniers vont recouvrir totalement la surface des particules. Ces particules sont ensuite lavées par ultrafiltration vivaspin pour éliminer l'excès de ligands non accrochés aux AuG. On obtient alors des peptides-AuG.

De leur coté, les QD NIR sont préparés par échange biphasique avec du TA-SB comme dans la partie précédente. Il est à noter que ces ligands à la surface des QD peuvent se décrocher lors d'une dilution trop importante. Il est nécessaire de rester à des concentrations supérieures à 0,1 µM. Il faut faire très attention à ce phénomène car il a été observé que, si les ligands se décrochent, cela peut entrainer une diminution du temps de vie à cause de la création de défauts de surface.

La dernière étape est, bien sûr, de mélanger les QD NIR avec les peptides-AuG. La **figure V.21(a)** présente les mesures d'intensité de PL résolue en temps lors d'ajout croissant de nombres d'équivalent de peptides-AuG par QD NIR. On observe une diminution du temps de

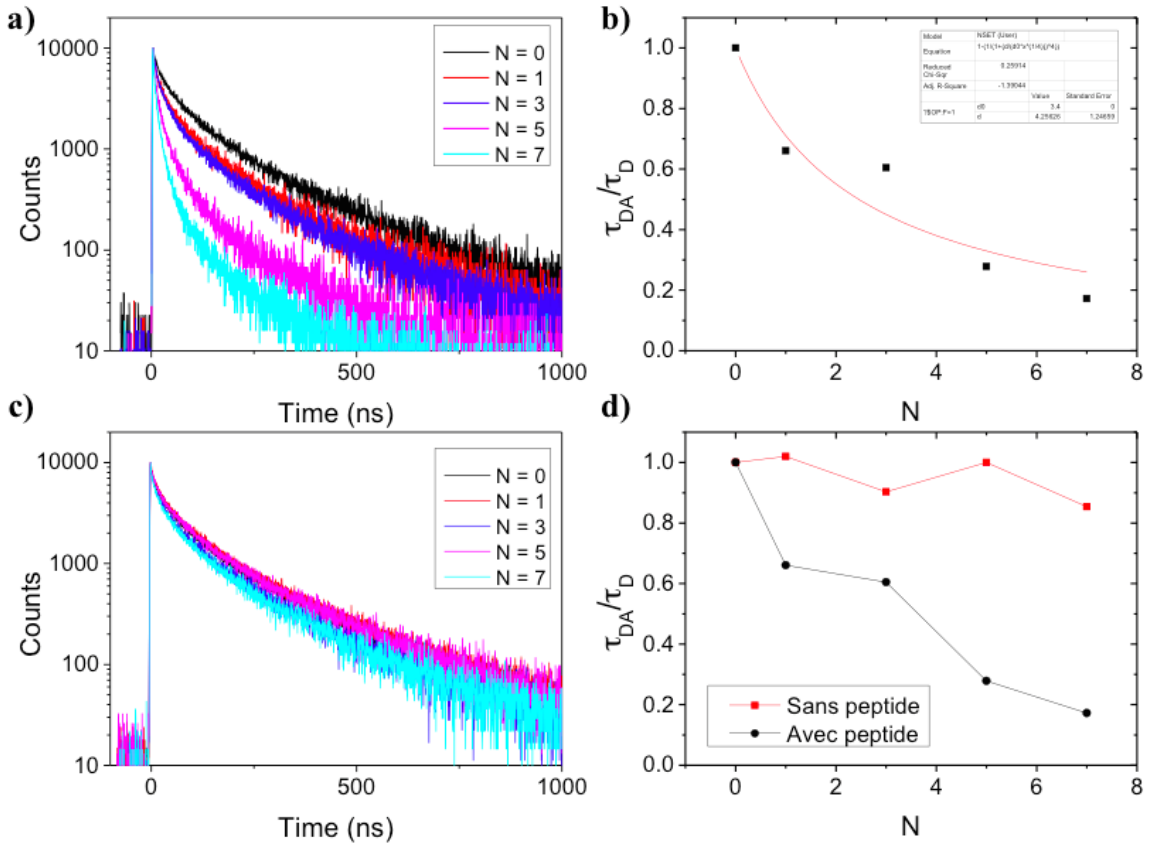



FIGURE V.19 – (a) Courbes de PL résolue en temps de QD NIR en fonction de l'ajout de peptides-AuG. (b) Courbe de diminution du temps de vie en fonction de N, normée par le temps de vie initial des QD (*i.e.* sans accepteur). (c) Test contrôle : courbes de PL résolue en temps de QD NIR en fonction de l'ajout de AuG sans peptide. (d) Comparaison des transferts d'énergie dans le cas des AuG avec ou sans peptide. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

vie en fonction du nombre N ajouté. Sur la **figure V.21(b)** se trouve le transfert d'énergie en fonction de N. Ce transfert d'énergie a été ajusté avec une courbe théorique de NSET. La **figure V.21(c)** est exactement la même expérience que (a) mais avec des AuG sans peptide. Le contrôle est, en effet, négatif : peu de déclin de temps de vie est observé. La **figure V.21(d)** permet de comparer les différences de temps de vie mesurées pour les deux expériences (AuG avec ou sans peptide). Ceci confirme donc bien que l'accroche des AuG sur les QD se fait par l'intermédiaire du peptide via les histidines : $(His)_6$.

### V.3.5 Optimisation de la détection à fenêtres temporelles

Tout d'abord, d'après les résultats de Bouccara *et al.* [137] présentés dans la partie V.2. de ce chapitre, pour éliminer l'autofluorescence des tissus, le délai $\tau$ d'attente entre le pulse laser et l'ouverture de la première porte temporelle doit être autour de 20 ns pour complètement éliminer l'autofluorescence. Désormais nous souhaitons utiliser 2 fenêtres temporelles au lieu d'une seule, par conséquent le paramètre $\Delta$ est aussi très important.

A l'aide de l'expérience précédente, nous avons cherché à déterminer quels seraient les meilleurs délais $\Delta$ en fonction de N (nombre d'AuG/QD). On cherche donc le meilleur ratio R = signal/bruit en fonction de $\Delta$ pour différents N.

Le rapport R peut ici être défini comme dans l'équation V.3 avec S le signal qui correspond au rapport S=$I_1/I_2$ et $\delta$S qui correspond au bruit de photons (lié à l'arrivée aléatoire de photons en nombre fini sur le détecteur), défini comme dans l'équation V.4. Comme chaque $\delta I \approx \sqrt{I}$, on obtient la deuxième partie de l'équation en V.4. Dans ces équations $I_1$ et $I_2$ correspondent respectivement aux cumulatives (ou intégrales) des courbes expérimentales de déclin de fluorescence des courbes de V.21(a) pour des temps entre : 20 ns et 20+$\Delta$ ns pour $I_1$ et entre 20+$\Delta$ et 20+2$\Delta$ ns pour $I_2$. Sur la **figure V.20** se trouve pour chaque N, le ratio R en fonction de $\Delta$. Grâce à cette courbe il est possible de voir quel $\Delta$ doit être choisi pour chaque N afin d'avoir le meilleur rapport signal sur bruit. Par exemple, pour N=5, le ratio R est le meilleur pour un $\Delta \approx 30$ ns.

$$R\left(\tau, \Delta\right) = \frac{S}{\delta S} \tag{V.3}$$

$$\delta S = S\sqrt{\left(\frac{\delta I_1}{I_1}\right)^2 + \left(\frac{\delta I_2}{I_2}\right)^2} \approx \sqrt{\frac{1}{I_1} + \frac{1}{I_2}} \tag{V.4}$$

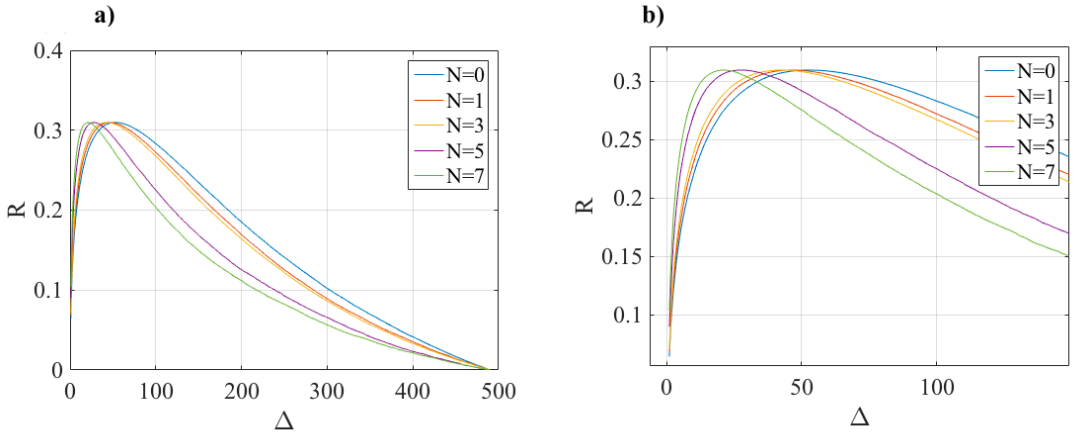



FIGURE V.20 – (a)Courbe présentant le ratio R en fonction de $\Delta$ obtenu pour chaque N avec les courbes obtenues expérimentalement de la **figure V.21(a)** (b) Zoom de la figure (a).

Ainsi, nous savons que, par la suite, nous choisirons un $\tau = 20$ ns et un $\Delta = 30$ ns pour N = 5. La courbe ci-dessous **figure V.21** présente le rapport d'intensité $I_1/I_2$ dans ces conditions lors de l'ajout de peptides-AuG par QD NIR. On observe qu'effectivement plus le nano-objet est en présence d'un nombre important de AuG à sa surface, plus ce rapport $I_1/I_2$ augmente.

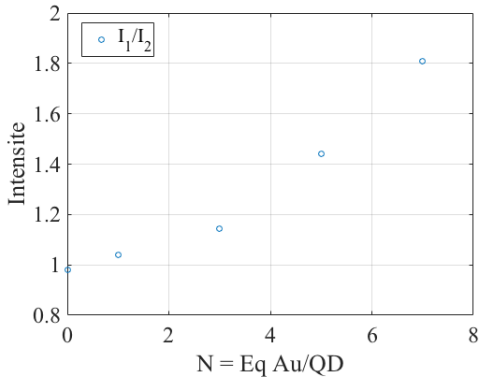



FIGURE V.21 – Évolution du ratio $I_1/I_2$ en fonction de l'ajout de AuG-peptide (N croissant).

### V.3.6 Détection de la collagénase et mesure de l'activité enzymatique

L'ajout de la collagénase peut ensuite être testé sur le nano-objet composé de QD-peptides-AuG. L'expérience a été refaite entièrement et est présentée sur la **figure V.22**. En **(a)**, 5 peptides-AuG ont été accrochés en moyenne par QD NIR. On observe l'apparition d'un fort transfert d'énergie. Dans une seconde étape, la collagénase a été ajoutée en excès (de façon à ce que la vitesse de clivage soit égale à $V_{max}$). La **figure V.22(b)** montre le suivi cinétique du clivage des peptides par la collagénase. Bien que la collagénase ait été ajoutée en une seule fois, nous pouvons voir que la réaction enzymatique dure environ 200 min. Plus le peptide est clivé et plus le temps de vie remonte. Au bout de 200 min, le temps de vie initial des QD NIR est totalement retrouvé !

Deux contrôles ont été effectués par la suite. Le premier est présenté en **figure V.22(c)**, il s'agit de la même expérience mais avec des peptides-AuG prédigérés par la collagénase (avant l'ajout sur les QD). Le second contrôle, en **figure V.22(d)** est la même expérience en ajoutant N = 5 AuG (sans peptide) sur les QD NIR. Ces deux contrôles confirment que le transfert d'énergie observé dans l'expérience (a) semble être liée à l'accroche de façon covalente des AuG via le peptide sur les QD NIR.

Cette expérience permet de mesurer l'activité enzymatique de clivage du peptide par la collagénase. Grâce aux courbes expérimentales obtenues lors du suivi de la cinétique de clivage, il est possible de tracer le rapport $I_1/I_2$ dans les mêmes conditions que précédemment. Cette courbe est tracée en **figure V.23**. Celle-ci permet de remonter, grâce à un ajustement exponentiel d'ordre un, à un temps caractéristique de clivage $\tau_{cat}$=1/k$_{cat}$ avec $k_{cat}$ la constante cinétique catalytique de clivage.

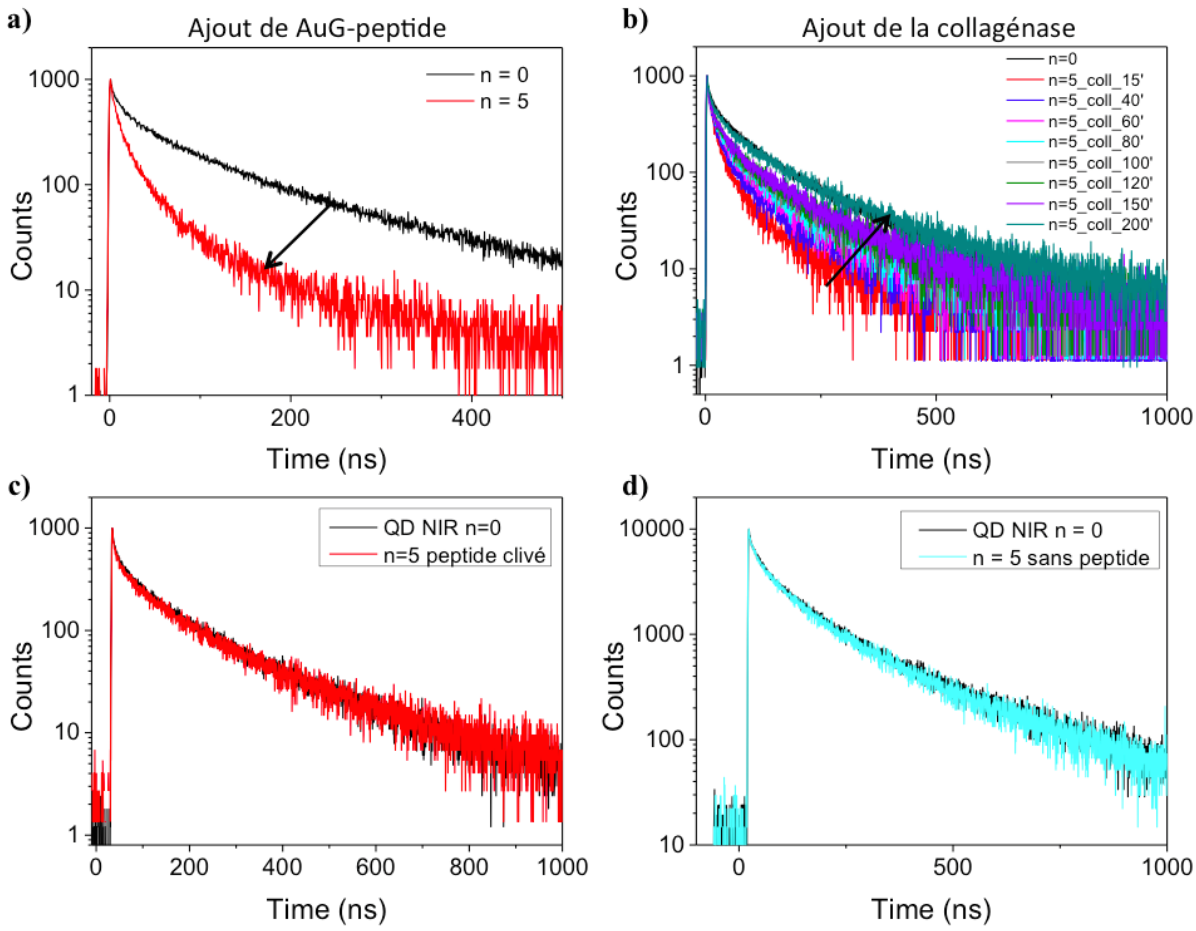



FIGURE V.22 – (a) Courbes de PL résolue en temps de QD NIR et de QD NIR accrochés (en moyenne) à 5 peptides-AuG. (b) Courbes de PL résolue en temps lors du clivage des peptides par l'enzyme. (c) Contrôle n°1 : même expérience mais avec les peptides-AuG prédigérés par la collagénase. (d) Contrôle n°2 : même expérience avec des AuG sans peptide. ($\lambda_{exc}$ = 400 nm)

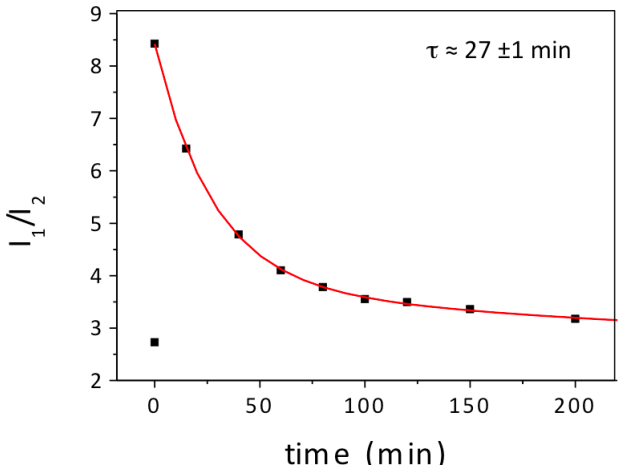



FIGURE V.23 – Courbe représentant $I_1/I_2$ obtenue grâce aux courbes expérimentales de PL résolue en temps lors du suivi cinétique de clivage des peptides.

Cette expérience montre qu'il a été possible d'observer la présence d'enzyme collagénase. Par ailleurs, le temps de vie de fluorescence à été totalement retrouvé, ce que nous autorise à faire des mesures d'activité catalytique. Cependant, ce projet n'est pas terminé. Il serait nécessaire de refaire des mesures d'activité enzymatique tel qu'il a été réalisé mais avec différents N de AuG-peptide par QD.

## Conclusion et perspectives du chapitre V

Dans ce chapitre, nous avons présenté la synthèse et les caractérisations des QD I-III-VI : $CuInSe_2$@ZnS qui sont des QD NIR. Nous avons montré qu'il est possible de passer ces QD dans l'eau et qu'ils conservent leur stabilité et leur temps de vie long même lorsqu'ils se trouvent à l'intérieur de cellules.

Ce chapitre a également permis d'expliquer le principe de l'imagerie à fenêtre temporelle qui permet de réduire drastiquement l'autofluorescence des tissus biologiques et de ne conserver que la fluorescence des QD NIR.

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous avons obtenu une nano-sonde qui permet de détecter cette enzyme soit à l'aide d'un transfert d'énergie avec des DyeNIR par FRET soit avec des AuG par NSET. Afin de pouvoir détecter la collagénase *in vivo*, l'imagerie à fenêtre temporelle sera utilisée avec deux fenêtres permettant de remonter à un rapport $I_1/I_2$ qui caractérise le transfert d'énergie et donc le système étudié. Nous avons aussi montré qu'il a été possible de déterminer $\tau$ et $\Delta$, les paramètres optimaux de l'imagerie à fenêtre temporelle en fonction de N, le nombre de particules d'or par QD. Par ailleurs, nous avons montré qu'il est possible d'étudier la cinétique de clivage des peptides à la surface des QD et d'obtenir leur constante cinétique $k_{cat}$.

L'étape suivante est de refaire la même expérience mais cette fois-ci *in vivo* et d'utiliser l'imagerie à double fenêtres temporelles afin de pouvoir faire des mesures d'activité enzymatique tout en s'affranchissant de l'autofluorescence des tissus.

Ce projet est en cours et il va être nécessaire de faire d'autres expériences. Il serait nécessaire de refaire des mesures d'activité enzymatique tel qu'il a été réalisé mais avec différents N de AuG-peptide par QD. Il serait intéressant d'obtenir la vitesse de clivage pour chaque concentration en enzyme (ou en peptide) puis de comparer les résultats avec la théorie de cinétique de Michaelis Menten par exemple ; ou bien aux résultats d'autres chercheurs qui ont mesuré l'activité catalytique de la même enzyme et du même peptide en transfert d'énergie mais en s'intéressant uniquement à l'intensité de fluorescence.

Chapitre VI

# Conclusion et perspectives

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les QD apparaissent très prometteurs pour leur utilisation comme sondes pour l'imagerie optique *ex vivo* et *in vivo* car leurs propriétés optiques permettent de dépasser certaines limites inhérentes aux colorants organiques. Cependant, tout comme de nombreuses autres nanoparticules, les QD présentent des limitations provenant majoritairement d'une chimie de surface imparfaite. Les études scientifiques ont montré de grandes améliorations de la stabilité des QD en travaillant sur les ligands accrochés à leur surface. Néanmoins le temps de circulation des QD dans le sang lors d'injections *in vivo* est toujours limité car la surface des ligands n'est pas totalement furtive. Lorsque les QD sont en présence d'un milieu biologique complexe, des protéiques s'adsorbent à la surface des particules, formant des couronnes soit dures soit dynamiques. Ces interactions induisent une reconnaissance par le système immunitaire et les QD s'accumulent dans les macrophages du foie ou de la rate.

De nombreuses équipes de recherche travaillent avec du PEG afin d'améliorer la furtivité. Notre équipe et plusieurs d'autres utilisent plutôt des zwitterions pour limiter ces interactions non spécifiques. Dans le **chapitre II** de cette thèse, j'ai utilisé des QD, comme NP modèles, recouverts de différents polymères zwitterioniques pour étudier spécifiquement les interactions non spécifiques avec des protéines. Trois techniques d'analyses ont été mises en place pour caractériser ces interactions. Deux analyses *in vitro* portant sur les couronnes dures et dynamiques ont été effectuées respectivement par dosage fluorimétrique et par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) après incubation des QD-zwitterioniques dans une solution d'albumine ou du sérum humain. La troisième technique est une mesure de diffusion dynamique des QD-zwitterioniques dans le cytoplasme des cellules vivantes. Nous avons démontré que les polymères zwitterioniques permettent une élimination partielle ou quasi-totale des couronnes dures et dynamiques de protéines. Des différences ont toutefois été observées entre les différents zwitterions : les QD-sulfobétaïne semblent totalement furtifs, aucune adsorption n'a été détec-

tée ; les QD-phsphorylcholine présentent une fine couche de protéines lorsqu'ils se trouvent dans une solution très concentrée de protéines ; et enfin, les QD-carboxybétaïne semblent s'agréger lorsqu'ils sont en présence de sérum humain.

J'ai aussi pu montrer que l'ajout, même en faible proportion, de charges positives ou négatives au sein du zwitterion sulfobétaïne modifie totalement les propriétés de furtivité des QD, surtout dans le cas des charges positives. Par ailleurs, les mesures de coefficients de diffusion à l'intérieur du cytoplasme de cellule HeLa sont cohérentes avec les analyses *in vitro*.

Ces nouvelles propriétés de furtivité ouvrent de toutes nouvelles perspectives pour l'utilisation de NP *in vivo*. En effet, la réduction des interactions non spécifiques devrait diminuer la reconnaissance des NP par le système immunitaire et donc augmenter leur temps de circulation dans le sang.

Par ailleurs, le ciblage des NP intracellulaire qui était très difficile jusqu'alors à cause d'interactions non spécifique avec des biomolécules du cytoplasme devient maintenant réalisable !

Pour prouver qu'en réduisant les interactions non spécifiques un ciblage est alors possible, nous avons ajouté une fonction de ciblage : la biotine, sur le polymère à base de sulfobétaine (SB). Cette dernière étant une petite molécule neutre ne modifie pas les propriétés de furtivité des QD. Nous avons montré que les QD-SB-Biotine parviennent correctement à atteindre leur cible fusionnée avec de la streptavidine, dans le cytoplasme de cellules vivantes.

Le projet du **chapitre III** porte sur la synthèse de nano-sondes fluorescentes réversibles pour l'imagerie du pH. De nombreuses équipes de recherche travaillent sur l'utilisation des QD pour l'imagerie *in vivo* afin de faire du ciblage de certaines biomolécules, tissus ou organes. En revanche, peu d'études ont été réalisées en utilisant la chimie de surface des QD pour les rendre sensibles au pH, et encore moins autour du pH physiologique. Dans ce projet, j'ai développé une nouvelle nano-sonde, basée sur des changements conformationnels réversibles des ligands polymères (pSMZ/LA) à la surface des QD. Ces nano-sondes se composent de QD soit visibles (CdSe@CdS/ZnS) soit SWIR (PbS@CdS) recouverts par des copolymères sensibles au pH et conjugués à des nanoparticules d'or de très petites tailles (2 nm de diamètre). Lorsque les particules d'or sont proches des QD, un transfert d'énergie diminue la fluorescence des QD et augmente leur cinétique de désexcitation. Une étude a été menée sur le polymère afin d'obtenir un pH de transition entre pH 7,5 et 6. Ensuite il a fallu assembler le nano-objet et déterminer le nombre optimal de particules d'or par QD.

Finalement, dans ces conditions optimales, en passant de pH 7,5 à pH 5,5 il a été possible d'observer une diminution de la fluorescence d'environ 50% que ce soit pour les QD visibles ou

SWIR. Dans ce projet, j'ai aussi montré que ces nano-sondes permettent des mesures ratiométriques du pH, soit en mesurant l'intensité de fluorescence soit en mesurant le temps de vie de l'état excité des QD.

De plus, dans un objectif de mesures ratiométriques *in vivo*, il est nécessaire que la nano-sonde et la référence restent colocalisées et qu'elles aient un long temps de circulation dans le sang. J'ai pu intégrer ces deux nano-objets dans des érythrocytes modifiés et il a été montré que la sensibilité au pH est conservée. Cette preuve de concept *ex vivo* montre que les nano-sondes fonctionnent même une fois incorporées dans les cellules sanguines.

Le **chapitre IV** propose de développer des petits agrégats (ici appelés micelles) de particules stabilisées par un polymère surfactant : pDPA-b-SB, sensible au pH pour la détection de tumeurs solides par fluorescence. Des particules d'or et des QD sont recouverts d'un ligands pDPA/LA qui peuvent précipiter en pH basique en même temps que la formation de micelles de pDPA-b-SB. Les particules se retrouvent alors au cœur des micelles qui les stabilisent. Ces micelles sont totalement éteintes à pH neutre et, lorsqu'elles se dissocient en pH acide, elle libèrent les particules, et les QD deviennent fluorescents.

Les nano-objets développés dans ce projet peuvent encapsuler différents types de particules : des QD visibles (CdSe@CdS/ZnS) ou des QD SWIR (PbS@CdS) mais aussi plusieurs types de particules d'or : AuG, Au5 ou Au8.

Différents polymères surfactants ont été synthétisés permettant d'obtenir plusieurs tailles de micelles. Par la suite, plusieurs paramètres ont été étudiés pour optimiser ces micelles encapsulant les NP tels que : l'influence de la concentration du polymère surfactant ainsi que sa taille et l'influence de la taille des particules d'or ainsi que le ratio N = #AuNP/QD.

Des résultats préliminaires montrent qu'avec des micelles encapsulant des QD visibles et soit des AuG (N = 4,5) soit des Au5 (N = 1), il est possible d'atteindre 75% de diminution de fluorescence lors de la formation des micelles et que cette fluorescence est totalement retrouvée en passant en milieu acide. Avec des QD SWIR et des AuG (N = 5) il est possible d'atteindre 80%. Comme les nano-objets devraient être furtifs (contrairement au chapitre III) ils ne devraient pas être nécessaire d'injecter ces nano-objets dans des érythrocytes.

Le projet du **chapitre V** a montré qu'il est possible de créer une nano-sonde sensible à l'activité enzymatique de la collagènase qui est une enzyme surexprimée dans les tumeurs solides. Cette nano-sonde est composée d'un fluorophore dans le proche infrarouge : un QD $CuInSe_2$@ZnS qui est initialement proche d'accepteurs d'énergie qui peuvent être soit des colorants IR soit des AuNP. Il y a alors un transfert d'énergie entre le QD et l'accepteur. Un

peptide relie les accepteurs au QD. En présence de collagènase, le peptide est clivé et le transfert d'énergie diminue car les accepteurs sont éloignés du QD. Nous avons prouvé qu'il est possible de suivre la cinétique de l'activité enzymatique par des mesures de temps de vie des QD. Nous avons aussi montré qu'il sera possible de faire de l'imagerie optique à double portes temporelles permettant de suivre l'activité enzymatique *in vivo* en s'affranchissant de l'auto-fluorescence des tissus.

# PERSPECTIVES

Les perspectives du **chapitre II** sont multiples. Une stagiaire au laboratoire est actuellement en train d'étudier par FCS le comportement de NP d'oxydes de fer recouvert de polymères zwitterioniques après incubation avec des protéines. L'objectif, ici, est de savoir si les interactions non spécifiques entre les biomolécules et les NP entièrement recouvertes de zwitterion sont dépendantes du type de particules. Les premiers résultats de ces expériences semblent montrer des résultats tout à fait similaires à ceux présentés dans cette thèse, ce qui confirme les propriétés de furtivité des sulfobétaïnes.

Par ailleurs, une collaboration est en cours avec Johanne Seguin de l'institut de pharmacie à l'UTCBS afin dévaluer la biodistribution des différents QD-zwitterions (SB, PC, CB) ainsi que leur temps de circulation dans le sang de souris. Les objectifs sont de voir si il y a des corrélations directes entre nos résultats *in vitro* en présence de protéines ou de sérum humain ou encore à l'intérieur de cellules vivantes ; et par ailleurs le temps de circulation *in vivo* de nos particules chez le petit animal. D'autres expériences chez le petit animal pourraient également être effectués pour comparer les temps de circulation dans le sang des QD-SB-$NH_3^+$, les QD-SB-$COO^-$ et les QD-Biotine.

Il pourrait aussi être possible de travailler avec des QD recouverts de PEG afin d'étudier les différences avec les polymères zwitterioniques. Cela représente, cependant, un travail conséquent car il faudrait étudier l'influence de la taille du polymère mais aussi la densité de greffage ou encore étudier le type de polymères : linéaire, branché, étoilé...

Une autre perspective de ce projet pourrait être de faire des analyses protéomiques de la couronne de protéines afin de pouvoir identifier quel polymère interagit avec quel zwitterion. Ces analyses permettraient par exemple de mieux comprendre les interactions que nous avons observées notamment entre les QD-CB avec des protéines du sérum humain.

Afin d'aller plus loin dans le projet du **chapitre III**, il serait nécessaire de tester les nano-objets SWIR sensibles au pH directement dans des souris présentant des tumeurs solides. Ceci va peut-être pouvoir être réalisé par Johanne Seguin de l'institut de pharmacie à l'UTCBS, qui pourrait injecter nos nano-objets, encapsulés dans les érythrocytes, dans des souris ayant une tumeur ou alors dans des souris présentant une inflammation car les tissus inflammés présentent aussi une certaine acidité.

Une autre perspective de ce chapitre pourrait être de développer des sondes de pH réversibles qui s'allument cette fois-ci en milieu acide contrairement à nos nano-objets du chapitre III dont la fluorescence diminue à pH acide. Pour cela il est nécessaire de trouver un nouveau polymère dont la longueur peut varier lors du changement de pH sans qu'il ne provoque la

précipitation des QD.

Les perspectives du **chapitre IV** sont très nombreuses. Tout d'abord, il faut encore continuer l'optimisation de l'assemblage des micelles pour réussir à avoir un transfert d'énergie encore plus grand. En travaillant sur le ratio N pour chaque type de QD, il devrait être possible d'augmenter le contraste entre pH neutre et acide.

A court terme, il sera aussi possible de ne plus utiliser des nanoparticules d'or sphériques mais d'utiliser des GNR ayant des pics plasmoniques longitudinaux à la longueur d'onde d'émission des QD NIR ou SWIR. Ceci permettra très certainement d'augmenter encore le contraste entre pH neutre et acide.

Par ailleurs, les GNR peuvent aussi, sous illumination, libérer de la chaleur ce qui pourrait permettre de faire, en plus de l'imagerie optique, de la thérapie par photothermie lorsque les GNR seraient libérés dans le micro-environnement tumoral. Les nanoparticules une fois libérées à pH acide sont aussi recouvertes positivement, or certaines équipes de recherche montrent que la chimie de surface des NP influe sur leur endocytose et que les NP recouvertes de ligands chargés positivement se font plus endocyter que celles recouvertes de ligands neutres ou négatifs.

L'une des perspectives du **chapitre V** est d'étudier, tout d'abord, le même système de nano-sonde : QD-peptide-AuG, avec d'autres peptides pour obtenir les cinétiques de clivage de chaque système. Il sera intéressant de comparer ces cinétiques avec la théorie de Michaelis Menten, ainsi qu'avec les résultats d'autres équipes de recherche qui étudient l'activité enzymatique par mesure du déclin de fluorescence et non du temps de vie.

Dans une seconde étape, toutes ces expériences seront réalisées *in vivo* en faisant de l'imagerie à double portes temporelles à l'aide du montage optique de notre laboratoire, détaillé dans le chapitre V. Ceci sera très intéressant car il sera alors possible de mesurer d'activité enzymatique *in vivo*.

LISTES DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET POSTERS

## Chapitre II : Adsorption non spécifique de protéines sur des QD

### Article :

**M. Debayle**, E. Baloul, F. Dembele, X. Xu, M. Hanafi, F. Ribot, C. Monzel, M. Coppey, A. Fragola, M. Dahan, T. Pons, N. Lequeux. « Zwitterionic Polymer Ligands: an Ideal Surface Coating to Suppress Protein-Nanoparticle Corona Formation ? » ; Article en révision dans *Biomaterials*, 2019.

### Communication :

**M. Debayle**, E. Baloul, M. Dahan, T. Pons, N. Lequeux (Août 2018) *ACS National meeting*, « Antifouling zwitterionic quantum dot surface chemistry : impact on intracelluar diffusion » ; Boston USA. → **Prix de la meilleure présentation**

### Posters :

**M. Debayle**, T. Marchandier, N. Lequeux, T. Pons (Juin 2017), *Ecole d'été CNano*, « Fluorescent SWIR nanocrystals : proteins interactions & pH probe » ; Etiolles, France.

**M. Debayle**, M. Debayle, T. Marchandier, N. Lequeux, T. Pons (Décembre 2018), Congrès national *CNano*, « Zwitterionic Polymer Ligands: an Ideal Surface Coating to Suppress Protein-Nanoparticle Corona Formation ? » ; Toulon, France. → **Prix du meilleur poster**

## Chapitre III : Sondes de pH fluorescentes et réversibles

### Article :

**M. Debayle,** T. Marchandier, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. « pH Sensitive Quantum Dot Nanoprobes Using Conformation-Switchable Copolymeric Ligands »; Article soumis dans ACS *Appl. Matter. Int.*, 2019.

### Communications :

**M. Debayle**, T. Marchandier, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. (Juin 2017) *Opt&Diag*, « Fluorescent nanocrystals for *in vitro* and *in vivo* pH imaging » ; Paris, France.

**M. Debayle**, T. Marchandier, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. (Août 2018) *ACS National meeting*, « pH Sensitive Quantum Dot Nanoprobes Using Conformation-Switchable Copolymeric Ligands » ; Boston USA. → **Prix de la meilleure présentation**

**M. Debayle**, T. Marchandier, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. (Décembre 2018) *Congrès national Cnano,* « pH Sensitive Quantum Dot Nanoprobes Using Conformation-Switchable Copolymeric Ligands » ; Toulon, France.

### Poster :

**M. Debayle**, T. Marchandier, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. (Juin 2017) *Opt&Diag* « Fluorescent nanocrystals for *in vitro* and *in vivo* pH imaging » ; Paris, France. → **Prix du meilleur poster**

## Chapitre IV : Micelles sensibles au pH

### Article :

**M. Debayle,** F. Ribot, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. « Fluorescent SWIR QD with pH sensitive zwitterionic micelles for *in vivo* pH imaging »; Article en préparation, 2019.

### Communication :

**M. Debayle**, X. Xu, N. Lequeux, T. Pons. (Mai 2019) *Workshop on colloïdal nanocrystals,* « Encapsulation of fluorescent SWIR nanoparticles with pH sensitive zwitterionic micelles for solid tumors' detection » ; Paris, France.

## Chapitre V : Détection d'enzymes par imagerie

### Communications :

**M. Debayle**, S. Bouccara, N. Lequeux, V. Loriette, A. Fragola, T. Pons. (Août 2018) *ACS National meeting,* « Time-gated fluorescence imaging and sensing using long lifetime near infrared quantum dots » ; Boston USA.

**M. Debayle**, S. Bouccara, N. Lequeux, V. Loriette, A. Fragola, T. Pons. (Décembre 2018) *CNano nanoscience,* « Time-gated fluorescence imaging and sensing using long lifetime near infrared quantum dots » ; Toulon, France.

## Autre :

### Article :

T. Mangeolle, I. Yakavets, S. Marchal, **M. Debayle**, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Marchal. « Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis » ; *MDPI Nanomaterials* ; 8, p572, 2018.

### Conférence expérimentale :

**M. Debayle**, N. Lequeux, T. Pons. (Janvier 2019), ESPGG, ESPCI, « En voir de toutes les couleurs avec l'or nanométrique. » Paris, France.

Chapitre VII

# Annexes

**Sommaire**


VII.1 PROTOCOLE DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS TAMPONS 206
VII.2 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES . . . . . 207
VII.3 SYNTHÈSE DES LIGANDS . . . . . 212
VII.4 SYNTHÈSE DES POLYMÈRES . . . . . 216
VII.5 ÉCHANGE CLASSIQUE DE LIGANDS . . . . . 223
VII.6 SYNTHESE DES QD-SB-$COO^-$ . . . . . 223
VII.7 SYNTHESE DES QD-SB-BIOTINE . . . . . 224
VII.8 INCORPORATION DES QD DANS DES ÉRYTHROCYTES . 224
VII.9 RÉACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE . . . . . 225
VII.10 ANALYSES DE LA COURONNE DURE DE PROTÉINES . . 226
VII.11 POLYMÉRISATION RAFT . . . . . 227
VII.12 PRINCIPE DE LA RMN DOSY . . . . . 228
VII.13 ANALYSE DE LA COURONNE DURE PAR FCS ET CALIBRATIONS . . . . . 230
VII.14 SUIVI DE QD UNIQUE DANS DES CELLULES HELA . . . . 233
VII.15 CIBLAGE DE QD SUR LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE 234
VII.16 THÉORIE DU FRET . . . . . 235
VII.17 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION . . . . . 238
VII.18 PRODUITS CHIMIQUES UTILISES . . . . . 241

## VII.1 PROTOCOLE DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS TAMPONS

• Bicarbonate 0.1 M, pH 10,8 : 8,40 g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et 28,62 g de décahydrate de carbonate de sodium ($Na_2CO_3.10H_2O$) ont été dissous dans 1NL d'eau milliQ. Le pH a été ajusté à 10,8 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH, 97%, Prolabo).

• Borate 10 mM, 100 mM NaCl, pH 8 : 476 mg d'acide borique ($H_3BO_3$), 254 mg de tétraborate de sodium ($Na_2B_4O_7$) et 5,8 g de chlorure de sodium (NaCl) ont été dissous dans 1 L d'eau milliQ. Le pH a été ajusté à 8 avec NaOH.

• Borate 0.1 M, pH 8 : 4,76 g de $H_3BO_3$ et 2,54 g de $Na_2B_4O_7$ ont été dissous dans 1 L d'eau milliQ. Le pH a été ajusté à 8 avec NaOH. Pour obtenir ce même tampon avec 10 mM de NaCl, 580 mg de de NaCl ont été dissous dans la solution.

• HEPES 5 mM, 50 mM NaCl, pH 7 : 1,19 g d'HEPES et 2,9 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ. Le pH a été ajusté à 7,5 avec NaOH.

• HEPES 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,5 : 2,38 g d'HEPES et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ. Le pH a été ajusté avec HCl et NaOH.

• HEPES 50 mM,100 mM NaCl, pH 6, pH 7, pH 7,5 ou pH 8,5 : 11,9 g d'HEPES et 5,8 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ. Le pH a été ajusté avec HCl ou NaOH.

• MES 100 mM,150 mM NaCl, pH 7,1 : 0,18 g de MES acide, 2,14 g MES basique et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ.

• MES 100 mM,150 mM NaCl, pH 6,6 : 0,47 g de MES acide, 1,64 g MES basique et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ.

• MES 100 mM,150 mM NaCl, pH 6,1 : 0,97 g de MES acide, 1,08 g MES basique et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ.

• MES 100 mM,150 mM NaCl, pH 5,6 : 1,47 g de MES acide, 0,53 g MES basique et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ.

• MES 100 mM,150 mM NaCl, pH 5,1 : 1,93 g de MES acide, 0,20 g MES basique et 8,7 g de NaCl ont été dissous dans 0,1 L d'eau milliQ.

## VII.2 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES

### ○ Synthèse des QD CdSe@CdS/ZnS

#### Synthèse des coeurs de CdSe

Les cœurs de CdSe ont été synthétisés via le protocole de Cao [220]. Du sélénium en poudre (12 mg) est ajouté à du cadmium myristate (174 mg) dans un ballon tricol avec 16 mL d'ODE (octadécène). Le mélange est dégasé à température ambiante pendant 20 min, puis passé sous argon et mélangé pendant 10 min à 240°C. Après cela, de l'acide oléique (1 mL) est ajouté en goutte à goutte pour stabiliser la croissance des nanocristaux. La solution est ensuite transvasée dans des tubes et les QD sont précipités dans l'éthanol (6000 g, 5 min) avant d'être suspendus dans 10 mL d'hexane.

#### Précurseurs pour les coques

Les synthèses des différents précurseurs nécessaires pour la coque sont les suivantes :
• Le précurseur de cadmium dans ODE à 0,1 M (Cd-ODE) est obtenu en diluant 2 mL de (Cd(oléate)2) dans 8 mL d'ODE.
• Le précurseur de soufre dans ODE à 0,1 M (S-ODE) est obtenu en ajoutant des paillettes de soufre (320 mg) dans 100 mL d'ODE chauffé à 120 °C sous atmosphère d'argon après dégazage préalable à 70°C. La solution, limpide, passe du jaune clair au transparent en refroidissant.
• Le précurseur de zinc dans ODE à 0,1 M (Zn-ODE) est obtenu en diluant 2 mL de zinc oléate (Zn(oléate)2) dans 8 mL d'ODE.

#### Synthèse des coques

Il faut calculer la concentration des cœurs de CdSe pour connaître la quantité de précurseur de coque à injecter. Pour y parvenir, on peut calculer le volume d'une monocouche puis on utilise cette information, ainsi que la densité du matériau, pour connaître la quantité de précurseur nécessaire. Dans cette synthèse de coque d'abord 3 monocouche de CdS ont été déposées, puis 2 monocouches de $Cd_{0,5}Zn_{0,5}S$ puis 2 monocouches de ZnS. Pour cette coque, la méthode SILAR (détaillée dans le chapitre I) a été utilisée.
Dans un premier temps, les cœurs de CdSe dans l'hexane, 2 mL d'oleylamine et 10 mL d'ODE ont été dégazés sous vide à 60°C pendant au moins 1 h. Le ballon est ensuite mis sous Argon et les deux premières injections de précurseur, Cd-ODE et S-ODE, sont effectuées à froid. La température est ensuite élevée à 230°C et les précurseurs suivants sont injectés en respectant un intervalle de 10 min entre chaque injection. Après la formation des 3 monocouches de CdSe, la température est élevée de 20°C supplémentaires ; Cd-ODE et Zn-ODE sont alors injectés simultanément dans le mélange. Le produit final est transvasé dans des tubes et la purification de l'échantillon se fait successivement par ajout d'acide oléique, puis d'éthanol (6000 g, 5 min).

Finalement, les QDs sont resuspendus dans l'hexane et l'on estime que leur quantité n'a pas variée par rapport à l'étape de synthèse des cœurs.

### ∘ Synthèse des QD $CuInSe_2/ZnS$

#### Synthèse des coeurs

Dans un ballon tricol mettre : 0,4 mmol de CuCl, 0,4 mmol de $InCl_3$, 0,8 mmol de SeU, 0,8 mmol d'acétate de zinc ($Zn(OAc)_2$), 10 mL d'octadecene (ODE), 4 mL de trioctylphosphine (TOP), 4 mL d'oléylamine (OAm) et 2 mL de dodecanethiol (DDT). La réaction se fait sous argon après avoir dégazé. Une fois la température à $230^oC$, il faut monter d'environ $10^oC$ toutes les 10 min pendant 40 min. A la fin de la réaction les QDs sont précipités dans l'éthanol puis redispersés dans l'hexane (10 mL).

#### Synthèse des coques de ZnS

Dans un ballon tricol mettre : 4 mL des coeurs, 1 mL d'OAm et 4 mL d'ODE. Evaporer l'hexane sous vide. Préparer dans une seringue : 50 mg de $Zn(dedc)_2$, 500 mg de $Zn(OAc)_2$, 3mL de TOP et 1 mL de dioctylamine. Injecter le contenu de la seringue en 1 h à $190^oC$. Les QDs sont lavés comme précédemment par précipitation/dispersion dans l'éthanol puis l'hexane.

### ∘ Synthèse des QD PbS/CdS

#### Synthèse des coeurs de PbS

La synthèse des QD PbS et PbS/CdS a été adaptée à partir de rapports précédents [107,129]. Une solution de précurseur de soufre-oléylamine (S-OAm) a été préparée en chauffant du soufre (0,16 g) et de l'oléylamine (15 ml) à 125°C sous argon pendant 30 min. Séparément, du $PbCl_2$ (0,834 g) a été dissous dans de l'oléylamine (7,5 ml) et dégazé sous vide pendant 30 min à 125°C. Il a ensuite été chauffé pendant 30 minutes à 150°C sous atmosphère d'argon. La température a été abaissée à 60°C et la solution de S-OAm (2,25 ml) a été injectée. La température a été maintenue à 60°C pendant 4 minutes avant de revenir à la température ambiante. Les QD PbS ont été précipités dans de l'éthanol et remis en suspension dans 10 ml d'hexane. Ensuite, 3 ml de cette solution centrale de PbS ont été précipités dans de l'éthanol et remis en suspension dans de l'octadécène (3 ml).

#### Synthèse des coques de PbS/CdS

Séparément, un mélange d'oléate de cadmium (3,9 mL, 0,5 M dans l'acide oléique) et d'octadécène (2,6 mL) a été dégazé sous vide à 110°C puis refroidi à 100°C sous argon. La solution de QD PbS dans l'octadécène a ensuite été injectée et maintenue à 100°C pendant 10 minutes. La solution a ensuite été refroidie à la température ambiante, précipitée dans de l'éthanol et

remise en suspension dans 10 mL d'hexane. La concentration de QD cœur/coquille a été estimée à partir des mesures d'absorbance et de taille TEM sur la solution centrale PbS.

### ∘ Synthèse des AuG

Des nanoparticules d'or de très petites tailles (≈ 2 nm de diamètre) appelés germes d'or et notés AuG ont été synthétisées en suivant le protocole [309]. A une solution de 91 mL d'eau milliQ pure, on a ajouté NaOH (3 mL, 0,2 M), puis du chlorure de tétrakis(hydroxyméthyl)phosphonium (THPC, 24 µL, 80% en poids). Après 5 min d'agitation, de l'acide tétrachloroaurique d'hydrogène ($HAuCl_4$, 6 ml, 20 mM) a été injecté goutte à goutte dans la solution. La solution vire au brun pendant 15 min d'agitation et est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation. Leur concentration a été déterminée en utilisant la section efficace d'extinction des particules estimée à partir des calculs de diffusion de Mie et leur absorbance à 400 nm.

### ∘ Synthèse des Au5

La synthèse des AuNP de 5 nm de diamètre est inspirée de la synthèse de Brown *et al.* [310]. Globalement, 1 mL de solution d'acide tétrachloroaurique d'hydrogène ($HAuCl_4$) à 25 mM est ajouté dans 90 mL d'eau milliQ. Agitation pendant 1 min. Ajouter, ensuite, 2 mL d'une solution de citrate de sodium à 38,8 mM. Mélange pendant 1 min avant d'ajouter 1 mL de 0,075% wt de tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) à préparer dans une solution de citrate de sodium à 38,8 mM. Mélanger pendant 5 min. La solution de Au5 est stable est peut être conservée à température ambiante. Leur concentration a été déterminée en utilisant la section efficace d'extinction des particules estimée à partir des calculs de diffusion de Mie et leur absorbance à 400 nm.

### ∘ Synthèse des Au8

La synthèse des AuNP de 8 nm de diamètre est inspirée de la synthèse de Puntes *et al.* [311]. Dans un ballon tricol, mettre 150 mL de citrate de sodium à 2,2 mM puis, 0,1 mL d'acide tannique à 2,5 mM, suivi de 1 mL de $K_2CO_3$ à 150 mM. Le mélange est chauffé à 70°C puis 1 mL d'acide tétrachloroaurique d'hydrogène ($HAuCl_4$) à 25 mM est injecté. La solution passe de la couleur noir à rouge en quelques minutes. Laisser le mélange sous agitation à 70°C pendant 10 min.
Par la suite enlever 50 mL de la solution et ajouter 50 mL de citrate de sodium à 2,2 mM suivi de 0,5 mL de $HAuCl_4$, attendre 10 min, puis encore 0,5 mL de $HAuCl_4$ et 10 min d'attente. Recommencer ce processus trois fois.
Le plasmon se développe au fur et à mesure. La concentration a été déterminée en utilisant la section efficace d'extinction des particules estimée à partir des calculs de diffusion de Mie et leur absorbance à 400 nm.

### ○ Synthèse des Au20

La synthèse des AuNP de 20 nm de diamètre est inspirée de la synthèse de El Sayed *et al.* [261].
Dans un erlenmeyer soigneusement lavé et rincé à l'eau distillée, ajouter 100 mL d'eau MilliQ et 1 mL de solution aqueuse de chlorure d'or(III) ($HAuCl_4.3H_2O$, Mw = 393,83 g/mol) à une concentration de 2,5.10–2 M.
Porter à ébullition sous agitation puis ajouter d'un coup 5 mL d'une solution aqueuse de citrate de sodium tribasique dihydrate à 1% en masse, ce qui permet la réduction de Au(III) en Au(0). Laisser réagir sous agitation et ébullition pendant 20 minutes. Enfin, laisser ensuite refroidir sous agitation pendant 20 minutes. On obtient une suspension de couleur « rouge rubis » de nanoparticules d'or d'environ 20 nm de diamètre. On stocke cette suspension dans une bouteille en complétant le volume à 100 mL d'eau. La concentration a été déterminée en utilisant la section efficace d'extinction des particules estimée à partir des calculs de diffusion de Mie et leur absorbance à 400 nm.

### ○ Synthèse des GNR

**Solution de Germes :** Dans un ballon ou un pilulier chauffé à 27°C à l'aide d'un bain-marie, mettre 7,5 mL d'une solution aqueuse de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTABr) à 0,1M. Ajouter 100 µL de solution aqueuse de chlorure d'or(III) ($HAuCl_4.3H_2O$) à 25 mM. On observe un changement de couleur du jaune à l'orange-marron brillant qui est dû à la substitution du ligand $Cl^-$ par $Br^-$ autour des ions $Au^{3+}$. Sous agitation, additionner d'un coup 600 µL d'une solution aqueuse de $NaBH_4$ à 10 mM très fraichement préparée (moins de 2 min avant car $NaBH_4$ s'hydrolyse très vite dans l'eau). Il se produit immédiatement un changement de couleur de l'orange vers le marron, dû à la précipitation de particules d'or sphériques de quelques nanomètres de diamètre, stabilisées par la bicouche de tensioactif CTAB. Laisser cette solution au bain-marie sous agitation pendant 30 min avant de l'utiliser. Attention cette suspension ne se conserve pas très bien (grossissement des germes) et doit être utilisée dans les 5 heures suivant la synthèse.

**Solution de Croissance :** Dans un pilulier placé dans un bain-marie à 30-35°C, préparer une solution aqueuse de 10 mL de 36 $g.L^{-1}$ de CTAB et 4,4 $g.L^{-1}$ d'acide 5-Bromosalicylique. Ajouter 9,6 mL d'eau déionisée puis 480 µL d'une solution de nitrate d'argent à 4 mM et attendre 15 min. Ajouter ensuite 400 µL de chlorure d'or ($HAuCl_4$) à 25 mM. Agiter fortement puis laisser au repos pendant une quinzaine de minutes au bain-marie à 25-30°C. On constate une disparition progressive de la couleur jaune, due à la réduction des ions $Au^{3+}$ par les additifs aromatiques en $Au^+$. Ajouter ensuite 80 µL d'une solution d'acide ascorbique à 50 mM. Prélever 30 µL de la solution de germes, les ajouter d'un coup dans la solution de croissance et agiter immédiatement (sous vortex de préférence) pendant environ 20 secondes. Laisser sans agitation au bain-marie. Au bout de quelques minutes, les germes grossissent et la solution

devient colorée. Laisser réagir environ 30 mn à 60 mn (jusqu'à ce que la coloration ne varie plus). La suspension reste stable pendant plusieurs jours.

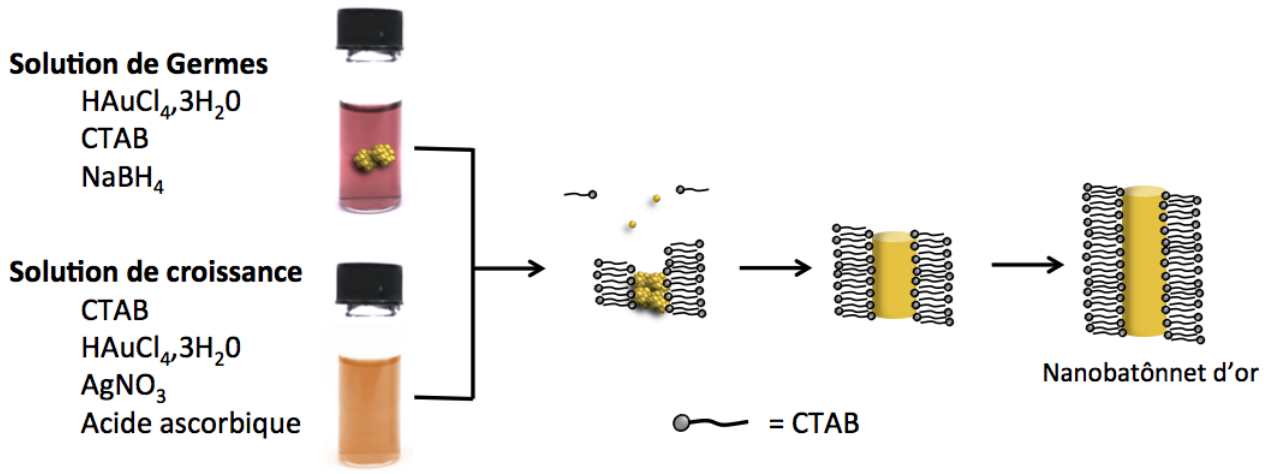



FIGURE VII.1 – Schéma de la synthèse des GNRs.

## VII.3 SYNTHÈSE DES LIGANDS

### Monomère Vinylimidazole (4VIM)

4VIM a été synthétisé avec une décarboxylation de l'acide 4-imidazoleacrylique sous vide à 1 mbar à 220-240°C. Le rendement de cette synthèse vaut 55 %. $^{1}$H NMR (400 MHz, D2O, $\delta$) : 7.57 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.53 (dd, 1H), 5.53 (dd, 1H), 5.05 (dd, 1H).

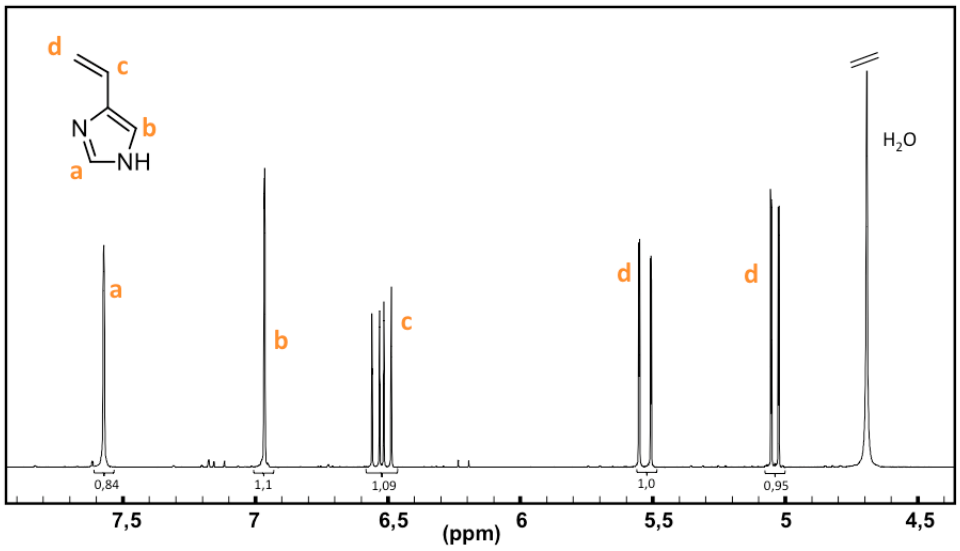



FIGURE VII.2 – Spectres RMN $^{1}$H ($D_2O$, 400 MHz) du monomère VIM.

### Monomère carboxybétaïne : CB

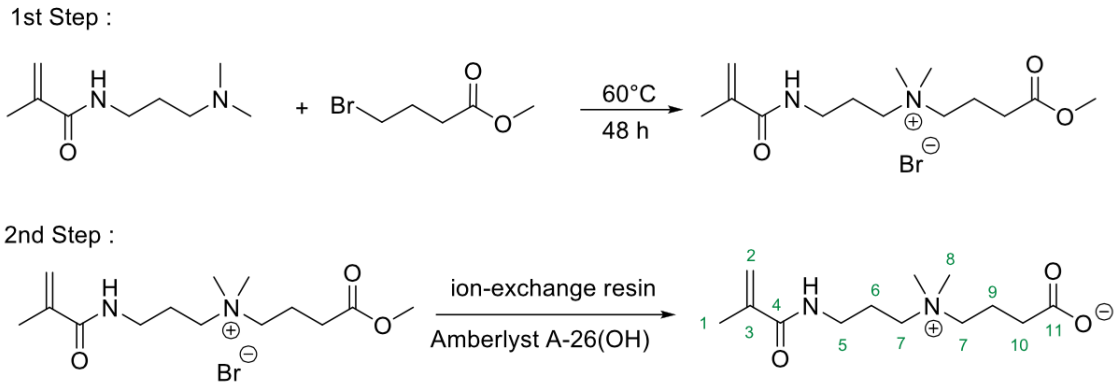



FIGURE VII.3 – Synthèse du monomère CB.

Du N-[3-(diméthylamino)propyl] méthacrylamide (8 g, 47 mmol) a été mélangé avec du 4-bromobutyrate de méthyle (10,2 g, 56 mmol) et chauffé à 60°C pendant 48 h sous argon. Le solide formé a été dissous dans du méthanol puis précipité dans de l'éther diéthylique. Cette

opération a été répétée deux fois. Le produit a été dissous dans de l'eau et passé sur une résine échangeuse d'ions Amberlyst@A-26(OH) afin d'hydrolyser la fonction terminale ester. L'eau a été éliminée sous vide. Rendement = 80-90%. RMN $^1$H (400 MHz, D2O, $\delta$) : 5,60 (s, IH), 5,36 (s, IH), 3,16-3,28 (m, 6H), 2,97 (s, 6H), 1,17 ( t, 2H), 1,84-1,95 (m, 4H), 1,81 (s, 3H). RMN $^1$3C (100 MHz, D2O, $\delta$) : 180 (C11), 172 (C4), 139 (C3), 121 (C2) ; 63 (C5), 61 (C7), 51 (C8), 36 (C7), 32 (C10), 22 (C6), 18 (C9), 17 (C1) (voir ci-dessous).

### Monomère lipoamide méthacrylamide : LA

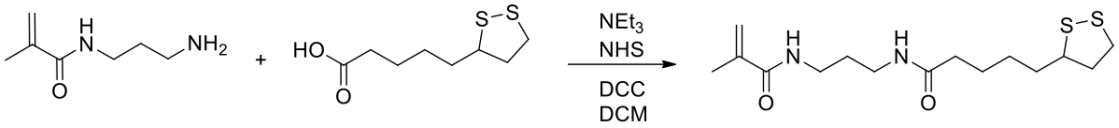



FIGURE VII.4 – Synthèse du monomère LA.

De la triéthylamine (2,5 ml, 17,9 mmol) a été ajoutée à une suspension de APMA-HCl (2 g, 11,2 mmol) dans du dichlorométhane (20 mL). Du méthanol (2 ml) a été introduit pour obtenir une solubilisation complète. Une solution de LA (2,76 g, 13,4 mmol) dans du dichlorométhane (5 ml) a ensuite été ajoutée, suivie de NHS (1,58 g, 13,8 mmol). Le mélange réactionnel a été refroidi à 0°C avec un bain de glace et une solution de DCC (3,00 g, 14,4 mmol) dans du dichlorométhane (10 ml) a été injectée en goutte à goutte. Le milieu a été réchauffé à température ambiante et agité pendant une nuit. Une solution jaune pâle contenant un précipité blanc a été obtenue. Une extraction liquide-liquide est ensuite effectuée. Le milieu réactionnel est lavée avec une solution aqueuse à 0,1 M de HCl (2 x 50 ml), de l'eau désionisée (1 x 50 ml) et une solution basique de NaOH à 0,2 M (2 x 50 ml). La phase organique a été séparée, séchée sur $MgS0_4$, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu brut a été purifié par Chromatographie sur silice (éluant : hexane / acétate d'éthyle : 1/4, puis hexane / acétone : 1/1). Après évaporation du solvant, on obtient le monomère LA (2,88 g, 8,71 mmol, 78%) sous la forme d'un solide jaune pâle. Rf = 0,37 (hexane / acétone 1/1) ; RMN $^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) : $\delta$ 7,03 (s, 1H) ; 6,87 (s, 1H) ; 5,72 (s, 1H) ; 5,29 (s, 1H) ; 3,53-3,39 (m, 1H) ; 3,29 à 3,20 (m, 4H) ; 3,14-3,01 (m, 2H) ; 2,43-2,35 (m, 1H) ; 2,18 (t, J = 8,0 Hz, 2H) ; 1,92 (s, 3H) ; 1,88-1,80 (m, 1H) ; 1,68-1,55 (m, 6H) ; 1,48-1,33 (m, 2H).

### Ligand LASB

L'acide lipoïque ajouté à la sulfobétaïne, LASB, a été synthétisé conformément au protocole précédemment publié [312].
Cette synthèse a été effectuée en deux étapes. La première est un couplage peptidique entre l'acide lipoïque et le DMED (N,N-diméthylethylenediamine). Typiquement, l'acide lipoïque (20 mmol) et le CDI (1,1-carbonyldiimidazole) (26 mmol) sont dissous dans du chloroforme

(30 mL) et mélangés sous diazote pendant 20 min à température ambiante. Cette solution est ensuite ajoutée en goutte à goutte à 100 mmol de DMED dans un bain de glace, puis mélangé pendant 2 h sous atmosphère inerte. Cette synthèse est suivie de trois extractions liquide-liquide avec une solution aqueuse contenant 10% de NaCl suivi d'un lavage basique avec une solution de NaOH à 10 mM. Le produit est ségé sur sulfate de magnésium anhydre puis le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le produit est un liquide jaune. Le rendement de cette première étape atteint 90%.

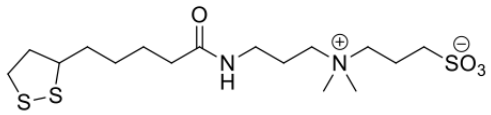


FIGURE VII.5 – Synthèse du ligand LASB.

L'étape suivante est l'ajout de 1,3-propanesultone (30 mmol) dans 30 mL dans une solution de chloroforme anhydre qui contient le produit précédent (10 mmol). La solution est mise sous agitation pendant 24 h. Un solide jaune pale précipite. Une filtration sur Büchner avec lavage au chloroforme permet de récupérer le produit.
Rendement = 80%, RMN $^1$H (400 MHz, $D_2O$, $\delta$) : 3,66-3,75 (m, 4H), 3,46-3,55 (m, 4H), 3,14-3,29 (m, 8H), 2,96-3,01 (t, 2H ), 2,44-2,54 (m, 1H), 2,19-2,32 (m, 4H), 1,94-2,05 (m, 1H), 1,55-1,79 (m, 4H), 1,36-1,46 (m, 2H).

### Monomère sulfadimetoxine : SDM

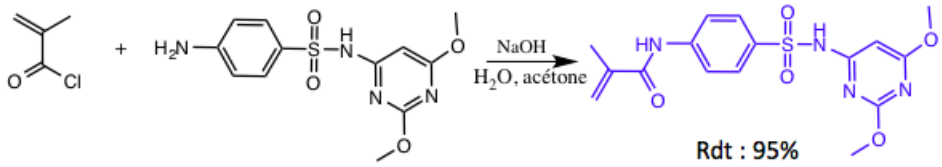



FIGURE VII.6 – Synthèse du monomère SDM.

Le sulfadimethoxine (SD) commercial (10 mmol) a été dissoute dans 40 ml d'un mélange d'acétone et d'une solution aqueuse de NaOH (0,5 M) : 1/1. Cette solution est mise sous agitation tout en la refroidissant dans un bain de glace. Ensuite, du chlorure de méthacryloyle (20 mmol) a été ajouté goutte à goutte en 10 min, puis le bain de glace a été retiré et la réaction a été agitée à température ambiante pendant 2 h. Ensuite, l'acétone a été éliminée à l'évaporateur rotatif et le pH a été ajusté à 2 par addition de HCl (6 M). Le solide précipite et a été isolé par filtration sous vide sur un entonnoir Büchner et lavé avec 100 ml de HCl dilué (0,01 M). Ensuite, le solide blanc a été séché sous vide. Rendement = 95%.

### Monomère sulfamethazine : SMZ

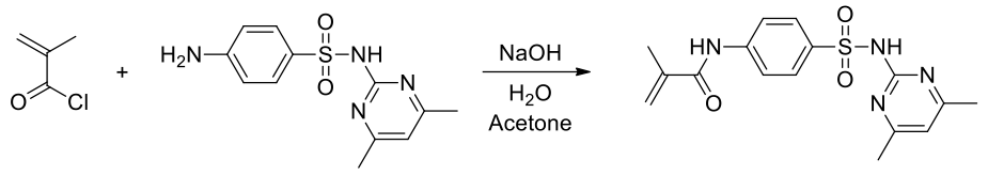



FIGURE VII.7 – Synthèse du monomère SMZ.

Le sulfaméthazine (SZ) commercial (10 mmol) a été dissoute dans 40 ml d'un mélange d'acétone et d'une solution aqueuse de NaOH (0,5 M) : 1/1. Cette solution est mise sous agitation tout en la refroidissant dans un bain de glace. Ensuite, du chlorure de méthacryloyle (20 mmol) a été ajouté goutte à goutte en 10 min, puis le bain de glace a été retiré et la réaction a été agitée à température ambiante pendant 2 h. Ensuite, l'acétone a été éliminée à l'évaporateur rotatif et le pH a été ajusté à 2 par addition de HCl (6 M). Le solide précipite et a été isolé par filtration sous vide sur un entonnoir Büchner et lavé avec 100 ml de HCl dilué (0,01 M). Ensuite, le solide blanc a été séché sous vide. Rendement = 90–95%. RMN 1H (400 MHz, DMSO-d6, $\delta$) : 10,05 (s, 1H), 7,88 (dd, J = 37,1, 8,6 Hz, 4H), 6,76 (s, 1H), 5,83 (s, 1H), 5,56 (s, 1H), 2,25 (s, 6H), 1,94 (s, 3H).

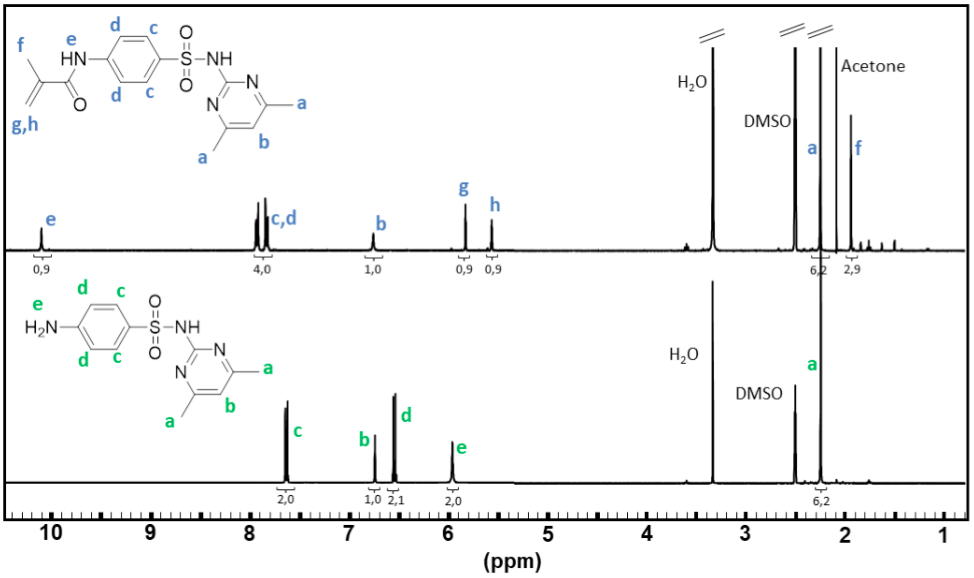



FIGURE VII.8 – Spectres RMN $^1$H (DMSO-d6, 400 MHz) du monomère SMZ (en haut) et du SZ commercial (en bas).

## VII.4 SYNTHÈSE DES POLYMÈRES

### ○ Synthèse des copolymères blocs zwitterioniques : 1er bloc

Les polymères ont été synthétisés selon les protocoles publiés détaillés dans Tasso *et al.* [199]. Ces polymères ont été préparés par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT). Dans la première étape, un poly(zwitterion)-macro-CTA a été synthétisé comme décrit ci-dessous.

#### Synthèse du premier bloc SB : sulfobétaïne méthacrylamide

L'agent de transfert de chaine : le dithiobenzoate d'acide 4-cyanopentanoïque (CADB) (150 mg, 0,54 mmol) a été placé dans un ballon de 250 mL et dissous dans 2,7 mL d'une solution de NaOH 0,2 M. Immédiatement après, 147 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium (120 mM, pH = 5,2) est ajouté suivi du 3-[3-méthacrylamidopropyl-(diméthyl)ammonano]propane-1-sulfonate (monomère SB, 16,1 mM), puis le 2,20-azobis(2-amidinopropane) dihy-drochloride (initiateur V50, 0,11 mmol, rapport molaire [CADB]/[V50] = 5/1) a été ajouté. Le mélange a été mis à buller sous argon pendant 1 h puis chauffé dans un bain d'huile à 70°C. Au bout de 80 minutes, la polymérisation a été arrêtée en refroidissant le ballon dans de l'azote liquide. Le polymère a été précipité dans de l'acétone, puis purifié par trois cycles de dissolution dans de l'eau et de précipitation dans de l'éthanol et enfin séché sous vide. (Mn = 6900 g/mol, DPn = 23, Mw/Mn = 1,07). Un polymère SB plus court a été synthétisé en réduisant le rapport de départ monomère SB/CADB de 60 à 30. (Mn = 3400 g/mol, DPn = 11, Mw/Mn = 1,12).

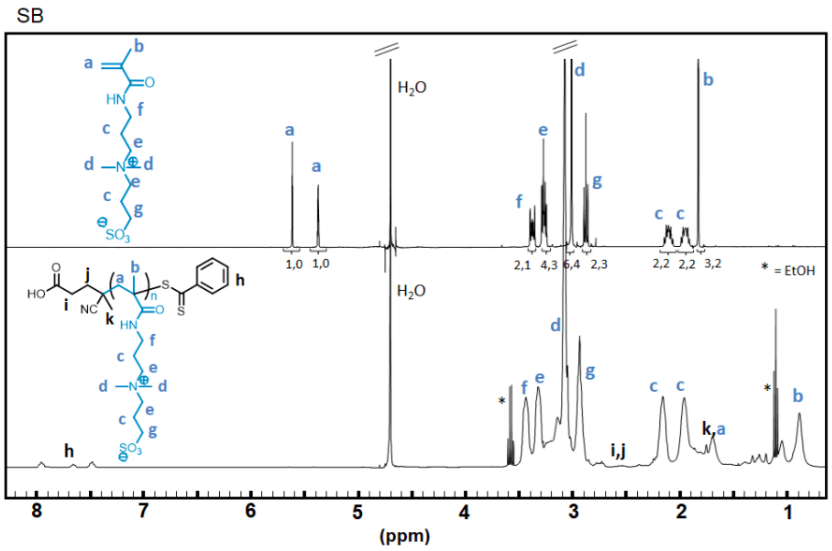



FIGURE VII.9 – Spectres RMN $^1$H ($D_2O$, 400 MHz) du monomère SB (en haut) et du pSB (en bas).

### Synthèse du premier bloc SBMA : sulfobétaïne méthacrylate

Ce polymère a été synthétisé de la même manière en remplaçant le monomère SB par du 3-((2-(méthacryloyloxy)éthyle)diméthylammonio)propane-1-sulfonate (monomère SBMA). (Solution de NaOH = 1,8 ml, solution d'acétate = 98 ml, CADB = 0,36 mmol, monomère SBMA = 10,8 mmol, V50 = 0,07 mmol). La polymérisation a été conduite à 70°C pendant 2 h (Mn = 7 000 g/mol, DPn = 24, Mw/Mn = 1,04).

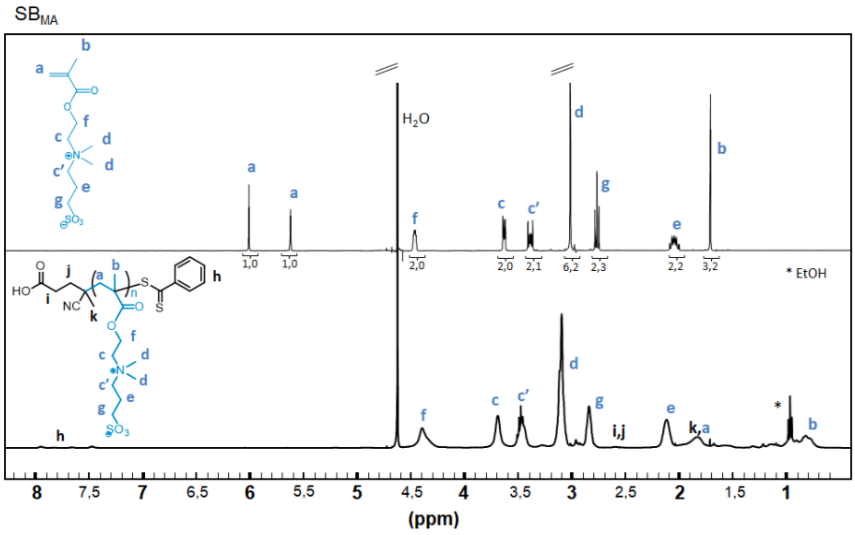



FIGURE VII.10 – Spectres RMN $^1$H ($D_2O$, 400 MHz) du monomère SBMA (en haut) et du pSBMA (en bas).

### Synthèse du premier bloc SB-$NH_3^+$ : sulfobétaïne + amine primaire

Nous avons utilisé un mélange de deux monomères : le monomère méthacrylamide SB et le chlorhydrate de N-(3-aminopropyl)méthacrylamide (APMA) avec un rapport molaire égal à 7/1. (Solution de NaOH = 1,8 ml, solution d'acétate = 98 ml, CADB = 0,36 mmol, monomère SBMAM = 25,1 mmol, APMA = 3,58 mmol, V50 = 0,07 mmol, 70°C à 80 min, Mn = 9400 g/mol, Mw/Mn = 1,1).

### Synthèse du premier bloc PC : phosphorylcholine

Le 2-méthacryloyloxyéthyle phosphorylcholine (monomère PC) a ici été utilisée comme monomère de départ. (Solution de NaOH = 1,3 ml, solution d'acétate = 69 ml, CADB = 0,25 mmol, monomère de PC = 5,1 mmol, V50 = 0,05 mmol, 70°C à 120 min, Mn = 8200 g/mol, DPn = 27, Mw/Mn = 1,07). Ce polymère a été purifié par trois cycles de dissolution dans l'eau et de re-précipitation dans l'acétone au lieu de l'éthanol. Un polymère PC plus long a été synthétisé en modifiant le rapport monomère PC/CADB. (Mn = 18600 g/mol, DPn = 62, Mw/Mn = 1,07.

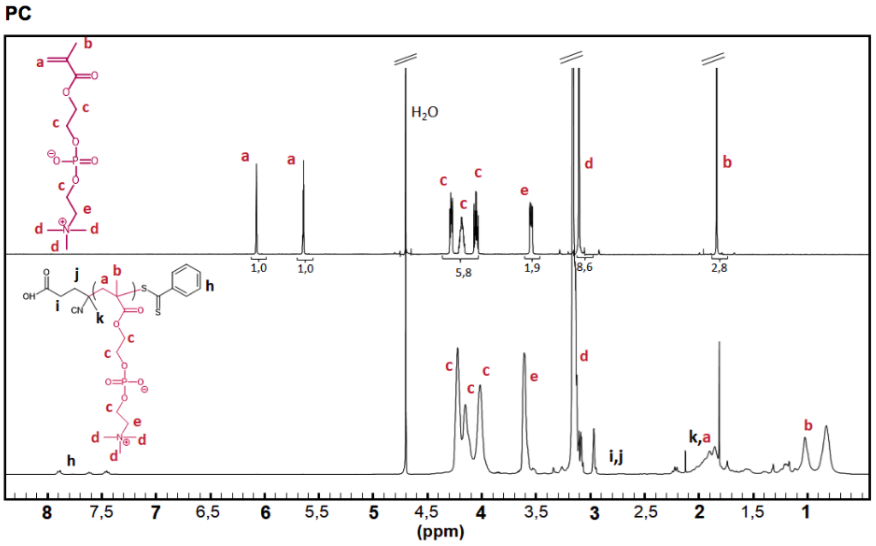



FIGURE VII.11 – Spectres RMN $^{1}$H ($D_2O$, 400 MHz) du monomère PC (en haut) et du pPC (en bas).

### Synthèse du premier bloc CB : carboxybétaïne

Le 4-(((3-méthacrylamidopropyl)diméthylammonio)butanate (monomère CB) a été utilisé comme monomère de départ. (Solution de NaOH = 1,6 ml, solution d'acétate = 90 ml, CADB = 0,32 mmol, monomère CB = 19,4 mmol, V50 = 0,06 mmol, 70°C - 80 min, Mn = 4 500 g/mol, DPn = 16, Mw/Mn = 1,09). Ce polymère a été purifié par trois cycles de dissolution dans l'eau et de reprécipitation dans l'acétone.

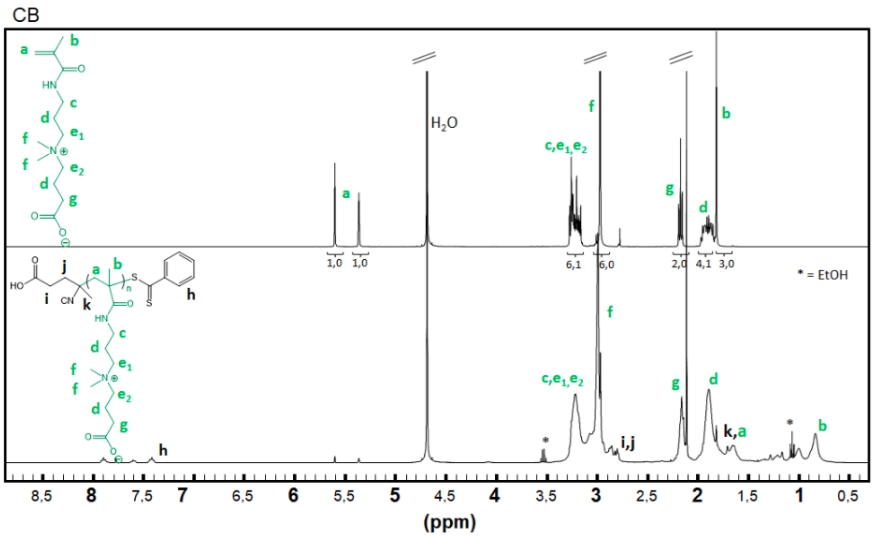



FIGURE VII.12 – Spectres RMN $^{1}$H ($D_2O$, 400 MHz) du monomère CB (en haut) et du pCB (en bas).

### ○ Synthèse des copolymères blocs zwitterioniques : poly(zwitterion-b-VIM)

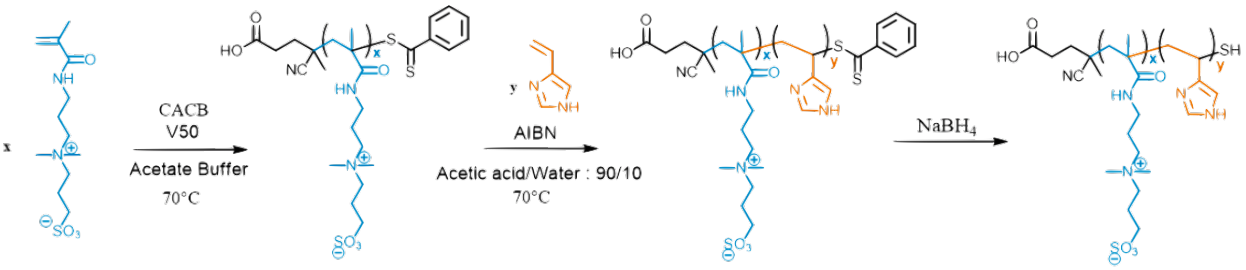



FIGURE VII.13 – Synthèse du poly(SB-b-VIM).

Tous les polymères zwitterioniques ont été utilisés en tant que macro agent RAFT pour ajouter un bloc terminal de poly(vinylimidazole) (degré de polymérisation d'environ 10). Typiquement, le bloc SB (Mn = 6900 g/mol, DPn = 23, 0,39 mmol), 4VIM (0,39 mmol) et le 2,2'-Azobis (2-méthylpropionitrile) (AIBN, 0,39 mmol) ont été dissous dans 37 ml de solution d'acide acétique contenant 10% en volume d'une solution aqueuse de NaCl à 100 mM. Après dégazage à l'argon, le milieu réactionnel a été chauffé à 70°C pendant 6 heures. Le copolymère brut a été purifié par trois cycles de précipitation dans de l'éthanol et par redispersion dans de l'eau et enfin par séchage sous vide. Pour éliminer les groupes terminaux phényle (provenant de l'agent RAFT), le copolymère bloc de couleur rose obtenu (500 mg) a été dissous dans de l'eau (5 ml) et mis à réagir avec du NaBH4 (environ 50 mg). Au bout de 6 h (lorsque la solution est devenue incolore), le polymère a été purifié par deux cycles de précipitation dans de l'acétone et une redispersion dans de l'eau, puis précipité dans du méthanol. Le polymère blanc obtenu avec un groupe terminal thiol a finalement été séché avant utilisation. Les spectres RMN $^1$H

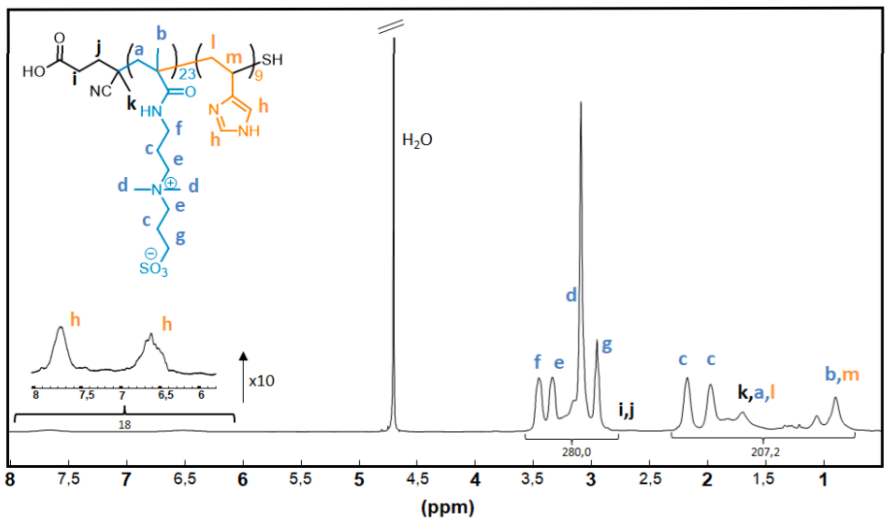



FIGURE VII.14 – Spectres RMN $^1$H ($D_2O$, 400 MHz) du poly(SB-b-VIM).

des échantillons bruts avant et après la polymérisation indiquait qu'environ 90% en moles des monomères de vinylimidazole étaient incorporés dans le produit final. Les mêmes protocoles ont été utilisés avec tous les polymères zwitterioniques.

### ∘ Synthèse des polymères statistiques : pSMZ/LA

Les polymères pSMZ/LA ont été synthétisés par copolymérisation RAFT en utilisant l'acide 4-cyano-4[(dodécylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoïque (CDP) comme agent de transfert de chaîneet le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (V65) comme initiateur. Les polymérisations ont été effectuées à 70°C dans le DMF avec un rapport initial CTA/initiateur de 2/1. Les copolymères sont composés de deux monomères de méthacrylamide contenant des fonctions sulfaméthazine (SMZ) et lipoamide (LA). L'analyse par RMN $^{1}$H de la solution de polymérisation brute et du polymère purifié a été utilisée pour évaluer l'efficacité de la polymérisation (typiquement environ 30%) et le rapport SMZ/LA dans le polymère purifié. Comme exemple typique, nous avons utilisé un rapport SMZ/LA de 5/1 et un rapport CTA/monomère total de 1/180. Pour ce polymère, nous estimons un degré de polymérisation DPn = 80 (masse molaire Mn = 29000 g/mol) et un rapport final SMZ/LA de 5/1.

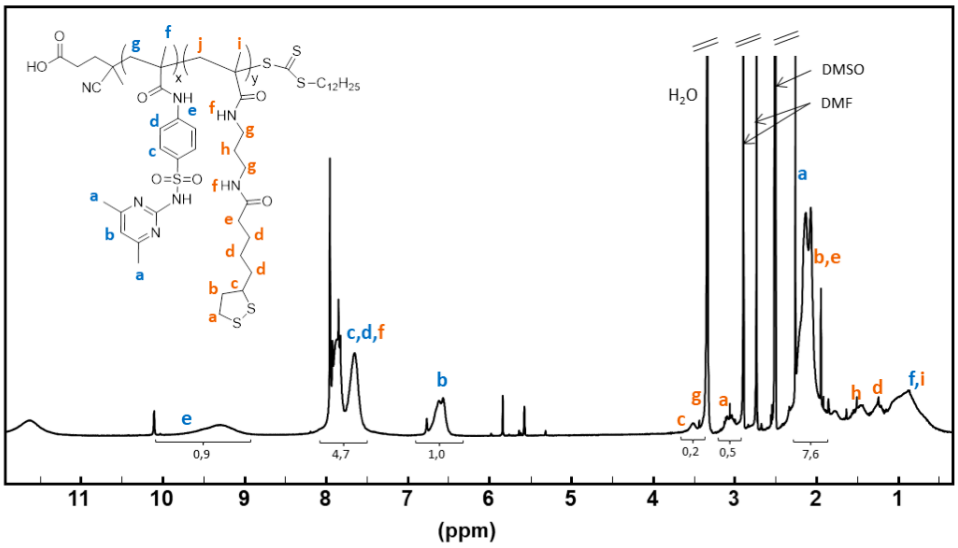



FIGURE VII.15 – Spectres RMN $^{1}$H (DMSO-d6, 400 MHz) de pSMZ$_{65}$/LA$_{15}$.

### ∘ Synthèse des polymères statistiques : pDPA/LA

Les polymères pDPA/LA ont été obtenus par polymérisation RAFT en utilisant de l'acide 4-cyano-4-(phenylcarbonathiocylthio)pentanoïque (CADB) comme agent de transfert de chaine (CTA), et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) comme initiateur. Le rapport initial CTA/initiateur est de 5/1. Le solvant est un mélange de 1,4-dioxane et de DMF (typiquement 2/5) pour aider l'acide lipoïque a se dissoudre. Par ailleurs, comme il s'agit de polymères statistiques,

il est nécessaire de prendre en compte la différence de réactivité des deux monomères car les fonctions méthacrylamides sont plus réactives que les méthacrylates (facteur 1,8).
Typiquement, 2,5 mmol monomère DPA, 0,08 mmol de CADB et $1{,}6.10^{-3}$ mmol de AIBN sont dissous dans 10 mL de 1,4-dioxane. En parallèle, 0,9 mmol de monomère LA sont dissous dans 4 mL de DMF. Le mélange des deux solution est ensuite mis à buller sous argon pendant 60 min puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 10 h. Le polymère est ensuite précipité goutte à goutte dans du méthanol (si le polymère est long (DPN>100)) ou dans MeOH/NaOH(1M) à 90/10 (si le polymère est petit) car les monomères sont solubles dans le méthanol. Le polymère est ensuite lavée par trois cycles de dissolution / précipitation dans un minimum d'eau acide et précipitation dans le MeOH (ou MeOH/NaOH(1M) à 90/10). Le polymère est ensuite séché sous cloche à vide pendant une nuit. Le taux de conversion de chaque monomère peut être estimé par RMN $^1$H et typiquement dans ces conditions le DPA réagit à 80-90% et le LA à 40-60%.

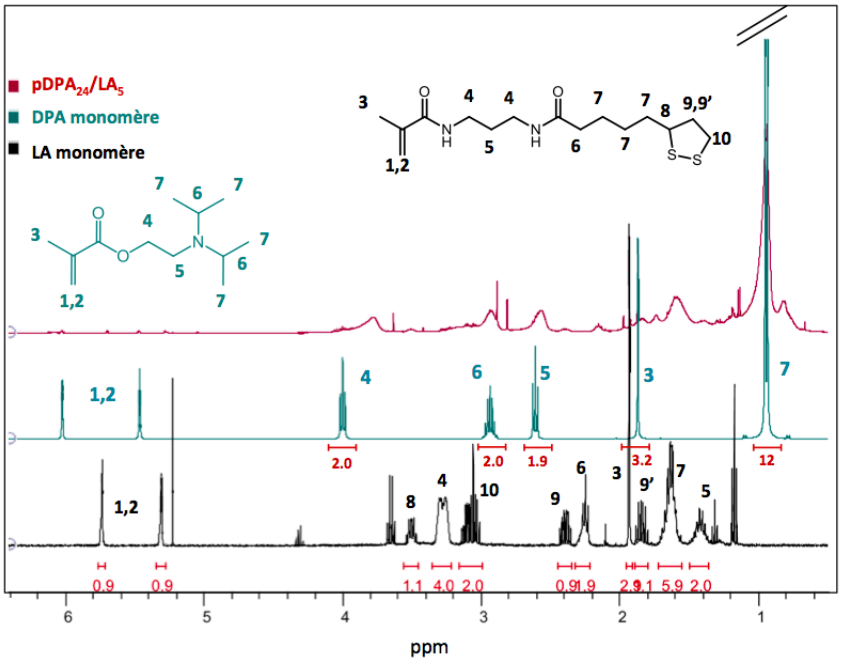



FIGURE VII.16 – Spectre RMN $^1$H ($CDCl_3$, 400MHz) des monomères SB et DPA ainsi que du polymère $pDPA_{24}/LA_5$. L'intégration des différents pics permet de connaître le ratio de DPA/LA dans le polymère.

### ○ Synthèse des copolymères blocs : pDPA-b-SB

Comme exemple, le protocole du premier bloc de pDPA estimé avec un DPn = 120 est celui décrit ci-dessous. 10 mmol de monomère DPA, ainsi que 0,068 mmol de CADB et $13{,}6.10^{-3}$ mmol dAIBN ont été dissous dans 10 mL de 1,4-dioxane. Le mélange est ensuite mis à buller sous argon pendant 60 min puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 10 h. Le polymère est ensuite précipité goutte à goutte dans du méthanol ou dans MeOH/NaOH(1M) à 90/10 car les monomères. Le polymère est ensuite lavée par trois cycles

de dissolution/précipitation dans un minimum d'eau acide et précipitation dans le MeOH (ou MeOH/NaOH(1M) à 90/10). Le polymère est ensuite séché sous cloche à vide pendant une nuit. Le taux de conversion peut être estimé par RMN $^1$H.

Pour la synthèse du second bloc, le polymère pDPA (4,66 µmol) est dissous dans l'acide acétique (5 mL) qui permet aussi de solubiliser le monomère SB méthacrylamide (4,66 mmol) et l'amorceur AIBN (4,66 mmol) ce qui va permettre de former de nouveaux radicaux libres afin d'entrainer, à nouveau, l'étape d'initiation de la polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon pendant 1 h puis placé sous agitation dans un bain d'huile à 70°C pendant 6 h. Le polymère est ensuite lavé avec 3 cycles de précipitation dans un mélange MeOH/NaOH ou bien du diéthyléther (en fonction du ratio DPA/SB, les polymères ne précipitent pas tous dans le MeOH/NaOH) et de re-solubilisation dans de l'eau acide. Le polymère obtenu est de couleur rose (provenant du groupement dithiobenzénique de l'agent RAFT). Le rendement de polymérisation de la synthèse du premier bloc est $>$ 90% et celui du second bloc vaut $\approx$ 70%.

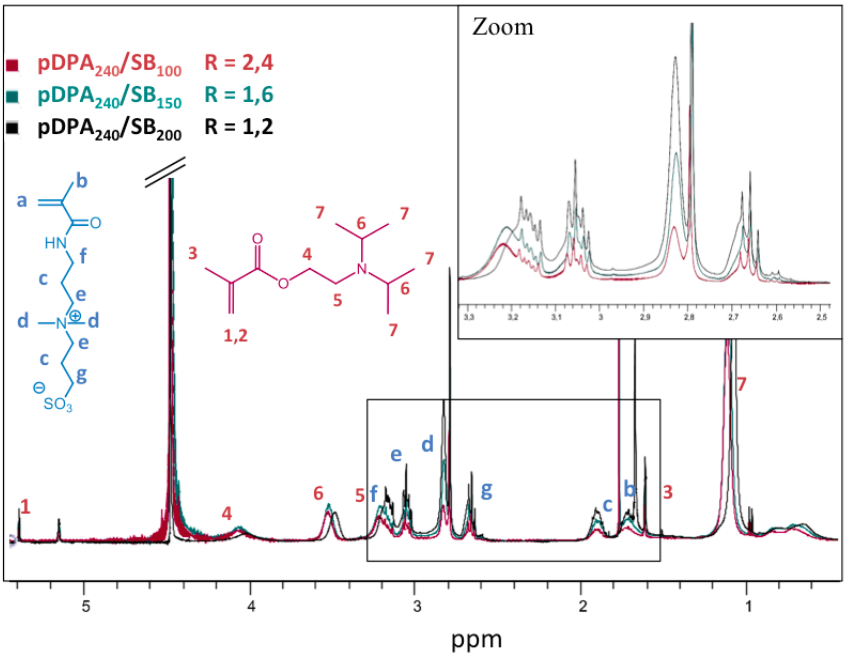



FIGURE VII.17 – Spectres RMN $^1$H ($D_2O$, 400MHz) des polymères $pDPA_{240}$-b-$SB_x$ avec des ratios différents. Ces spectres sont normés par rapport aux signaux du DPA.

## VII.5 ÉCHANGE CLASSIQUE DE LIGANDS

**Passage classique des QD dans l'eau**

Les QD sont transférés en solution aqueuse après (i) une substitution des ligands d'oléate organique initiaux par l'acide 3-mercaptopropionique (MPA), puis (ii) un second échange ultérieur des ligands MPA par des polymères hydrophiles. Typiquement, 4 nmol QDs dans de l'hexane sont précipités par addition d'éthanol puis sont centrifugés. Les QD sont remis en suspension dans 400 µL de MPA pur et laissés pendant une nuit à 60°C. Les QD recouverts de MPA sont ensuite précipités dans du chloroforme. Ensuite, 1 mL de diméthylformamide et environ 50 mg de tert-butoxyde de potassium sont ajoutés. Les QD sont centrifugés et le précipité obtenu a été rincé à l'éthanol et centrifugé à nouveau. Les 4 nmol de nanoparticules recouvertes de MPA sont ensuite remises en suspension dans 400 µL de solution tampon de bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 9). En parallèle, 5 mg du polymère ligand sont dissous dans 200 µL de tampon bicarbonate de sodium. Ensuite, les solutions de ligands et de QD sont mélangées et laissées à réagir pendant une nuit à température ambiante. Ensuite, les nanoparticules échangées avec le polymère sont filtrées (membrane de Vivaspin à coupure de 100 kDa) et rincées avec une solution de NaCl 20 mM (4 fois) pour éliminer le copolymère en excès et le MPA. Les nanoparticules résultantes sont purifiées par taille via une ultracentrifugation (268 000 g, 25 min) dans un gradient de saccharose de 10 à 40% en poids dans du NaCl 20 mM. Les nanoparticules après l'ultracentrifugation forment une bande au centre du tube et peuvent être extraites (BioComp Instruments, Inc., Fredericton, NB, Canada). Le saccharose en excès a été éliminé par une série de filtration sur une membrane Vivaspin de 100 kDa. Les nanoparticules purifiées ont finalement été remises en suspension dans 1 ml de tampon HEPES/Na 100 mM, NaCl 40 mM, pH 7,5 et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

**Passage des QD dans l'eau par échange biphasique**

Pour synthétiser les QD-TASB il est possible de faire un échange biphasique dans l'eau et le chloroforme. Le protocole est le suivant.
0,4 nmol de QD sont précipités dans 2 mL d'éthanol puis centrifugés. Le culot de QD est repris dans 3 mL de chloroforme. En même temps, 100 mg de TASB sont dissous dans 3 mL d'eau et environ 20 mg de $NaBH_4$ sont ajoutés. Attendre environ 30 min puis mélanger les deux solutions sous vive agitation pendant 30 min. Placer ensuite le mélange 6 h à 60°C. Lors de l'échange, les QD passent de la aqueuse organique à la phase aqueuse. Les QD sont ensuite lavés sur gradient de saccharose comme expliqué précédemment.

## VII.6 SYNTHESE DES QD-SB-$COO^-$

Après échange de ligands avec le polymère SB-$NH_3^+$ à la surface des QD visibles, il a été possible de remplacer toutes les liaisons pendantes $RNH_3^+$ par $RCOO^-$ par une réaction de

couplage peptidique entre les QD-SB-$NH_3^+$ et l'ester bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide) (BS3) suivi d'une hydrolyse des esters restants en fonctions carboxylates.

Typiquement, 1 nmol de QDs recouverts de polymères SB-$NH_3^+$ ont été mélangés avec 100 nmol de BS3 dans 200 µL de tampon borate (pH = 8,5) et mis à réagir pendant une nuit. La BS3 n'ayant pas réagi a été éliminée par une série d'ultrafiltrations à travers une membrane Vivaspin de 100 kDa.

## VII.7 SYNTHESE DES QD-SB-BIOTINE

La biotine a pu être greffée à la surface de QD-SB$NH_3^+$ en mélangeant un ester sulfo-NHS-biotine (200 nmol) avec les QD (1 nmol) dans 200 µL d'un tampon borate (pH = 8,5). La solution a été laissée pendant une nuit et 100 nmol de BS3 ont été ajoutés pour remplacer les potentielles amines terminales résiduelles par des carboxylates. Les QD ont été purifiés par ultrafiltration.

## VII.8 INCORPORATION DES QD DANS DES ÉRYTHROCYTES

Des érythrocytes ont été prélevés sur des volontaires sains et un anticoagulant : $Na_2$(EDTA) est ajouté à 2 mg/mL. Les erythrocytes sont centrifugés dans 1 mL de tampon salin (HBS : HEPES 10 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4). Ils sont ensuite centrifugés (600 g, 5 min, 3 fois). Un culot de 20 µL contenant des érythrocytes a été mélangé à 60 µL de QD-SMZ/Au et de QD-SB (concentration typique 80 µM) dans du tampon hypotonique d'HEPES (HEPES/Na 2,2 mM, NaCl 33 mM, pH 7,5) pendant 20 minutes. 1 mL d'HBS à 100% a ensuite été ajouté et les érythrocytes ont été purifiés par trois tours de centrifugation (14 000 g, 5 min). En parallèle, une solution à 2 mg/mL d'amphotéricine B5 a été préparée et 2 µL ont été ajoutés aux érythrocytes marqués. Les érythrocytes sont alors chargés avec les deux populations de QD et sont perméables aux protons.

## VII.9 RÉACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE

### Couplage entre la DyeIR-NHS et le peptide (via son amine primaire)

La masse molaire du peptide est ≈ 2359 g/mol et celle de la DyeIR-NHS vaut 1243 g/mol. Le peptide est préparé à 0,1 M dans du DMSO anhydre. La DyeIR est préparée à 0,2 M dans du DMSO anhydre.
Le couplage se produit en mélangeant 10 µL de peptide à 0,1 M avec 20 µL de DyeIR à 0,2 M et 0,27 µL de triéthylamine. Cette réaction dure 1 jour et s'effectue à l'abri de la lumière.

### Couplage entre le Cy5,5-NHS (ou 7,5) et le peptide (via son amine primaire)

Le protocole est exactement le même que précédemment en changeant les Dye.
La masse molaire de la Cy5,5 est 758 g/mol et celle de la Cy7,5 est 833,7 g/mol.

### Couplage entre l'acide lipoïque et le peptide (via son amine primaire)

Tous les composés sont préalablement préparés dans du DMSO anhydre. Mélanger ensemble 1 µmol de peptide, 1,5 µmol d'acide lipoïque, 3 µmol d'EDC,HCl, 6 µmol de NHS et 3 µmol de $NEt_3$. Le volume total final est de 67 µL. Ce mélange est laissé sous agitation pendant 1 jour à l'abri de la lumière.
Un dosage des amines libres restant a été effectué afin de connaitre le rendement du couplage. Une dosage fluorimétrique a été réalisée avec la fluorescamine. Le taux de couplage est de ≈ 60%.

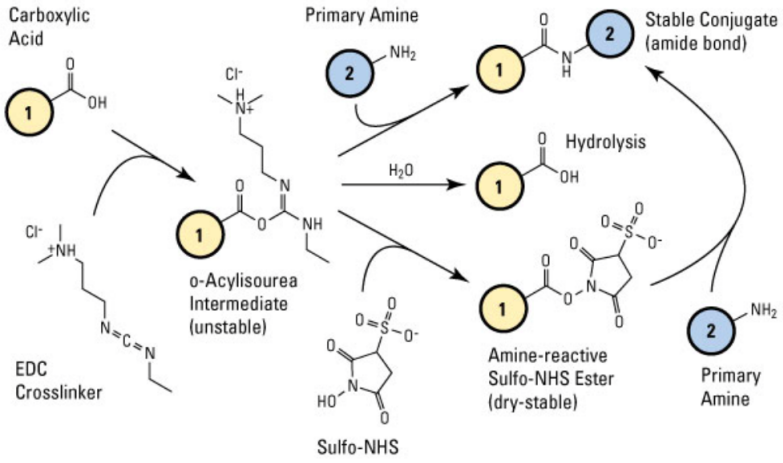



FIGURE VII.18 – Schéma du couplage peptidique dans l'eau. L'EDC (1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) est l'agent de couplage. Le sulfo-NHS ou juste le NHS (N-hydrosuccinimide) augmente l'efficacité du couplage.

## VII.10 ANALYSES DE LA COURONNE DURE DE PROTÉINES

### Protocole du dosage à la fluorescamine

1 nmol de QD recouverts de polymères zwitterioniques dans quelques microlitres ont été mélangés, avec soit une suspension d'albumine de sérum bovin (BSA) (1 mL) à 1 mM dans un tempon HEPES/Na 100 mM, NaCl 40 mM (pH = 7,5) ou avec du sérum humain pur (HS, 1 mL) pendant 1 heure à 20°C. Les nanoparticules ont été lavées par 7 cycles d'ultracentrifugation à 268 000 g pendant 25 min. Après chaque cycle, les surnageants contenant les protéines non adsorbées ont été éliminées et les QD ont été redispersés dans une solution de tampon HEPES/Na. Le dernier surnageant s'est avéré exempt de protéines (équivalent au niveau de fluorescence de la fluorescamine d'une solution sans protéines). Après le dernier cycle de centrifugation, les QD ont été redispersés dans 200 µL de HCl 1M et conservés à 60°C pendant une nuit afin de dissoudre les nanoparticules inorganiques. Ensuite, le pH a été augmenté par addition de 200 µL de NaOH 0,1 M et finalement la solution a été tamponnée à pH = 8,5 avec un tampon borate. La quantité de protéine dans la solution finale a été déterminée par mesure de photoluminescence en utilisant un dosage à la fluorescamine. La concentration en protéines a été estimée à partir d'une droite d'étalonnage utilisant des suspensions de BSA ou de HS ayant une valeur de concentration connue et soumises aux mêmes additions acide-base que les nanoparticules analysées. Le signal de fluorescence des QD recouverts de polymère SB-$NH_3^+$ incubés avec des protéines a été corrigé à partir du signal de fluorescence des QD-SB-$NH_3^+$ seuls en raison de la présence d'amines primaires dans le polymère.

## VII.11 POLYMÉRISATION RAFT

La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (en anglais Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) est une technique de polymérisation radicalaire contrôlée découverte en 1998. La RAFT repose sur un mécanisme de transfert de chaîne réversible qui se compose de 2 équilibres d'addition-fragmentation mettant en jeu un agent de transfert de type thiocarbonylthio (agents de transfert les plus utilisés). L'initiation ainsi que la terminaison entre radicaux sont les mêmes qu'en polymérisation radicalaire classique. Le mécanisme est détaillé en **figure VII.19**. La première étape, étape d'initiation, est réalisée grâce à un initiateur de radicaux. L'un des plus utilisés est la décomposition thermique (ici l'AIBN a été utilisé). Lors de la deuxième étape, le radical qui vient d'être produit réagit avec l'agent RAFT, normalement tout l'agent RAFT est alors consommé. Le troisième étape est une étape de propagation grâce à $R^{\cdot}$. $R^{\cdot}$ doit être plus réactif que $P^{\cdot}$. Lors de la quatrième étape, se produit un échange entre le radical $Pn^{\cdot}$ et le thiocarbonylthio ayant réagi lors de l'étape 2. La dernière étape est l'étape de terminaison.

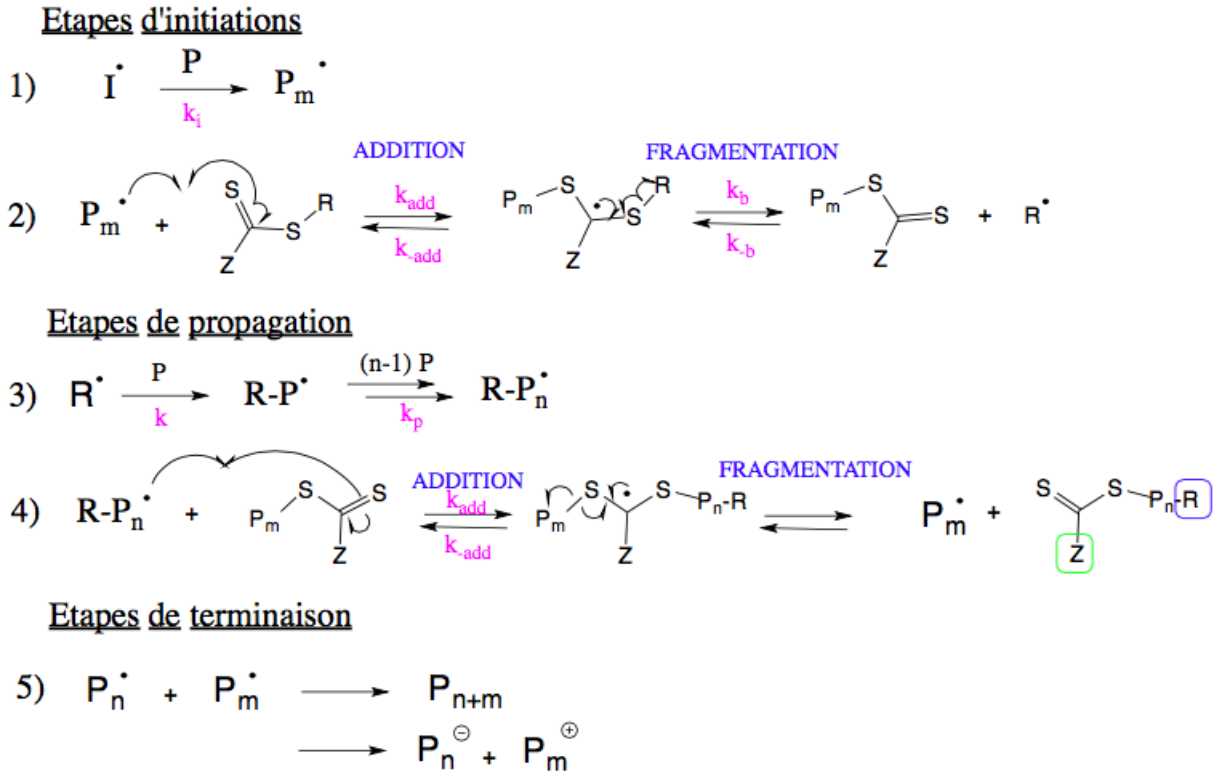



FIGURE VII.19 – Mécanisme général de la polymérisation de type RAFT.

## VII.12 PRINCIPE DE LA RMN DOSY

La possibilité d'utiliser la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour mesurer la diffusion des molécules en solution a d'abord été décrite en 1965 par Stejskal et Tanner [313] sous la forme d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE , Pulse Field Gradient Spin Echo). Cette séquence est illustrée en VII.20.

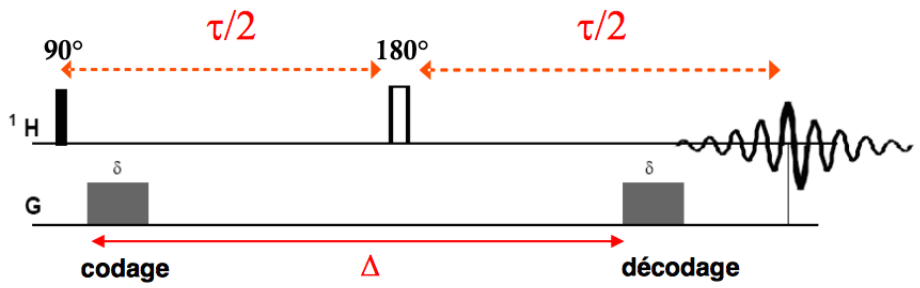



FIGURE VII.20 – Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin à gradient de champ pulsés (PFG-SE).

Dans cette séquence, après avoir basculé l'aimantation dans le plan transversal à l'aide d'une excitation de 90°, un gradient de champ magnétique pulsé (PFG) de durée $\delta$ est appliqué. En procédant ainsi, il y a alors une dépendance spatiale du degré de déphasage. Il y a ensuite un délai de $\tau/2$. Une impulsion radiofréquence à 180° est ensuite appliquée afin de changer le signe du déphasage. Puis, un second délai de $\tau/2$ précède une seconde impulsion de gradient (PFG) possédant les même caractéristiques que la première. Après cela il y a l'acquisition du signal.

Si les spins sont stationnaires durant le délai de diffusion qui sépare les deux PFG, alors le codage et le décodage spatial des phases se compensent comme présenté dans la figure VII.21. L'intensité du signal résultant est alors maximale avec une amplitude seulement gouvernée par la relaxation T2.
Toutefois, les molécules en solution subissent des mouvements Browniens et la position des spins le long de l'axe de gradient changent au cours de l'intervalle $\Delta$, entraînant un décalage des phases codées et décodées par les deux PFG comme le montre la figure VII.22. Ce décalage de phase est détecté et mesuré par l'atténuation de l'intensité de l'écho de spin résultant.

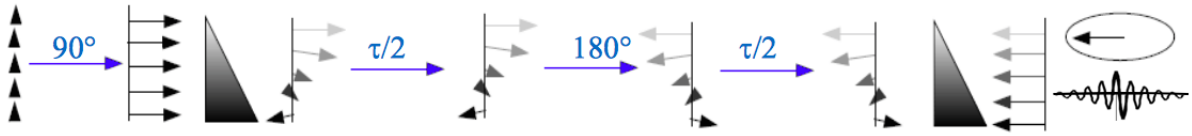



FIGURE VII.21 – Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion nulle. Cette illustration provient de [314].

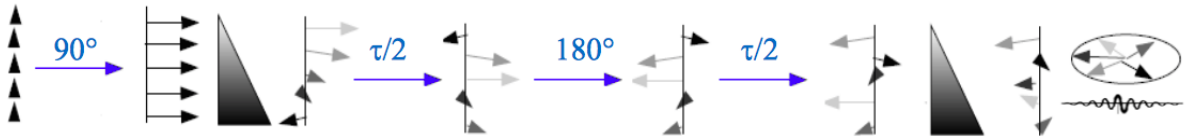



FIGURE VII.22 – Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion. Cette illustration provient de [314].

Dans le cas d'une diffusion isotrope dans des liquides, l'atténuation de l'intensité du signal est une fonction exponentielle du coefficient de diffusion.

La RMN DOSY permet donc de séparer plusieurs composants d'une même solution en fonction de leur coefficient de diffusion. Par exemple, une solution contenant un mélange équimolaire d'adénosine triphosphate (ATP), de sodium dodecyl sulfate (SDS) et de glucose dans de l'eau deutériée ($D_2O$), dans un tube 5 mm standard permet d'obtenir le spectre de la figure VII.23. On peut voir que tous les composés ont bien été séparés en fonction de leur coefficient de diffusion qui est directement lié à leur taille avec la relation de Stokes Einstein.

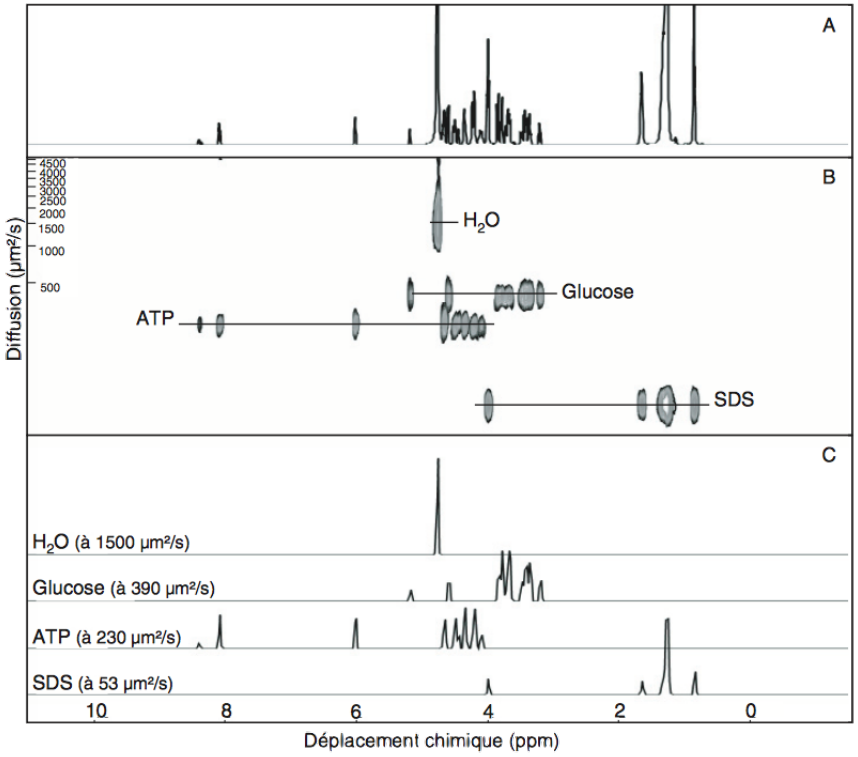



FIGURE VII.23 – (A) Spectre RMN 1D 1H du mélange. (B) Spectre DOSY 1H du mélange présente l'ensemble des fréquences de résonances de chacun des composants du mélange le long de l'axe des fréquences RMN (horizontal) et y associe le coefficient de diffusion de chaque espèce le long de l'axe de diffusion (vertical) noté ici en $\mu m^2$/sec. (C) Spectres RMN 1D $^1H$ de chaque composant du mélange extraits du spectre DOSY (B). [315]

## VII.13 ANALYSE DE LA COURONNE DURE PAR FCS ET CALIBRATIONS

La couronne dynamique de protéines adsorbées sur les QD-Zwitterion a été évaluée par spectroscopie de corrélation par fluorescence (FCS). Les mesures de FCS ont été effectuées en utilisant un MicroTime 200 (PicoQuant). En résumé, un laser à 488 nm (Sapphire 488-50, Coherent) est réfléchi par un miroir dichroïque (laser à 488 nm, BrightLine, Semrock) et focalisé par un objectif à immersion dans l'huile (100x, 1,4 NA, Olympus) dans une gouttelette de solution de QD-Zwitterion, 50 µm au dessus de la surface de la lamelle. L'émission de fluorescence est ensuite collectée à travers l'objectif, transmise par le miroir dichroïque et un filtre passe-bande (496LP, Semrock), focalisée à travers un diaphragme et couplée à deux photodiodes à avalanche (PDM Series, MPD). Le signal de la photodiode a été traité par un système HydraHarp (PicoQuant) et la fonction de corrélation croisée des deux signaux de photodiode a été calculée par le logiciel MicroTime. La manipulation et l'adaptation des données ont été effectuées avec le logiciel ORIGIN (Microcal, Northampton, MA). La puissance du laser a été réglée à 0,7 µW pour toutes les mesures FCS. Une analyse de l'intensité de fluorescence des QD, de leur nombre et de leur temps de présence dans le volume confocal en fonction de la puissance du laser est illustrée sur la figure VII.24. La photoluminescence des QD reste linéaire avec l'augmentation de la puissance laser, figure VII.24(a). Le nombre moyen de QD détectés dans le volume confocal semble rester constant (à 10% près) jusqu'à 0,8 µW, figure VII.24(b). De plus, le temps de résidence moyen des QD dans le volume confocal ($\tau_D$) ne varie pas de manière significative avec la puissance du laser. Finalement, ces données démontrent que l'excitation des QD reste dans un régime linéaire à 0,7 µW utilisé pour les mesures de FCS.

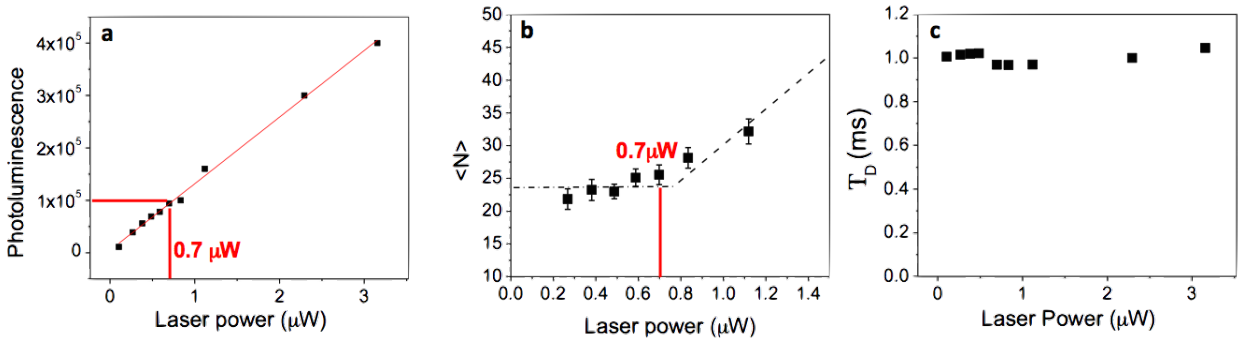



FIGURE VII.24 – (a) PL des QD, (b) nombre moyen de QD dans le volume confocal et (c) temps moyen de présence des QD dans le volume confocal, en fonction de la puissance du laser.

10 minutes avant d'effectuer la mesure de FCS, les QD et la BSA ont été mélangés ensemble dans une solution HEPES/Na 100 mM, et NaCl à 40 mM. La concentration en QD était fixée à 50 nM et la concentration en BSA variait de 0 à 1100 µM. Les QD ont également été incubés dans du HS non dilué à 50 nM pendant 1 heure avant la mesure. La température d'incubation et de mesure a été fixée à 20°C. Pour effectuer la mesure de FCS, une gouttelette de la solution de

QD + protéines a été déposée sur une lamelle. L'intensité d'émission a été collectée pendant un éclairage continu pendant généralement 2 min. La fonction d'autocorrélation G($\tau$) a été calculée à partir de la trace de l'intensité d'émission en fonction du temps, selon l'équation VII.1.

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t+\tau)I(t)\rangle}{\langle I(t)\rangle} - 1 \tag{VII.1}$$

En supposant que le volume focalisé est une gaussienne 3D et en résolvant l'équation de la diffusion 3D, la fonction d'autocorrelation peut s'écrire suivant l'équation VII.2.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N\rangle}\left(1+\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}\left(1+\left(\frac{w_0}{z_0}\right)^2\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \tag{VII.2}$$

Dans cette équation $w_0$ et $z_0$ sont respectivement les dimensions radiale et axiale du volume confocal respectivement, qui ont été évaluées à partir d'un étalonnage expérimental.

$$\langle N\rangle = C_N \pi^{3/2} w_0^2 z_0 \tag{VII.3}$$

N est le nombre moyen de particules fluorescentes dans le volume focal et est défini en équation VII.3, où $C_N$ est la concentration en nombre de QD et $\pi^{3/2}w_0^2z_0$ correspond au volume confocal. Le volume confocal a été étalonné avec de la fluorescéine (D = 420 µm2.s-1). La taille estimée du volume confocal est $w_0$ = 0,35 ± 0,1 µm et $z_0$ = 2 ± 0,2 µm.

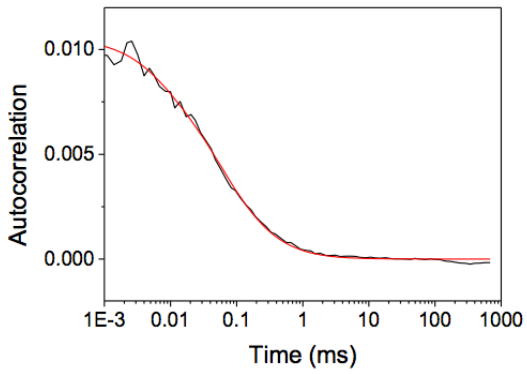



FIGURE VII.25 – Courbe d'autocorrélation expérimentale (en noire) obtenue par une mesure de FCS de la fluorescein. Un ajustement est tracé (en rouge) et il prend en compte l'ajout de croisements intersystèmes qui ne se produit que dans les molécules organiques.

Le temps de séjour moyen des particules dans le volume confocal ($\tau_D$) a été extrait de l'ajustement, et le coefficient de diffusion a été calculé à partir de la relation de l'équation VII.4.

$$D = \frac{w_0^2}{4\tau_D} \tag{VII.4}$$

Le rayon hydrodynamique est ensuite obtenu avec l'équation de Stokes-Einstein, équation VII.5, avec T la température et $\eta$ la viscosité. La viscosité des solutions de BSA ont été estimées par une relation linéaire $\eta = \eta_0(1+\alpha C)$, où $\eta_0$ est la viscosité de l'eau (1 cP), $C$ est la concentration

en masse de BSA. et $\alpha$ la viscosité intrinsèque de la BSA ($\alpha$ = 3,7 mL.g$^{-1}$). Cette relation a été confirmée en mesurant la viscosité d'une solution de BSA à 1 mM et à 0,5 mM avec une configuration d'écoulement de Couette (Low Shear 400 - Lamy Rheology). La viscosité du HS à 20°C a été mesurée expérimentalement : $\eta$ = 1,64 ± 0,16 cP.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \tag{VII.5}$$

Un exemple de courbe expérimentale d'autocorrélation ainsi que son ajustement linéaire est présenté en figure

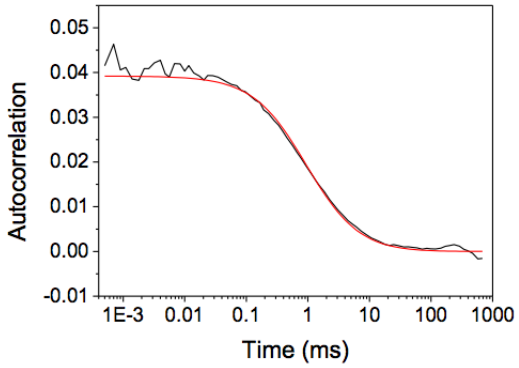



FIGURE VII.26 – Courbe d'autocorrélation expérimentale (en noire) obtenue par une mesure de FCS d'un échantillon de QD-SB. En rouge est superposée l'ajustement.

Les courbes d'autocorrelation en fonction de la concentration en BSA pour deux échantillons de QD différents sont présentées en figure VII.27 : les QD-SB et les QD-SB-$NH_3^+$.

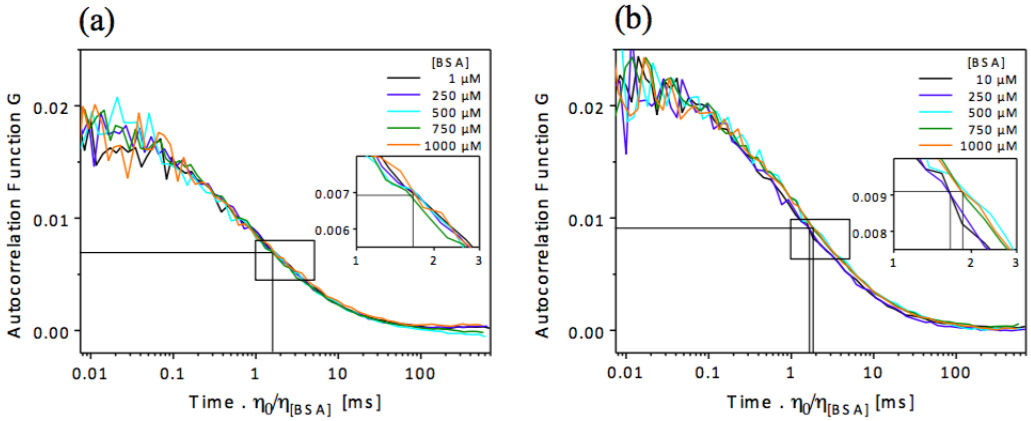



FIGURE VII.27 – Courbes d'autocorrélation de fluorescente G($\tau$) de QD recouverts de (a) SB et de (b) SB-$NH_3^+$ dans une solution de BSA à différentes concentrations. Le temps a été corrigé de la variation de viscosité due à la présence de BSA. Le temps de séjour moyen (ligne verticale) est indépendant de la concentration de BSA pour l'échantillon (a), ce qui correspond à une absence d'adsorption de BSA. Pour l'échantillon (b), nous montrons une augmentation du temps de résidence à une concentration de BSA supérieure à 250 µM, ce qui indique une augmentation de la taille hydrodynamique des QD due à l'adsorption de protéines.

## VII.14 SUIVI DE QD UNIQUE DANS DES CELLULES HELA

Pour les mesures de suivi de QD unique, des cellules $5.10^5$ Hela ont été mises en suspension dans 200 µL de milieu de culture (DMEM avec 10% de FBS) avec 3 à 10 nmol de QD. Les cellules ont été électroporées en utilisant un électroporateur Biorad Gene Pulser II avec les paramètres suivants ; capacité : 950 µF, tension 150 V. Le temps de décharge prévu est d'environ 15 ms. Les cellules ont été lavées au moins quatre fois en les remettant en suspension dans 5 mL de milieu et centrifugées à 150 g, avant d'être déposées sur des lamelles de verre recouvertes de collagène (10 µg/cm$^2$, ref : C8919-20ML SIGMA). Après un minimum de deux heures, les cellules ont été imagées dans du DMEM/F12 (1/1) (Thermo Fisher 11039047) avec 10% de FBS (ref : 10270106 Life technologies), en utilisant une excitation laser à 488 nm (50 µW/µm$^2$) et une émission filtrée à 630/50. Des séquences de 1000 images consécutives ont été acquises à l'aide d'un objectif à immersion dans l'huile (Olympus, 100X, NA 1.45) et d'un appareil photo Photometrics Evolve 512 ou QuantEM 512SC avec un temps d'exposition de 10 ms. Les vidéos ont été analysées à l'aide du logiciel de suivi SlimFast 1.103e de Richter. Slimfast est basé sur une méthodologie décrite précédemment pour le suivi par particule permettant d'extraire des trajectoires individuelles [316]. Pour chaque trajectoire supérieure à 40 points, le déplacement quadratique moyen a été calculé à l'aide de routines Matlab sur mesure utilisant la formule de l'équation VII.6.

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle = \left\langle [x(t+\tau)-x(t)]^2 + [y(t+\tau)-y(t)]^2 \right\rangle \tag{VII.6}$$

L'obtention de ces déplacements quadratiques moyens sur 60 ms permettent de remonter au coefficient de diffusion $D$ des nanoparticules dans le cytoplasme selon VII.7 et, sur des temps plus long : jusqu'à 400 ms, ils permettent de remonter au coefficient $\alpha$ indiquant éventuellement une dynamique anormale d'après VII.8.

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle = 4D\tau \tag{VII.7}$$

$$\left\langle r^2(\tau)\right\rangle \propto \tau^{\alpha} \tag{VII.8}$$

Pour chaque échantillon (QD-Zwitt) un couple (D,$\alpha$) est obtenu par trajectoire analysée.

## VII.15 CIBLAGE DE QD SUR LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Les cellules Hela ont été transfectées avec pIRESneo3-streptavidin-mRaspberry-li en utilisant Viafect de Promega (mélange de 1 µg d'ADN pour 3 µL de Viafect dans 200 µL d'Optimem (réf : 11058021)) conformément au protocole du fournisseur. Le lendemain, le milieu a été renouvelé et les cellules ont été observées sur un microscope inversé avec un objectif d'immersion dans l'huile avec un objectif : Olympus, 60X, NA 1,25. Des QD ont été injectés dans les cellules par microinjection à une concentration de 200 nM dans une solution de NaCl à 150 mM et du polymère SB en excès de 1 µg/µL. L'injection a été réalisée à l'aide de capillaires allongés avec une ouverture de 500 nm à une pression de 20 à 30 hPa, avec une pompe à micro-injecteur (Femtojet, Eppendorf, Allemagne) et un micromanipulateur (InjectMan NI2, Eppendorf, Allemagne). Les QD ont été imagés en utilisant une lampe à mercure avec un filtre d'excitation FF01-469/35-25 et un filtre d'émission FF01-630/69-25. La sonde mRaspberry a été imagée en utilisant un filtre d'excitation FF01-559/34-25 et un filtre d'émission FF01-630/69-25.

## VII.16 THÉORIE DU FRET

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfert) est un des transferts d'énergie possibles non radiatif entre deux molécules organiques : un donneur d'énergie (D) et un accepteur (A). Cette théorie a été observée par Perrin pour la première fois au début du XX$^{ime}$ mais décrite pour la première fois par M. Förster. Les différentes possibilité de désexcitation de D* sont : soit désexcitation radiative par fluorescence, par émission d'un photon ; soit désexcitation non radiative (en général par des phénomènes vibratoires) ; soit transfert d'énergie avec un accepteur.

La vitesse de désexcitation du donneur dépend donc de sa constante de vitesse radiative intrinsèque (noté ${k_D}^r$), de sa constante de vitesse non radiative en absence d'accepteur (noté ${k_D}^{nr}$), et de la constante de vitesse du transfert d'énergie (noté $k_{FRET}$). Les temps de vie de fluorescence de D peuvent s'écrire $\tau_D$ et $\tau_{DA}$ respectivement en l'absence et en présence de A, suivant l'équation VII.9.

$$\tau_D = \frac{1}{{k_D}^{nr} + {k_D}^r} \qquad \tau_{DA} = \frac{1}{{k_D}^{nr} + {k_D}^r + k_{FRET}} \tag{VII.9}$$

Le FRET est un transfert d'énergie qui provient d'une interaction dipôle-dipôle entre A et D et on fait l'hypothèse qu'il s'agit de dipôles ponctuels. Cette interaction s'écrit alors comme une interaction coulombienne $V_{Coul}$ suivant l'équation VII.10. Avec $\overrightarrow{\mu_D}$ et $\overrightarrow{\mu_A}$ les moments dipolaires respectivement de la transition d'émission de D et de la transition d'absorption de A. $\kappa$ est le facteur d'orientation entre les 2 moments dipolaires. $n$ est l'indice de réfraction du milieu, $r$ la distance entre D et A et $\epsilon_0$ est la permitivité du vide.

$$V_{Coul} = \frac{\kappa|\overrightarrow{\mu_D}||\overrightarrow{\mu_A}|}{4\pi\epsilon_0 n^2 r^3} \tag{VII.10}$$

D'après la règle d'or de Fermi qui permet de calculer le taux de transition d'un niveau énergétique à un autre, il peut être démontré que la constante cinétique du FRET ($k_{FRET}$) peut s'écrire suivant l'équation VII.11. Avec $\rho$ qui est la densité des interactions entre les états énergétiques initiaux et finaux lors de la transition. $\rho$ est directement liée à l'intégrale de recouvrement entre les spectres d'émission du donneur (D) et d'absorbance de l'accepteur (A), noté $J$.

$$k_{FRET} = \frac{2\pi}{\hbar}|V_{Coul}|^2\rho \tag{VII.11}$$

Ce recouvrement spectral J est donné en équation VII.12. $\bar{I}_D$ correspond à l'intensité d'émission de D normée, et $\epsilon_A$ au coefficient d'absorption molaire de A. En effet, ce transfert d'énergie non radiatif nécessite une certaine compatibilité énergétique entre les molécules D et A. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins en partie, le spectre d'absorption de l'accepteur. J reflète donc la capacité de D et A à émettre et à absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

$$J = \int \bar{I}_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 \,\mathrm{d}\lambda \tag{VII.12}$$

En combinant les équations VII.10,VII.11,VII.12, et en utilisant $J$ à la place de $\rho$, il est possible d'obtenir l'équation VII.13. $\phi_D$ est le rendement quantique de D, $N_a$ la constante d'Avogadro et $\tau_D$ le temps de vie de luminescence de D en l'absence de FRET.

$$k_{FRET} = \frac{9(ln10)\kappa^2\phi_D}{128\pi^5 N_a n^4 \tau_D r^6} J \tag{VII.13}$$

Ce transfert d'énergie a donc lieu lorsque les deux dipôles rentrent en résonance, se trouvant alors mutuellement perturbés. Cette interaction dipôle-dipôle décroit en fonction du cube de la distance entre les dipôles et dépend de leur orientation relative. La probabilité de transfert étant proportionnelle au carré de l'énergie d'interaction coulombienne, le $k_{FRET}$ décroit en $1/r^6$, avec $r$ la distance entre D et A. Ce transfert d'énergie n'a lieu, en général, que lorsque A et D sont très proches : entre 1 et 10 nm. Dans sa théorie, M. Förster propose de simplifier les équations en incorporant une distance, notée $R_0$, appelée distance de Förster, qui caractérise la distance où il y a 50 % de transfert d'énergie. Dans ce cas, on a alors $k_{FRET} = {k_D}^{nr} + {k_D}^{r}$ puisque 50 % des désexcitations se font par FRET. A l'aide de l'équation VII.9, on obtient donc que $k_{FRET} = {\tau_D}^{-1}$. Il est possible, par conséquent, de déterminer cette distance de Förster, à partir de VII.13 et avec $r = R_0$ selon l'équation VII.14.

$$R_0 = \left( \frac{9(ln10)\kappa^2\phi_D}{128\pi^5 N_a n^4} J \right)^{1/6} \tag{VII.14}$$

En combinant les équations VII.13 et VII.14 on obtient alors VII.15.

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \tag{VII.15}$$

Il est possible de déterminer l'efficacité de ce transfert, notée $E_{FRET}$ qui peut être définie comme un rendement quantique du phénomène de transfert d'énergie. Par analogie avec le rendement quantique de fluorescence, ce rendement de transfert correspond au nombre de molécules qui se désexcitent par transfert d'énergie sur le nombre total de molécules excitées. Ainsi, cette efficacité de transfert s'écrit selon l'équation VII.16.

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + {k_D}^{nr} + {k_D}^{r}} \tag{VII.16}$$

En combinant les équations VII.15 et VII.16 on peut simplifier cette efficacité de transfert sous l'écriture de l'équation VII.17.

$$E_{FRET} = \frac{{R_0}^6}{{R_0}^6 + r^6} \tag{VII.17}$$

Sur la figure VII.28, se trouvent un résumé sous forme de schéma des équations présentées précédemment.

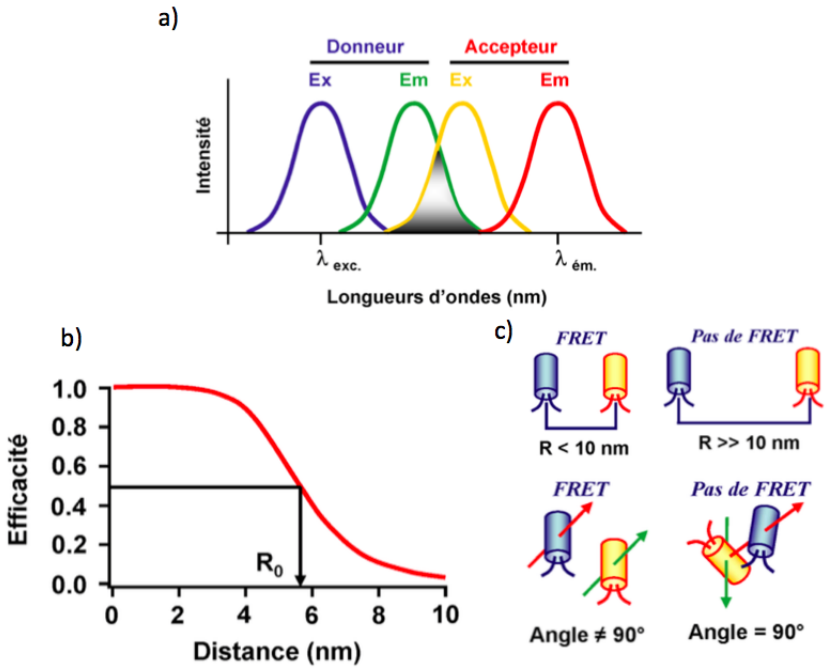



FIGURE VII.28 – Schéma bilan sur le FRET. a) Spectres d'excitation et d'émission du donneur et de l'accepteur. Le spectre d'émission de D doit recouvrir partiellement le spectre d'excitation de A. b) Efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance r entre D et A. R. $R_0$ correspondant à la distance pour laquelle cette efficacité est de 50% c) Conditions entre D et A pour qu'il y ait un transfert d'énergie par FRET.

## VII.17 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION

### Absorption

Les mesures d'absorbance ont été réalisées sur un spectrophotomètre ultraviolet (UV)-visible (Vis)-proche infrarouge (NIR) Varian Cary-5E équipé d'une lampe halogène pour la gamme 350-3300 nm et d'une lampe au deutérium pour la gamme 175-350 nm. Les échantillons sont placés dans une cuve en quartz : 3 mL pour les échantillons pour lesquels la quantité est suffisante ou 600 $\mu L$ pour les autres. Ces cuves présentent une absorption limitée sur la gamme UV-Vis-NIR. Les spectres sont acquis avec un pas d'un nanomètre. Pour l'acquisition des spectres, les NPs sont en suspension dans un solvant et la référence se trouve dans une cuve similaire avec le même solvant.

### Photoluminescence

Le spectrofluorimètre utilisé est un Edinburgh Instruments FSP920. Il est équipé d'une lampe blanche continue qui, combinée avec un monochromateur de largeur variable, permet de choisir la longueur d'onde d'excitation. Ce spectrofluorimètre possède quatre détecteurs mais seulement trois ont été utilisés : l'un, très sensible, couvre la gamme du visible (400-800 nm), un autre, un peu moins sensible, couvre une gamme spectrale plus large (500-1000 nm) et le troisième permet de travailler dans le SWIR (900-1600 nm). Ce spectromètre est également équipé d'une diode laser pulsée émettant à 376 nm avec une fréquence de pulse variable entre 50 ns et 50 $\mu s$ qui permet de réaliser des courbes de déclin de fluorescence.

### Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

Pour les images de TEM, les nanoparticules sont lavées puis dispersées dans un solvant à des concentrations de l'ordre du µM. Les particules sont déposées (deux ou trois gouttes) sur des grilles de TEM en cuivre (200 lignes par pouce). Ces grilles sont ensuite mises à dégazer toute la nuit sous un vide secondaire. Les images sont acquises avec différents grandissements au moyen d'un microscope JEOL 2010 utilisé à 200 kV.

### Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Les masses molaires moyennes en nombre (Mn) et en poids (Mw) ainsi que l'indice de polydispersité (Ip = Mw/Mn) des différents polymères ont été déterminés par chromatographie d'exclusion stérique ("Size Exclusion Chromatography" ou SEC). Les polymères ont été dissous à 4 mg/mL soit dans une solution aqueuse à 0,5 M de $NaNO_3$ soit dans une solution de THF contenant 2 % de triéthylamine. Les polymères sont ensuite filtrés à travers une membrane contenant des pores de 0,2 µm. Les échantillons en solution aqueuse sont passés à 25°C avec un débit de 1 mL/min en utilisant un système Viscotek composé de trois colonnes SHODEX OH SB-806M HQ (13 µm, 300 mm x 8 mm). La masse molaire absolue a été déterminée par une

triple détection (réfractomètre, viscosimètre et diffusion de la lumière), en se basant sur une calibration standard effectuée avec du poly(ethylene oxide).

### Mesure du potentiel Zeta

L'appareil utilisé pour effectuer les mesures de potentiel zéta est un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.), dont les options permettent également de faire des mesures de diamètre hydrodynamique à angle fixe. L'échantillon est introduit dans une cellule zéta à capillaire replié et soumis à un champ électrique. C'est le software Malvern Zetasizer qui détermine une intensité de champ électrique adaptée pour obtenir le meilleur ratio signal/bruit. Le potentiel $\zeta$ n'est pas directement mesurable : c'est la diffusion électrophorétique ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) des particules sous influence du champ électrique qui est mesurée par vélocimétrie laser. Elle est ensuite associée à une valeur de potentiel $\zeta$ via un modèle établi au choix, le plus courant étant le modèle de Smoluchowski.
Les échantillons ont été analysés à des concentrations de 1 µM de QDs dans une solution tampon de 100 mM d'HEPES/Na et 40 mM de NaCl à pH 7 à température ambiante.

### Électrophorèse en gel

Un gel contenant 1 % d'agarose dans une solution tampon de 100 mM d'HEPES/Na et 40 mM de NaCl est préparé. Une solution de QDs est préparée : 5 µL à 10 µM dans 15 µL du même tampon avec 5 µL de glycérol pur. 10 µL de la solution de QDs sont ensuite placés dans un puit du gel. La migration des particules a été faite pendant 2 h à 90 V.

### Diffraction des rayons X (DRX)

Pour caractériser les objets, nous avons utilisés la méthode de diffraction sur poudres. Pour cela, les nanoparticules sont concentrées et déposées sur un substrat de silicium monocristallin. Lors de l'analyse par DRX, les nanocristaux sont bombardés par un faisceau de rayon X créé par la raie $K_\alpha$, $\lambda = 1{,}054056$ $\AA$ du cuivre, opéré à 40 kV et 40 mA. Ces rayons X sont alors diffractés par les électrons des différents atomes qui composent le cristal. Dans la méthode de diffraction sur poudre, le faisceau incident frappe un ensemble de nanocristaux orientés de façon aléatoire, et un détecteur recueille le faisceau à un angle $2\theta$ par rapport au faisceau incident. Le diffractogramme obtenu présente des pics à des angles donnés qui sont caractéristiques de la structure cristalline du matériau.

### Analyse dispersive en énergie (EDX)

Pour réaliser une analyse dispersive en énergie (EDX), une solution concentrée de QD est déposée sur une pastille conductrice de carbone. L'échantillon est ensuite introduit dans un microscope électronique à balayage (MEB) FEI Magellan et il est mis sous un vide secondaire.

Le faisceau d'électron a une tension d'accélération de 20 kV et un courant de 1,6 nA. L'analyse EDX est réalisée au moyen d'une sonde Oxford EDX.

### Analyse par RMN DOSY

Lors de l'analyse par RMN DOSY du nombre de ligands par QD dans le chapitre II, les conditions expérimentales utilisées sont celles détaillées ci-dessous.

Toutes les mesures ont été effectuées à 23°C sur un spectromètre Bruker AvanceIII 300 (300,13 MHz pour 1H) en utilisant une sonde BBFO de 5 mm équipée d'une bobine à gradient z offrant une intensité de gradient maximale de 49,7 G.cm-1. Tous les échantillons ont été dissous dans du $D_2O$. Les expériences DOSY ont été effectuées sur un copolymère greffé sur des QD : QD-SB ([QD] = 2 µM) et sur le copolymère libre (SB [copolymère SB] = 10 µM) avec une séquence d'écho stimulée, en utilisant un retard longitudinal par courants de Foucault (Te = 5 ms), sinus bipolaire impulsions de gradient en forme, deux gradients de déblaiement et présaturation pendant le délai de relaxation (ledbpgppr2s dans la bibliothèque de Bruker). Seize incréments de gradient, répartis linéairement entre 2 et 90% de la résistance maximale du gradient, ont été utilisés pour chaque analyse. Le délai de relaxation totale (AQ + D1) était de 6,8 s pour les deux échantillons. La longueur d'impulsion de gradient (P30) et le délai de diffusion (D20) ont été optimisés pour chaque échantillon afin d'obtenir une atténuation d'environ 95%. Les valeurs (D20 et P30) étaient (200 ms et 1,5 ms) et (250 ms à 2,5 ms) pour le copolymère SB et les QD recouverts de SB, respectivement. Le nombre de transitoires pour chaque incrément de gradient était respectivement de 640 et 1024 pour le copolymère SB et les QD-SB. Les données DOSY ont été analysées avec le module t1t2 disponible dans le logiciel Topspin 3.5 (p17) Bruker. Pour évaluer la qualité des données, les profils d'atténuation (Intégrale vs g) des signaux pertinents ont d'abord été ajustés avec l'équation de Stejskal et Tanner pour extraire les coefficients de diffusion. Un seul composant était suffisant pour chaque signal. Dans un échantillon donné, les différents signaux analysés ont donné le même résultat à ± 5%.

## VII.18 PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

Acétate de sodium ($C_2H_3NaO_2$, Sigma-Aldrich), acétonitrile ($C_2H_3N$, 99.8%, VWR), acide acétique ($CH_3COOH$, 99%, Aldrich), acide borique ($H_3BO_3$, Sigma-Aldrich), acide chlorhydrique (HCl, Sigma Aldrich), acide 4-cyano-4-[(phénylcarbonothioyl)sulfanyl]pentanoïque (CADB, $C_{13}H_{13}NO_2S_2$, Sigma Aldrich), acide 3-mercaptopropanoïque (MPA, $C_3H_6O_2S$, Aldrich), albumine de sérum bovin (BSA, Sigma Aldrich), N-(3-aminopropyl)méthacrylamide chlorhydrate (APMA.HCl, $C_7H_{14}N_2O$.HCl), ammoniaque ($NH_4OH$, 28-30%, Aldrich), bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$, Sigma Aldrich), biotine (Sigma), 2,2-Bis(2,5-dioxo-3- sulfo-1-pyrrolidinyl)octanedioate (BS3, $C_{16}H_{18}N_2Na_2O_{14}S_2$, Thermofisher), chloroforme ($CHCl_3$,VWR), chlorure de sodium (NaCl, Sigma-Aldrich), décahydrate de carbonate de sodium ($Na_2CO_3.10H_2O$, Prolabo), 2,2'-[1,2-diazènediyl]bis(2-méthylpropanimidamide)chlorohydrate (V50, 97%, $(NC(CH_3)_2C(NH)NH_2)_2$.2HCl, Aldrich), hydroxysuccinimide ester (DBCO-NHS, $C_{23}H_{18}N_2O_5$, Aldrich), (EDC, $C_8H_{17}N_3$, Sigma Aldrich), N,N-diméthylformamide (DMF, $C_3H_7NO$, Aldrich), diméthylsulfoxyde (DMSO, $C_2H_6SO$, 99.8%, Sigma-Aldrich), éthanol absolu anhydre (95%, $C_2H_6O$, Carlo Erba), fluorescéine isothiocyanate (FITC, $C_{21}H_{11}NO_5S$, Sigma Aldrich), HEPES sel sodique ($C_8H_{17}N_2NaO_4S$, 99%, Sigma), hexane ($C_6H_{14}$, VWR), hydroxide de sodium (NaOH, 97%, Prolabo), hydroxyde de N-[2-(acrylamido)propyl]-N,N-diméthyl-3-sulfo-1-propanaminium (SB, RASCHIG GmbH), methanol (95%, $CH_3OH$, Carlo Erba), methanol-d4 ($CD_3OD$, 99.9 atom % D Sigma-Aldrich), nitrate de sodium ($NaNO_3$, Sigma Aldrich), N-Hydroxysuccinimide (NHS, Sigma Aldrich), oxyde de deutérium ($D_2O$, 99.9 atom % D, Sigma-Aldrich), polyéthylène glycol (PEG2000, Sigma-Aldrich), PEG amine ($NH_2$-PEG1000-COOH, JenKem Technology), phosphate de 2-(méthacryloyloxy)éthyle et de 2-(triméthylammonio)éthyle (PC, $C_{11}H_{22}NO_6P$, Sigma-Aldrich), rhodamine B isothiocyanate (RITC, $C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$, Sigma-Aldrich), streptavidine (SAv, Biospa), tert-butylate de potassium ($C_4H_9KO$, Fluka), tétraborate de sodium ($Na_2B_4O_7$, 99%, Sigma-Aldrich) , tetrahydrofurane anhydre (THF, $C_4H_8O$, Sigma Aldrich), 4-bromobutyrate de méthyle ($C_5H_9BrO_2$, Sigma-Aldrich), sulfadimethoxine (SD, $C_{12}H_{14}N_4O_4S$, Sigma-Aldrich), sulfamethazine (SZ, $C_{12}H_{14}N_4O_2S$, Polysciences), 2-(diisopropylamino)éthyl methacrylate (DPA, $C_{12}H_{23}NO_2S$, Sigma-Aldrich), Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique, hydrate (MES, $C_6H_{13}NO_4S.H_2O$, Sigma-Aldrich).

# Bibliographie


[1] Les nanomédicaments, alliés de la médecine de demain ?

[2] John V Frangioni. In vivo near-infrared fluorescence imaging. Current opinion in chemical biology, 7(5) :626–634, 2003.

[3] Tuan Vo-Dinh. Biomedical photonics handbook. CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.

[4] Near-infrared window in biological tissue.

[5] Oliver T Bruns, Thomas S Bischof, Daniel K Harris, Daniel Franke, Yanxiang Shi, Lars Riedemann, Alexander Bartelt, Frank B Jaworski, Jessica A Carr, Christopher J Rowlands, et al. Next-generation in vivo optical imaging with short-wave infrared quantum dots. Nature biomedical engineering, 1(4) :0056, 2017.

[6] Richard C Benson and Henry A Kues. Absorption and fluorescence properties of cyanine dyes. Journal of Chemical and Engineering Data, 22(4) :379–383, 1977.

[7] Feng Wang and Xiaogang Liu. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. Chemical Society Reviews, 38(4) :976–989, 2009.

[8] Dev K Chatterjee, Abdul J Rufaihah, and Yong Zhang. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. Biomaterials, 29(7) :937–943, 2008.

[9] Kevin Welsher, Sarah P Sherlock, and Hongjie Dai. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(22) :8943–8948, 2011.

[10] Peter L Choyke, Mary E Girton, Joseph A Frank, Ellen M Vaughan, and Howard A Austin. Clearance of gadolinium chelates by hemodialysis : an in vitro study. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 5(4) :470–472, 1995.

[11] Mark A Perazella. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 4(2) :461–469, 2009.

[12] Peter Caravan, Jeffrey J Ellison, Thomas J McMurry, and Randall B Lauffer. Gadolinium (iii) chelates as mri contrast agents : structure, dynamics, and applications. Chemical reviews, 99(9) :2293–2352, 1999.

[13] Kenneth N Raymond and Valérie C Pierre. Next generation, high relaxivity gadolinium mri agents. Bioconjugate chemistry, 16(1) :3–8, 2005.

[14] Peter Caravan. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based mri contrast agents. Chemical Society Reviews, 35(6) :512–523, 2006.

[15] Natalie J Serkova. Nanoparticle-based magnetic resonance imaging on tumor-associated macrophages and inflammation. Frontiers in immunology, 8 :590, 2017.

[16] Fong-Yu Cheng, Chia-Hao Su, Yu-Sheng Yang, Chen-Sheng Yeh, Chiau-Yuang Tsai, Chao-Liang Wu, Ming-Ting Wu, and Dar-Bin Shieh. Characterization of aqueous dispersions of fe3o4 nanoparticles and their biomedical applications. Biomaterials, 26(7) :729–738, 2005.

[17] Myung Ju Baek, Ja Young Park, Wenlong Xu, Krishna Kattel, Han Gyeol Kim, Eun Jung Lee, Anilkumar Kantilal Patel, Jae Jun Lee, Yongmin Chang, Tae Jeong Kim, et al. Water-soluble mno nanocolloid for a molecular t 1 mr imaging : a facile one-pot synthesis, in vivo t 1 mr images, and account for relaxivities. ACS applied materials & interfaces, 2(10) :2949–2955, 2010.

[18] Chih-Chia Huang, Ngee-Huat Khu, and Chen-Sheng Yeh. The characteristics of sub 10 nm manganese oxide t 1 contrast agents of different nanostructured morphologies. Biomaterials, 31(14) :4073–4078, 2010.

[19] Wenlong Xu, Krishna Kattel, Ja Young Park, Yongmin Chang, Tae Jeong Kim, and Gang Ho Lee. Paramagnetic nanoparticle t 1 and t 2 mri contrast agents. Physical Chemistry Chemical Physics, 14(37) :12687–12700, 2012.

[20] M Gaceur, M Giraud, M Hemadi, S Nowak, N Menguy, JP Quisefit, K David, T Jahanbin, S Benderbous, M Boissière, et al. Polyol-synthesized zn0. 9mn0. 1s nanoparticles as potential luminescent and magnetic bimodal imaging probes : synthesis, characterization, and toxicity study. Journal of Nanoparticle Research, 14(7) :1–15, 2012.

[21] S Mallidi, B Wang, M Mehrmohammadi, M Qu, Y-S Chen, P Joshi, S Kim, KA Homan, AB Karpiouk, RW Smalling, et al. Ultrasound-based imaging of nanoparticles : From molecular and cellular imaging to therapy guidance. In 2009 IEEE International Ultrasonics Symposium, pages 27–36. IEEE, 2009.

[22] Hao F Zhang, Konstantin Maslov, Mathangi Sivaramakrishnan, Gheorghe Stoica, Lihong V Wang, et al. Imaging of hemoglobin oxygen saturation variations in single vessels in vivo using photoacoustic microscopy. Applied physics letters, 90(5) :053901, 2007.

[23] Mohammad Eghtedari, Alexander Oraevsky, John A Copland, Nicholas A Kotov, Andre Conjusteau, and Massoud Motamedi. High sensitivity of in vivo detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system. Nano letters, 7(7) :1914–1918, 2007.

[24] Amaury Prost. Photoacoustic imaging : application to the control of ultrasound therapy and investigatio Theses, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, April 2014.

[25] Geoffrey Von Maltzahn, Ji-Ho Park, Amit Agrawal, Nanda Kishor Bandaru, Sarit K Das, Michael J Sailor, and Sangeeta N Bhatia. Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. Cancer research, 69(9) :3892–3900, 2009.

[26] Hrvoje Lusic and Mark W Grinstaff. X-ray-computed tomography contrast agents. Chemical reviews, 113(3) :1641–1666, 2012.

[27] Fabien Hyafil, Jean-Christophe Cornily, Jonathan E Feig, Ronald Gordon, Esad Vucic, Vardan Amirbekian, Edward A Fisher, Valentin Fuster, Laurent J Feldman, and Zahi A Fayad. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. Nature medicine, 13(5) :636, 2007.

[28] Rajiv Kumar, Marcin Nyk, Tymish Y Ohulchanskyy, Christopher A Flask, and Paras N Prasad. Combined optical and mr bioimaging using rare earth ion doped nayf4 nanocrystals. Advanced Functional Materials, 19(6) :853–859, 2009.

[29] Dongkyu Kim, Sangjin Park, Jae Hyuk Lee, Yong Yeon Jeong, and Sangyong Jon. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo x-ray computed tomography imaging. Journal of the American Chemical Society, 129(24) :7661–7665, 2007.

[30] Fabian Kiessling and Bernd J Pichler. Small animal imaging : basics and practical guide. Springer Science & Business Media, 2010.

[31] Quan Yuan, Yunfei Zhang, Tao Chen, Danqing Lu, Zilong Zhao, Xiaobing Zhang, Zhenxing Li, Chun-Hua Yan, and Weihong Tan. Photon-manipulated drug release from a mesoporous nanocontainer controlled by azobenzene-modified nucleic acid. ACS nano, 6(7) :6337–6344, 2012.

[32] Hong Yan, Cathleen Teh, Sivaramapanicker Sreejith, Liangliang Zhu, Anna Kwok, Weiqin Fang, Xing Ma, Kim Truc Nguyen, Vladimir Korzh, and Yanli Zhao. Functional mesoporous silica nanoparticles for photothermal-controlled drug delivery in vivo. Angewandte Chemie International Edition, 51(33) :8373–8377, 2012.

[33] Rong Tong, Houman D Hemmati, Robert Langer, and Daniel S Kohane. Photoswitchable nanoparticles for triggered tissue penetration and drug delivery. Journal of the American Chemical Society, 134(21) :8848–8855, 2012.

[34] Natalya Y Rapoport, Anne M Kennedy, Jill E Shea, Courtney L Scaife, and Kweon-Ho Nam. Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles. Journal of Controlled Release, 138(3) :268–276, 2009.

[35] Avi Schroeder, Reuma Honen, Keren Turjeman, Alberto Gabizon, Joseph Kost, and Yechezkel Barenholz. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. Journal of controlled release, 137(1) :63–68, 2009.

[36] Azadeh Kheirolomoom, Lisa M Mahakian, Chun-Yen Lai, Heather A Lindfors, Jai Woong Seo, Eric E Paoli, Katherine D Watson, Eric M Haynam, Elizabeth S Ingham, Li Xing,

et al. Copper- doxorubicin as a nanoparticle cargo retains efficacy with minimal toxicity. Molecular pharmaceutics, 7(6) :1948–1958, 2010.

[37] Lingyu Zhang, Tingting Wang, Lei Yang, Cong Liu, Chungang Wang, Haiyan Liu, Y Andrew Wang, and Zhongmin Su. General route to multifunctional uniform yolk/mesoporous silica shell nanocapsules : a platform for simultaneous cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery. Chemistry–A European Journal, 18(39) :12512–12521, 2012.

[38] Mu-Yi Hua, Hao-Li Liu, Hung-Wei Yang, Pin-Yuan Chen, Rung-Ywan Tsai, Chiung-Yin Huang, I-Chou Tseng, Lee-Ang Lyu, Chih-Chun Ma, Hsiang-Jun Tang, et al. The effectiveness of a magnetic nanoparticle-based delivery system for bcnu in the treatment of gliomas. Biomaterials, 32(2) :516–527, 2011.

[39] Vincent Plassat, Claire Wilhelm, Véronique Marsaud, Christine Ménager, Florence Gazeau, Jack-Michel Renoir, and Sylviane Lesieur. Anti-estrogen-loaded superparamagnetic liposomes for intracellular magnetic targeting and treatment of breast cancer tumors. Advanced Functional Materials, 21(1) :83–92, 2011.

[40] Fan Zhang, Gary B Braun, Alessia Pallaoro, Yichi Zhang, Yifeng Shi, Daxiang Cui, Martin Moskovits, Dongyuan Zhao, and Galen D Stucky. Mesoporous multifunctional upconversion luminescent and magnetic "nanorattle" materials for targeted chemotherapy. Nano letters, 12(1) :61–67, 2011.

[41] Jun Ge, Evgenios Neofytou, Thomas J Cahill III, Ramin E Beygui, and Richard N Zare. Drug release from electric-field-responsive nanoparticles. ACS nano, 6(1) :227–233, 2011.

[42] Ji S Im, Byong Ch Bai, and Young-Seak Lee. The effect of carbon nanotubes on drug delivery in an electro-sensitive transdermal drug delivery system. Biomaterials, 31(6) :1414–1419, 2010.

[43] Hoon Kim, Sang-Mi Jeong, and Ji-Woong Park. Electrical switching between vesicles and micelles via redox-responsive self-assembly of amphiphilic rod- coils. Journal of the American Chemical Society, 133(14) :5206–5209, 2011.

[44] Byeongmoon Jeong, You Han Bae, and Sung Wan Kim. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of peg–plga–peg triblock copolymers. Journal of controlled release, 63(1-2) :155–163, 2000.

[45] Tatsuaki Tagami, Warren D Foltz, Mark J Ernsting, Carol M Lee, Ian F Tannock, Jonathan P May, and Shyh-Dar Li. Mri monitoring of intratumoral drug delivery and prediction of the therapeutic effect with a multifunctional thermosensitive liposome. Biomaterials, 32(27) :6570–6578, 2011.

[46] Zahraa S Al-Ahmady, Wafa'T Al-Jamal, Jeroen V Bossche, Tam T Bui, Alex F Drake, A James Mason, and Kostas Kostarelos. Lipid–peptide vesicle nanoscale hybrids for triggered drug release by mild hyperthermia in vitro and in vivo. ACS nano, 6(10) :9335–9346, 2012.

[47] Ko-Jie Chen, Hsiang-Fa Liang, Hsin-Lung Chen, Yucai Wang, Po-Yuan Cheng, Hao-Li Liu, Younan Xia, and Hsing-Wen Sung. A thermoresponsive bubble-generating liposomal system for triggering localized extracellular drug delivery. ACS nano, 7(1) :438–446, 2012.

[48] Weiwei Gao, Juliana M Chan, and Omid C Farokhzad. ph-responsive nanoparticles for drug delivery. Molecular pharmaceutics, 7(6) :1913–1920, 2010.

[49] Kyung Hyun Min, Jong-Ho Kim, Sang Mun Bae, Hyeri Shin, Min Sang Kim, Sangjin Park, Hyejung Lee, Rang-Woon Park, In-San Kim, Kwangmeyung Kim, et al. Tumoral acidic ph-responsive mpeg-poly ($\beta$-amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. Journal of Controlled Release, 144(2) :259–266, 2010.

[50] Guang Hui Gao, Min Jung Park, Yi Li, Geun Ho Im, Jae-Hoon Kim, Hun Nyun Kim, Jae Won Lee, Pyoung Jeon, Oh Young Bang, Jung Hee Lee, et al. The use of ph-sensitive positively charged polymeric micelles for protein delivery. Biomaterials, 33(35) :9157–9164, 2012.

[51] Go Saito, Joel A Swanson, and Kyung-Dall Lee. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages : role and site of cellular reducing activities. Advanced drug delivery reviews, 55(2) :199–215, 2003.

[52] Hyehyeon Kim, Saehee Kim, Chiyoung Park, Hyemi Lee, Heon Joo Park, and Chulhee Kim. Glutathione-induced intracellular release of guests from mesoporous silica nanocontainers with cyclodextrin gatekeepers. Advanced Materials, 22(38) :4280–4283, 2010.

[53] Yunus E Kurtoglu, Raghavendra S Navath, Bing Wang, Sujatha Kannan, Robert Romero, and Rangaramanujam M Kannan. Poly (amidoamine) dendrimer–drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. Biomaterials, 30(11) :2112–2121, 2009.

[54] Winston Ong, Yuming Yang, Angela C Cruciano, and Robin L McCarley. Redox-triggered contents release from liposomes. Journal of the American Chemical Society, 130(44) :14739–14744, 2008.

[55] Todd J Harris, Geoffrey von Maltzahn, Matthew E Lord, Ji-Ho Park, Amit Agrawal, Dal-Hee Min, Michael J Sailor, and Sangeeta N Bhatia. Protease-triggered unveiling of bioactive nanoparticles. small, 4(9) :1307–1312, 2008.

[56] Hiroto Hatakeyama, Hidetaka Akita, Erika Ito, Yasuhiro Hayashi, Motoi Oishi, Yukio Nagasaki, Radostin Danev, Kuniaki Nagayama, Noritada Kaji, Hiroshi Kikuchi, et al. Systemic delivery of sirna to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable peg-lipid. Biomaterials, 32(18) :4306–4316, 2011.

[57] Jayati Banerjee, Andrea J Hanson, Bhushan Gadam, Adekunle I Elegbede, Shakila Tobwala, Bratati Ganguly, Anil V Wagh, Wallace W Muhonen, Benedict Law, John B Shabb, et al. Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. Bioconjugate chemistry, 20(7) :1332–1339, 2009.

[58] Neetu Singh, Amrita Karambelkar, Luo Gu, Kevin Lin, Jordan S Miller, Christopher S Chen, Michael J Sailor, and Sangeeta N Bhatia. Bioresponsive mesoporous silica na-

noparticles for triggered drug release. Journal of the American Chemical Society, 133(49) :19582–19585, 2011.

[59] Saji Uthaman, Kang Moo Huh, and In-Kyu Park. Tumor microenvironment-responsive nanoparticles for cancer theragnostic applications. Biomaterials research, 22(1) :22, 2018.

[60] Laurence Maggiorella, Gilles Barouch, Corinne Devaux, Agnès Pottier, Eric Deutsch, Jean Bourhis, Elsa Borghi, and Laurent Levy. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. Future oncology, 8(9) :1167–1181, 2012.

[61] Junjie Deng, Shandong Xu, Weike Hu, Xiaojie Xun, Liyuan Zheng, and Ming Su. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced x-ray radiation therapy of breast cancer. Biomaterials, 154 :24–33, 2018.

[62] Hung-Wei Yang, Hao-Li Liu, Meng-Lin Li, I-Wen Hsi, Chih-Tai Fan, Chiung-Yin Huang, Yu-Jen Lu, Mu-Yi Hua, Hsin-Yi Chou, Jiunn-Woei Liaw, et al. Magnetic gold-nanorod/pnipaamma nanoparticles for dual magnetic resonance and photoacoustic imaging and targeted photothermal therapy. Biomaterials, 34(22) :5651–5660, 2013.

[63] Erin B Dickerson, Erik C Dreaden, Xiaohua Huang, Ivan H El-Sayed, Hunghao Chu, Sujatha Pushpanketh, John F McDonald, and Mostafa A El-Sayed. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (pptt) of squamous cell carcinoma in mice. Cancer letters, 269(1) :57–66, 2008.

[64] Vladimir P Zharov, Elena N Galitovskaya, Carl Johnson, and Thomas Kelly. Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters : potential for cancer therapy. Lasers in surgery and medicine, 37(3) :219–226, 2005.

[65] Christopher Loo, Amanda Lowery, Naomi Halas, Jennifer West, and Rebekah Drezek. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. Nano letters, 5(4) :709–711, 2005.

[66] Jing Liang Li, Daniel Day, and Min Gu. Ultra-low energy threshold for cancer photothermal therapy using transferrin-conjugated gold nanorods. Advanced materials, 20(20) :3866–3871, 2008.

[67] Won Il Choi, Ja-Young Kim, Chul Kang, Clare C Byeon, Young Ha Kim, and Giyoong Tae. Tumor regression in vivo by photothermal therapy based on gold-nanorod-loaded, functional nanocarriers. ACS nano, 5(3) :1995–2003, 2011.

[68] Stefan Wilhelm, Anthony J Tavares, Qin Dai, Seiichi Ohta, Julie Audet, Harold F Dvorak, and Warren CW Chan. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nature reviews materials, 1(5) :16014, 2016.

[69] Victor K LaMer and Robert H Dinegar. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. Journal of the American Chemical Society, 72(11) :4847–4854, 1950.

[70] CBea Murray, David J Norris, and Moungi G Bawendi. Synthesis and characterization of nearly monodisperse cde (e= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. Journal of the American Chemical Society, 115(19) :8706–8715, 1993.

[71] Fudong Wang, Rui Tang, and William E Buhro. The trouble with topo ; identification of adventitious impurities beneficial to the growth of cadmium selenide quantum dots, rods, and wires. Nano letters, 8(10) :3521–3524, 2008.

[72] HL Ding, YX Zhang, S Wang, JM Xu, SC Xu, and GH Li. Fe3o4@ sio2 core/shell nanoparticles : the silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses. Chemistry of Materials, 24(23) :4572–4580, 2012.

[73] Thomas Nann and Paul Mulvaney. Single quantum dots in spherical silica particles. Angewandte Chemie International Edition, 43(40) :5393–5396, 2004.

[74] M Brust, J Fink, D Bethell, DJ Schiffrin, and C Kiely. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (16) :1655–1656, 1995.

[75] Joan Vignolle and T Don Tilley. N-heterocyclic carbene-stabilized gold nanoparticles and their assembly into 3d superlattices. Chemical Communications, (46) :7230–7232, 2009.

[76] Manasmita Das, Debasish Mishra, Prasanta Dhak, Satyajit Gupta, Tapas Kumar Maiti, Amit Basak, and Panchanan Pramanik. Biofunctionalized, phosphonate-grafted, ultrasmall iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and multimodal imaging. Small, 5(24) :2883–2893, 2009.

[77] Esther Amstad, Torben Gillich, Idalia Bilecka, Marcus Textor, and Erik Reimhult. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. Nano letters, 9(12) :4042–4048, 2009.

[78] Fangfang Chen, Guankui Wang, James I Griffin, Barbara Brenneman, Nirmal K Banda, V Michael Holers, Donald S Backos, LinPing Wu, Seyed Moein Moghimi, and Dmitri Simberg. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo. Nature nanotechnology, 12(4) :387, 2017.

[79] Zhou J Deng, Mingtao Liang, Michael Monteiro, Istvan Toth, and Rodney F Minchin. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes mac-1 receptor activation and inflammation. Nature nanotechnology, 6(1) :39, 2011.

[80] Marco P Monopoli, Christoffer Åberg, Anna Salvati, and Kenneth A Dawson. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nature nanotechnology, 7(12) :779, 2012.

[81] Stefan Tenzer, Dominic Docter, Jörg Kuharev, Anna Musyanovych, Verena Fetz, Rouven Hecht, Florian Schlenk, Dagmar Fischer, Klytaimnistra Kiouptsi, Christoph Reinhardt, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nature nanotechnology, 8(10) :772, 2013.

[82] Marilena Hadjidemetriou and Kostas Kostarelos. Nanomedicine : evolution of the nanoparticle corona. Nature nanotechnology, 12(4) :288, 2017.

[83] Hidenori Otsuka, Yukio Nagasaki, and Kazunori Kataoka. Pegylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. Advanced drug delivery reviews, 64 :246–255, 2012.

[84] Lingyan Li, Shengfu Chen, Jie Zheng, Buddy D Ratner, and Shaoyi Jiang. Protein adsorption on oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiolate self-assembled monolayers : the molecular basis for nonfouling behavior. The Journal of Physical Chemistry B, 109(7) :2934–2941, 2005.

[85] SI Jeon, JH Lee, JD Andrade, and PrG De Gennes. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide : I. simplified theory. Journal of colloid and interface science, 142(1) :149–158, 1991.

[86] Daniela Pozzi, Giulio Caracciolo, Anna Laura Capriotti, Chiara Cavaliere, Giorgia La Barbera, Thomas J Anchordoquy, and Aldo Laganà. Surface chemistry and serum type both determine the nanoparticle–protein corona. Journal of proteomics, 119 :209–217, 2015.

[87] R Gref, M Lück, P Quellec, M Marchand, E Dellacherie, S Harnisch, T Blunk, and RH Müller. 'stealth'corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (peg) : influences of the corona (peg chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 18(3-4) :301–313, 2000.

[88] Joseph B Schlenoff. Zwitteration : coating surfaces with zwitterionic functionality to reduce nonspecific adsorption. Langmuir, 30(32) :9625–9636, 2014.

[89] Shaoyi Jiang and Zhiqiang Cao. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. Advanced materials, 22(9) :920–932, 2010.

[90] He Wei, Numpon Insin, Jungmin Lee, Hee-Sun Han, Jose M Cordero, Wenhao Liu, and Moungi G Bawendi. Compact zwitterion-coated iron oxide nanoparticles for biological applications. Nano letters, 12(1) :22–25, 2011.

[91] Zaki G Estephan, Jad A Jaber, and Joseph B Schlenoff. Zwitterion-stabilized silica nanoparticles : toward nonstick nano. Langmuir, 26(22) :16884–16889, 2010.

[92] Qiao Jin, Jian-Ping Xu, Jian Ji, and Jia-Cong Shen. Zwitterionic phosphorylcholine as a better ligand for stabilizing large biocompatible gold nanoparticles. Chemical Communications, (26) :3058–3060, 2008.

[93] Barbara Stella, Silvia Arpicco, Maria Teresa Peracchia, Didier Desmaële, Johan Hoebeke, Michel Renoir, Jean D'Angelo, Luigi Cattel, and Patrick Couvreur. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. Journal of pharmaceutical sciences, 89(11) :1452–1464, 2000.

[94] Willem JM Mulder, Gustav J Strijkers, Geralda AF van Tilborg, Arjan W Griffioen, and Klaas Nicolay. Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced mri and molecular imaging. NMR in Biomedicine : An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo, 19(1) :142–164, 2006.

[95] Rumiana Bakalova, Zhivko Zhelev, Ichio Aoki, and Iwao Kanno. Designing quantum-dot probes. Nature Photonics, 1(9) :487, 2007.

[96] Franck Bertorelle, Claire Wilhelm, Jacky Roger, Florence Gazeau, Christine Ménager, and Valérie Cabuil. Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles : intracellular uptake and use in cellular imaging. Langmuir, 22(12) :5385–5391, 2006.

[97] Desheng Wang, Jibao He, Nista Rosenzweig, and Zeev Rosenzweig. Superparamagnetic fe2o3 beads- cdse/zns quantum dots core- shell nanocomposite particles for cell separation. Nano Letters, 4(3) :409–413, 2004.

[98] Jingyu Shi, Feng Tian, Jing Lyu, and Mo Yang. Nanoparticle based fluorescence resonance energy transfer (fret) for biosensing applications. Journal of materials chemistry B, 3(35) :6989–7005, 2015.

[99] Wenhao Liu, Mark Howarth, Andrew B Greytak, Yi Zheng, Daniel G Nocera, Alice Y Ting, and Moungi G Bawendi. Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. Journal of the American Chemical Society, 130(4) :1274–1284, 2008.

[100] Alison M Funston, Jacek J Jasieniak, and Paul Mulvaney. Complete quenching of cdse nanocrystal photoluminescence by single dye molecules. Advanced Materials, 20(22) :4274–4280, 2008.

[101] Myriam Protière. Synthèse de nanocristaux fluorescents de semi-conducteurs II-VI et III-V. Augmentation de l'échelle de synthèse. PhD thesis, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2007.

[102] Peter REISS and Frédéric CHANDEZON. Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. des nanoparticules aux applications multiples. Techniques de l'ingénieur Les grands rendez-vous de l'année 2015, base documentaire : 42625210.(ref. article : nm2030), 2016.

[103] Jin Young Kim, Oleksandr Voznyy, David Zhitomirsky, and Edward H Sargent. 25th anniversary article : Colloidal quantum dot materials and devices : A quarter-century of advances. Advanced Materials, 25(36) :4986–5010, 2013.

[104] Youngjin Jang, Arthur Shapiro, Maya Isarov, Anna Rubin-Brusilovski, Aron Safran, Adam K Budniak, Faris Horani, Joanna Dehnel, Aldona Sashchiuk, and Efrat Lifshitz. Interface control of electronic and optical properties in iv–vi and ii–vi core/shell colloidal quantum dots : a review. Chemical Communications, 53(6) :1002–1024, 2017.

[105] Peter Reiss, Marie Carriere, Christophe Lincheneau, Louis Vaure, and Sudarsan Tamang. Synthesis of semiconductor nanocrystals, focusing on nontoxic and earth-abundant materials. Chemical reviews, 116(18) :10731–10819, 2016.

[106] Thomas Pons, Emilie Pic, Nicolas Lequeux, Elsa Cassette, Lina Bezdetnaya, François Guillemin, Frédéric Marchal, and Benoit Dubertret. Cadmium-free cuins2/zns quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. ACS nano, 4(5) :2531–2538, 2010.

[107] Iwan Moreels, Yolanda Justo, Bram De Geyter, Katrien Haustraete, José C Martins, and Zeger Hens. Size-tunable, bright, and stable pbs quantum dots : a surface chemistry study. ACS nano, 5(3) :2004–2012, 2011.

[108] Alexey I Ekimov and Alexei A Onushchenko. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals. Jetp Lett, 34(6) :345–349, 1981.

[109] Louis E Brus. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites : The size dependence of the lowest excited electronic state. The Journal of chemical physics, 80(9) :4403–4409, 1984.

[110] A Paul Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. science, 271(5251) :933–937, 1996.

[111] Dmitri V Talapin, Elena V Shevchenko, Christopher B Murray, Andreas Kornowski, Stephan Förster, and Horst Weller. Cdse and cdse/cds nanorod solids. Journal of the American Chemical Society, 126(40) :12984–12988, 2004.

[112] Cecile Bouet, Mickael D Tessier, Sandrine Ithurria, Benoit Mahler, Brice Nadal, and Benoit Dubertret. Flat colloidal semiconductor nanoplatelets. Chemistry of Materials, 25(8) :1262–1271, 2013.

[113] David J Norris and MG Bawendi. Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in cdse quantum dots. Physical Review B, 53(24) :16338, 1996.

[114] Rolf Koole, Esther Groeneveld, Daniel Vanmaekelbergh, Andries Meijerink, and Celso de Mello Donegá. Size effects on semiconductor nanoparticles. In Nanoparticles, pages 13–51. Springer, 2014.

[115] Chin-Yu Yeh, ZW Lu, S Froyen, and Alex Zunger. Zinc-blende–wurtzite polytypism in semiconductors. Physical Review B, 46(16) :10086, 1992.

[116] Margaret A Hines and Philippe Guyot-Sionnest. Synthesis and characterization of strongly luminescing zns-capped cdse nanocrystals. The Journal of Physical Chemistry, 100(2) :468–471, 1996.

[117] David R Baker and Prashant V Kamat. Tuning the emission of cdse quantum dots by controlled trap enhancement. Langmuir, 26(13) :11272–11276, 2010.

[118] Peter Reiss, Myriam Protiere, and Liang Li. Core/shell semiconductor nanocrystals. small, 5(2) :154–168, 2009.

[119] Andrew M Smith, Hongwei Duan, Aaron M Mohs, and Shuming Nie. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. Advanced drug delivery reviews, 60(11) :1226–1240, 2008.

[120] Xiaogang Peng, Michael C Schlamp, Andreas V Kadavanich, and A Paul Alivisatos. Epitaxial growth of highly luminescent cdse/cds core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility. Journal of the American Chemical Society, 119(30) :7019–7029, 1997.

[121] J Jack Li, Y Andrew Wang, Wenzhuo Guo, Joel C Keay, Tetsuya D Mishima, Matthew B Johnson, and Xiaogang Peng. Large-scale synthesis of nearly monodisperse cdse/cds core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction. Journal of the American Chemical Society, 125(41) :12567–12575, 2003.

[122] Renguo Xie, Ute Kolb, Jixue Li, Thomas Basché, and Alf Mews. Synthesis and characterization of highly luminescent cdse- core cds/zn0. 5cd0. 5s/zns multishell nanocrystals. Journal of the American Chemical Society, 127(20) :7480–7488, 2005.

[123] Dong Hee Son, Steven M Hughes, Yadong Yin, and A Paul Alivisatos. Cation exchange reactions in ionic nanocrystals. Science, 306(5698) :1009–1012, 2004.

[124] Dmitri V Talapin, Robert Koeppe, Stephan Götzinger, Andreas Kornowski, John M Lupton, Andrey L Rogach, Oliver Benson, Jochen Feldmann, and Horst Weller. Highly emissive colloidal cdse/cds heterostructures of mixed dimensionality. Nano Letters, 3(12) :1677–1681, 2003.

[125] Sandrine Ithurria and Dmitri V Talapin. Colloidal atomic layer deposition (c-ald) using self-limiting reactions at nanocrystal surface coupled to phase transfer between polar and nonpolar media. Journal of the American Chemical Society, 134(45) :18585–18590, 2012.

[126] Z Adam Peng and Xiaogang Peng. Formation of high-quality cdte, cdse, and cds nanocrystals using cdo as precursor. Journal of the American Chemical Society, 123(1) :183–184, 2001.

[127] Elsa Cassette, Thomas Pons, Cécile Bouet, Marion Helle, Lina Bezdetnaya, Frédéric Marchal, and Benoît Dubertret. Synthesis and characterization of near-infrared cu- in- se/zns core/shell quantum dots for in vivo imaging. Chemistry of Materials, 22(22) :6117–6124, 2010.

[128] Yolanda Justo, Pieter Geiregat, Karen Van Hoecke, Frank Vanhaecke, Celso De Mello Donega, and Zeger Hens. Optical properties of pbs/cds core/shell quantum dots. The Journal of Physical Chemistry C, 117(39) :20171–20177, 2013.

[129] Ludovico Cademartiri, Jacopo Bertolotti, Riccardo Sapienza, Diederik S Wiersma, Georg Von Freymann, and Geoffrey A Ozin. Multigram scale, solventless, and diffusion-controlled route to highly monodisperse pbs nanocrystals. The Journal of Physical Chemistry B, 110(2) :671–673, 2006.

[130] Laxmi Kishore Sagar, Willem Walravens, Qiang Zhao, André Vantomme, Pieter Geiregat, and Zeger Hens. Pbs/cds core/shell quantum dots by additive, layer-by-layer shell growth. Chemistry of Materials, 28(19) :6953–6959, 2016.

[131] Tristan Mangeolle, Ilya Yakavets, Sophie Marchal, Manon Debayle, Thomas Pons, Lina Bezdetnaya, and Frédéric Marchal. Fluorescent nanoparticles for the guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis. Nanomaterials, 8(8) :572, 2018.

[132] Mikhail E Kandel, Daniel Fernandes, Alison M Taylor, Haadi Shakir, Catherine Best-Popescu, and Gabriel Popescu. Three-dimensional intracellular transport in neuron bodies and neurites investigated by label-free dispersion-relation phase spectroscopy. Cytometry Part A, 91(5) :519–526, 2017.

[133] John V Frangioni. In vivo near-infrared fluorescence imaging. Current opinion in chemical biology, 7(5) :626–634, 2003.

[134] Guosong Hong, Shuo Diao, Alexander L Antaris, and Hongjie Dai. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. Chemical reviews, 115(19) :10816–10906, 2015.

[135] Ute Resch-Genger, Markus Grabolle, Sara Cavaliere-Jaricot, Roland Nitschke, and Thomas Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods, 5(9) :763, 2008.

[136] Xingyong Wu, Hongjian Liu, Jianquan Liu, Kari N Haley, Joseph A Treadway, J Peter Larson, Nianfeng Ge, Frank Peale, and Marcel P Bruchez. Immunofluorescent labeling of cancer marker her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. Nature biotechnology, 21(1) :41, 2003.

[137] Sophie Bouccara, Alexandra Fragola, Emerson Giovanelli, Gary Sitbon, Nicolas Lequeux, Thomas Pons, and Vincent Loriette. Time-gated cell imaging using long lifetime near-infrared-emitting quantum dots for autofluorescence rejection. Journal of biomedical optics, 19(5) :051208, 2014.

[138] Richard C Benson and Henry A Kues. Absorption and fluorescence properties of cyanine dyes. Journal of Chemical and Engineering Data, 22(4) :379–383, 1977.

[139] RC Benson and HA Kues. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. Physics in Medicine & Biology, 23(1) :159, 1978.

[140] Knut Rurack and Monika Spieles. Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600- 1000 nm. Analytical chemistry, 83(4) :1232–1242, 2011.

[141] Daniele Gerion, Fabien Pinaud, Shara C Williams, Wolfgang J Parak, Daniela Zanchet, Shimon Weiss, and A Paul Alivisatos. Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated cdse/zns semiconductor quantum dots. The Journal of Physical Chemistry B, 105(37) :8861–8871, 2001.

[142] Hedi Mattoussi, J Matthew Mauro, Ellen R Goldman, George P Anderson, Vikram C Sundar, Frederic V Mikulec, and Moungi G Bawendi. Self-assembly of cdse- zns quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. Journal of the American Chemical Society, 122(49) :12142–12150, 2000.

[143] Eleonora Muro, Alexandra Fragola, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Andriani Ioannou, Paris Skourides, and Benoit Dubertret. Comparing intracellular stability and targeting of sulfobetaine quantum dots with other surface chemistries in live cells. Small, 8(7) :1029–1037, 2012.

[144] Emerson Giovanelli, Eleonora Muro, Gary Sitbon, Mohamed Hanafi, Thomas Pons, Benoît Dubertret, and Nicolas Lequeux. Highly enhanced affinity of multidentate versus bidentate zwitterionic ligands for long-term quantum dot bioimaging. Langmuir, 28(43) :15177–15184, 2012.

[145] Mariana Tasso, Emerson Giovanelli, Diana Zala, Sophie Bouccara, Alexandra Fragola, Mohamed Hanafi, Zsolt Lenkei, Thomas Pons, and Nicolas Lequeux. Sulfobetaine–vinylimidazole block copolymers : A robust quantum dot surface chemistry expanding bioimaging's horizons. ACS nano, 9(11) :11479–11489, 2015.

[146] Wolfgang Maret. Zinc and sulfur : a critical biological partnership. Biochemistry, 43(12) :3301–3309, 2004.

[147] Warren CW Chan and Shuming Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science, 281(5385) :2016–2018, 1998.

[148] Wenhao Liu, Hak Soo Choi, John P Zimmer, Eiichi Tanaka, John V Frangioni, and Moungi Bawendi. Compact cysteine-coated cdse (zncds) quantum dots for in vivo applications. Journal of the American Chemical Society, 129(47) :14530–14531, 2007.

[149] Gregory P Mitchell, Chad A Mirkin, and Robert L Letsinger. Programmed assembly of dna functionalized quantum dots. Journal of the American Chemical Society, 121(35) :8122–8123, 1999.

[150] Ponnusamy Babu, Sharmistha Sinha, and Avadhesha Surolia. Sugar- quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins. Bioconjugate chemistry, 18(1) :146–151, 2007.

[151] Wolfgang J Parak, Daniele Gerion, Teresa Pellegrino, Daniela Zanchet, Christine Micheel, Shara C Williams, Rosanne Boudreau, Mark A Le Gros, Carolyn A Larabell, and A Paul Alivisatos. Biological applications of colloidal nanocrystals. Nanotechnology, 14(7) :R15, 2003.

[152] Kimihiro Susumu, H Tetsuo Uyeda, Igor L Medintz, Thomas Pons, James B Delehanty, and Hedi Mattoussi. Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands. Journal of the American Chemical Society, 129(45) :13987–13996, 2007.

[153] Paul Charles, Veronte Stubbs, Carissa Soto, Brett Martin, Brandy White, and Chris Taitt. Reduction of non-specific protein adsorption using poly (ethylene) glycol (peg) modified polyacrylate hydrogels in immunoassays for staphylococcal enterotoxin b detection. Sensors, 9(1) :645–655, 2009.

[154] Michael H Stewart, Kimihiro Susumu, Bing C Mei, Igor L Medintz, James B Delehanty, Juan B Blanco-Canosa, Philip E Dawson, and Hedi Mattoussi. Multidentate poly (ethylene glycol) ligands provide colloidal stability to semiconductor and metallic nanocrystals in extreme conditions. Journal of the American Chemical Society, 132(28) :9804–9813, 2010.

[155] Ibrahim Yildiz, Erhan Deniz, Bridgeen McCaughan, Stuart F Cruickshank, John F Callan, and Francisco M Raymo. Hydrophilic cdse-zns core-shell quantum dots with reactive functional groups on their surface. Langmuir, 26(13) :11503–11511, 2010.

[156] Wenhao Liu, Andrew B Greytak, Jungmin Lee, Cliff R Wong, Jongnam Park, Lisa F Marshall, Wen Jiang, Peter N Curtin, Alice Y Ting, Daniel G Nocera, et al. Compact biocompatible quantum dots via raft-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand. Journal of the American Chemical Society, 132(2) :472–483, 2009.

[157] Kimihiro Susumu, Eunkeu Oh, James B Delehanty, Fabien Pinaud, Kelly Boeneman Gemmill, Scott Walper, Joyce Breger, Maria J Schroeder, Michael H Stewart, Vaibhav Jain, et al. A new family of pyridine-appended multidentate polymers as hydrophilic surface ligands for preparing stable biocompatible quantum dots. Chemistry of Materials, 26(18) :5327–5344, 2014.

[158] John H Dunlap, Abigail F Loszko, Raeven A Flake, Yucheng Huang, Brian C Benicewicz, and Andrew B Greytak. Multiply-binding polymeric imidazole ligands : Influence of molecular weight and monomer sequence on colloidal quantum dot stability. The Journal of Physical Chemistry C, 122(46) :26756–26763, 2018.

[159] Niko Hildebrandt, Christopher M Spillmann, W Russ Algar, Thomas Pons, Michael H Stewart, Eunkeu Oh, Kimihiro Susumu, Sebastian A Diaz, James B Delehanty, and Igor L Medintz. Energy transfer with semiconductor quantum dot bioconjugates : a versatile platform for biosensing, energy harvesting, and other developing applications. Chemical reviews, 117(2) :536–711, 2016.

[160] TL Jennings, MP Singh, and GF Strouse. Fluorescent lifetime quenching near d= 1.5 nm gold nanoparticles : probing nset validity. Journal of the American Chemical Society, 128(16) :5462–5467, 2006.

[161] Prashant K Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H El-Sayed, and Mostafa A El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition : applications in biological imaging and biomedicine. The journal of physical chemistry B, 110(14) :7238–7248, 2006.

[162] E Dulkeith, M Ringler, TA Klar, J Feldmann, A Munoz Javier, and WJ Parak. Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression. Nano letters, 5(4) :585–589, 2005.

[163] Joel Gersten and Abraham Nitzan. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. The Journal of Chemical Physics, 75(3) :1139–1152, 1981.

[164] H Chew. Transition rates of atoms near spherical surfaces. The Journal of chemical physics, 87(2) :1355–1360, 1987.

[165] Vitaliy N Pustovit and Tigran V Shahbazyan. Fluorescence quenching near small metal nanoparticles. The Journal of chemical physics, 136(20) :204701, 2012.

[166] Debanjana Ghosh and Nitin Chattopadhyay. Gold nanoparticles : acceptors for efficient energy transfer from the photoexcited fluorophores. Optics and Photonics Journal, 3(01) :18, 2013.

[167] Hyunjoo Han, Valerie Valle, and Mathew M Maye. Probing the quenching of cdse/zns qdots by au, au/ag, and au/pd nanoparticles. Nanotechnology, 23(43) :435401, 2012.

[168] RR Chance, A Prock, and R Silbey. Comments on the classical theory of energy transfer. The Journal of Chemical Physics, 62(6) :2245–2253, 1975.

[169] Christopher J Breshike, Ryan A Riskowski, and Geoffrey F Strouse. Leaving forster resonance energy transfer behind : Nanometal surface energy transfer predicts the size-enhanced energy coupling between a metal nanoparticle and an emitting dipole. The Journal of Physical Chemistry C, 117(45) :23942–23949, 2013.

[170] Thomas Pons, Igor L Medintz, Kim E Sapsford, Seiichiro Higashiya, Amy F Grimes, Doug S English, and Hedi Mattoussi. On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. Nano letters, 7(10) :3157–3164, 2007.

[171] Ming Li, Scott K Cushing, Qiaoyi Wang, Xiaodong Shi, Lawrence A Hornak, Zhanglian Hong, and Nianqiang Wu. Size-dependent energy transfer between cdse/zns quantum dots and gold nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2(17) :2125–2129, 2011.

[172] Brent R Fisher, Hans-Jürgen Eisler, Nathan E Stott, and Moungi G Bawendi. Emission intensity dependence and single-exponential behavior in single colloidal quantum dot fluorescence lifetimes. The Journal of Physical Chemistry B, 108(1) :143–148, 2004.

[173] Martin Lundqvist, Johannes Stigler, Giuliano Elia, Iseult Lynch, Tommy Cedervall, and Kenneth A Dawson. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(38) :14265–14270, 2008.

[174] Carl D Walkey, Jonathan B Olsen, Hongbo Guo, Andrew Emili, and Warren CW Chan. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. Journal of the American Chemical Society, 134(4) :2139–2147, 2012.

[175] Anna Salvati, Andrzej S Pitek, Marco P Monopoli, Kanlaya Prapainop, Francesca Baldelli Bombelli, Delyan R Hristov, Philip M Kelly, Christoffer Åberg, Eugene Mahon, and Kenneth A Dawson. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. Nature nanotechnology, 8(2) :137, 2013.

[176] R Gref, M Lück, P Quellec, M Marchand, E Dellacherie, S Harnisch, T Blunk, and RH Müller. 'stealth'corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (peg) : influences of the corona (peg chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 18(3-4) :301–313, 2000.

[177] Hyun Ryoung Kim, Karine Andrieux, Claudine Delomenie, Héléne Chacun, Martine Appel, Didier Desmaële, Fréderic Taran, Dominique Georgin, Patrick Couvreur, and Myriam Taverna. Analysis of plasma protein adsorption onto pegylated nanoparticles by complementary methods : 2-de, ce and protein lab-on-chip® system. Electrophoresis, 28(13) :2252–2261, 2007.

[178] Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Pauline Maffre, Raimo Hartmann, Marta Gallego, Sara Rivera-Fernandez, Jesus M de la Fuente, G Ulrich Nienhaus, and Wolfgang J Parak. Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol : effects on protein adsorption and cellular uptake. ACS nano, 9(7) :6996–7008, 2015.

[179] Nicolas Bertrand, Philippe Grenier, Morteza Mahmoudi, Eliana M Lima, Eric A Appel, Flavio Dormont, Jong-Min Lim, Rohit Karnik, Robert Langer, and Omid C Farokhzad. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. Nature communications, 8(1) :777, 2017.

[180] Susanne Schöttler, Greta Becker, Svenja Winzen, Tobias Steinbach, Kristin Mohr, Katharina Landfester, Volker Mailänder, and Frederik R Wurm. Protein adsorption is required for stealth effect of poly (ethylene glycol)-and poly (phosphoester)-coated nanocarriers. Nature nanotechnology, 11(4) :372, 2016.

[181] Ricardo P Garay, Raafat El-Gewely, Jonathan K Armstrong, George Garratty, and Pascal Richette. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with peg-conjugated agents. 2012.

[182] Qing Shao, Yi He, Andrew D White, and Shaoyi Jiang. Difference in hydration between carboxybetaine and sulfobetaine. The Journal of Physical Chemistry B, 114(49) :16625–16631, 2010.

[183] Qing Shao, Luo Mi, Xia Han, Tao Bai, Sijun Liu, Yuting Li, and Shaoyi Jiang. Differences in cationic and anionic charge densities dictate zwitterionic associations and stimuli responses. The journal of physical chemistry B, 118(24) :6956–6962, 2014.

[184] Zaki G Estephan, Jad A Jaber, and Joseph B Schlenoff. Zwitterion-stabilized silica nanoparticles : toward nonstick nano. Langmuir, 26(22) :16884–16889, 2010.

[185] Karina Pombo García, Kristof Zarschler, Lisa Barbaro, José A Barreto, William O'Malley, Leone Spiccia, Holger Stephan, and Bim Graham. Zwitterionic-coated "stealth" nanoparticles for biomedical applications : recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. Small, 10(13) :2516–2529, 2014.

[186] Brianna R Knowles, Pawel Wagner, Shane Maclaughlin, Michael J Higgins, and Paul J Molino. Silica nanoparticles functionalized with zwitterionic sulfobetaine siloxane for application as a versatile antifouling coating system. ACS applied materials & interfaces, 9(22) :18584–18594, 2017.

[187] Fatimata Dembele, Mariana Tasso, Laura Trapiella-Alfonso, Xiangzhen Xu, Mohamed Hanafi, Nicolas Lequeux, and Thomas Pons. Zwitterionic silane copolymer for ultra-stable and bright biomolecular probes based on fluorescent quantum dot nanoclusters. ACS applied materials & interfaces, 9(21) :18161–18169, 2017.

[188] Ryouta Tatumi and Hisashi Fujihara. Remarkably stable gold nanoparticles functionalized with a zwitterionic liquid based on imidazolium sulfonate in a high concentration of aqueous electrolyte and ionic liquid. Chemical Communications, (1) :83–85, 2005.

[189] Hironobu Takahashi, Yasuro Niidome, Takuro Niidome, Kenji Kaneko, Hideya Kawasaki, and Sunao Yamada. Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity. Langmuir, 22(1) :2–5, 2006.

[190] Layal L Rouhana, Jad A Jaber, and Joseph B Schlenoff. Aggregation-resistant water-soluble gold nanoparticles. Langmuir, 23(26) :12799–12801, 2007.

[191] Wei Yang, Lei Zhang, Shanlin Wang, Andrew D White, and Shaoyi Jiang. Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly (carboxybetaine) in undiluted blood serum. Biomaterials, 30(29) :5617–5621, 2009.

[192] Wenbo Zhou, Jinyan Shao, Qiao Jin, Qingshan Wei, Jianguo Tang, and Jian Ji. Zwitterionic phosphorylcholine as a better ligand for gold nanorods cell uptake and selective photothermal ablation of cancer cells. Chemical communications, 46(9) :1479–1481, 2010.

[193] Xiangji Chen, Jimmy Lawrence, Sangram Parelkar, and Todd Emrick. Novel zwitterionic copolymers with dihydrolipoic acid : synthesis and preparation of nonfouling nanorods. Macromolecules, 46(1) :119–127, 2012.

[194] Daniel F Moyano, Krishnendu Saha, Gyan Prakash, Bo Yan, Hao Kong, Mahdieh Yazdani, and Vincent M Rotello. Fabrication of corona-free nanoparticles with tunable hydrophobicity. ACS nano, 8(7) :6748–6755, 2014.

[195] Céline Durand-Gasselin, Régis Koerin, Jutta Rieger, Nicolas Lequeux, and Nicolas Sanson. Colloidal stability of zwitterionic polymer-grafted gold nanoparticles in water. Journal of colloid and interface science, 434 :188–194, 2014.

[196] Wentao Wang, Xin Ji, Liang Du, and Hedi Mattoussi. Enhanced colloidal stability of various gold nanostructures using a multicoordinating polymer coating. The Journal of Physical Chemistry C, 121(41) :22901–22913, 2017.

[197] Hak Soo Choi, Wenhao Liu, Preeti Misra, Eiichi Tanaka, John P Zimmer, Binil Itty Ipe, Moungi G Bawendi, and John V Frangioni. Renal clearance of quantum dots. Nature biotechnology, 25(10) :1165, 2007.

[198] Vladimir V Breus, Colin D Heyes, Kyrylo Tron, and G Ulrich Nienhaus. Zwitterionic biocompatible quantum dots for wide ph stability and weak nonspecific binding to cells. Acs Nano, 3(9) :2573–2580, 2009.

[199] Mariana Tasso, Emerson Giovanelli, Diana Zala, Sophie Bouccara, Alexandra Fragola, Mohamed Hanafi, Zsolt Lenkei, Thomas Pons, and Nicolas Lequeux. Sulfobetaine–vinylimidazole block copolymers : A robust quantum dot surface chemistry expanding bioimaging's horizons. ACS nano, 9(11) :11479–11489, 2015.

[200] Wentao Wang, Xin Ji, Anshika Kapur, Chengqi Zhang, and Hedi Mattoussi. A multifunctional polymer combining the imidazole and zwitterion motifs as a biocompatible compact coating for quantum dots. Journal of the American Chemical Society, 137(44) :14158–14172, 2015.

[201] Haixia Wang, Li Shang, Pauline Maffre, Siegfried Hohmann, Frank Kirschhöfer, Gerald Brenner-Weiß, and Gerd Ulrich Nienhaus. The nature of a hard protein corona forming on quantum dots exposed to human blood serum. Small, 12(42) :5836–5844, 2016.

[202] Sumaira Ashraf, Joonhyuck Park, Mathilde A Bichelberger, Karsten Kantner, Raimo Hartmann, Pauline Maffre, Alaa Hassan Said, Neus Feliu, Junhwa Lee, Dakyeon Lee, et al. Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake. Nanoscale, 8(41) :17794–17800, 2016.

[203] Wei Yang, Jean-Rene Ella-Menye, Tao Bai, Andrew Sinclair, and Shaoyi Jiang. Stable and functionalizable quantum dots with a thin zwitterionic carboxybetaine layer. Langmuir, 33(35) :8784–8789, 2017.

[204] Eleonora Muro, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Alexandra Fragola, Nicolas Sanson, Zsolt Lenkei, and Benoit Dubertret. Small and stable sulfobetaine zwitterionic quantum dots for functional live-cell imaging. Journal of the American Chemical Society, 132(13) :4556–4557, 2010.

[205] Joonhyuck Park, Jutaek Nam, Nayoun Won, Ho Jin, Sungho Jung, Sungwook Jung, So-Hye Cho, and Sungjee Kim. Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface : specific cell interactions and non-specific adsorptions by the surface charges. Advanced Functional Materials, 21(9) :1558–1566, 2011.

[206] Emerson Giovanelli, Eleonora Muro, Gary Sitbon, Mohamed Hanafi, Thomas Pons, Benoît Dubertret, and Nicolas Lequeux. Highly enhanced affinity of multidentate versus bidentate zwitterionic ligands for long-term quantum dot bioimaging. Langmuir, 28(43) :15177–15184, 2012.

[207] Eleonora Muro, Alexandra Fragola, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Andriani Ioannou, Paris Skourides, and Benoit Dubertret. Comparing intracellular stability and targeting of sulfobetaine quantum dots with other surface chemistries in live cells. Small, 8(7) :1029–1037, 2012.

[208] Hee-Sun Han, John D Martin, Jungmin Lee, Daniel K Harris, Dai Fukumura, Rakesh K Jain, and Moungi Bawendi. Spatial charge configuration regulates nanoparticle transport and binding behavior in vivo. Angewandte Chemie International Edition, 52(5) :1414–1419, 2013.

[209] Fadi Aldeek, Malak Safi, Naiqian Zhan, Goutam Palui, and Hedi Mattoussi. Understanding the self-assembly of proteins onto gold nanoparticles and quantum dots driven by metal-histidine coordination. ACS nano, 7(11) :10197–10210, 2013.

[210] Minghao Sun, Likun Yang, Purnima Jose, Li Wang, and Jamal Zweit. Functionalization of quantum dots with multidentate zwitterionic ligands : impact on cellular interactions and cytotoxicity. Journal of Materials Chemistry B, 1(44) :6137–6146, 2013.

[211] Naiqian Zhan, Goutam Palui, Malak Safi, Xin Ji, and Hedi Mattoussi. Multidentate zwitterionic ligands provide compact and highly biocompatible quantum dots. Journal of the American Chemical Society, 135(37) :13786–13795, 2013.

[212] Lei Zhang, Hong Xue, Changlu Gao, Louisa Carr, Jinnan Wang, Baocheng Chu, and Shaoyi Jiang. Imaging and cell targeting characteristics of magnetic nanoparticles modified by a functionalizable zwitterionic polymer with adhesive 3, 4-dihydroxyphenyl-l-alanine linkages. Biomaterials, 31(25) :6582–6588, 2010.

[213] He Wei, Oliver T Bruns, Michael G Kaul, Eric C Hansen, Mariya Barch, Agata Wiśniowska, Ou Chen, Yue Chen, Nan Li, Satoshi Okada, et al. Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive mri contrast agents. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(9) :2325–2330, 2017.

[214] Dongkyu Kim, Min Kyung Chae, Hyun Jung Joo, Il-ha Jeong, Jee-Hyun Cho, and Chulhyun Lee. Facile preparation of zwitterion-stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (zspions) as an mr contrast agent for in vivo applications. Langmuir, 28(25) :9634–9639, 2012.

[215] Thomas Blin, Aleksandr Kakinen, Emily H Pilkington, Angela Ivask, Feng Ding, John F Quinn, Michael R Whittaker, Pu Chun Ke, and Thomas P Davis. Synthesis and in vitro properties of iron oxide nanoparticles grafted with brushed phosphorylcholine and polyethylene glycol. Polymer Chemistry, 7(10) :1931–1944, 2016.

[216] Meredith A Jackson, Thomas A Werfel, Elizabeth J Curvino, Fang Yu, Taylor E Kavanaugh, Samantha M Sarett, Mary D Dockery, Kameron V Kilchrist, Ayisha N Jackson, Todd D Giorgio, et al. Zwitterionic nanocarrier surface chemistry improves sirna tumor delivery and silencing activity relative to polyethylene glycol. ACS nano, 11(6) :5680–5696, 2017.

[217] Peng Zhang, Fang Sun, Caroline Tsao, Sijun Liu, Priyesh Jain, Andrew Sinclair, Hsiang-Chieh Hung, Tao Bai, Kan Wu, and Shaoyi Jiang. Zwitterionic gel encapsulation promotes protein stability, enhances pharmacokinetics, and reduces immunogenicity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(39) :12046–12051, 2015.

[218] Bowen Li, Jingyi Xie, Zhefan Yuan, Priyesh Jain, Xiaojie Lin, Kan Wu, and Shaoyi Jiang. Mitigation of inflammatory immune responses with hydrophilic nanoparticles. Angewandte Chemie International Edition, 57(17) :4527–4531, 2018.

[219] Sumaira Ashraf, Joonhyuck Park, Mathilde A Bichelberger, Karsten Kantner, Raimo Hartmann, Pauline Maffre, Alaa Hassan Said, Neus Feliu, Junhwa Lee, Dakyeon Lee, et al. Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake. Nanoscale, 8(41) :17794–17800, 2016.

[220] Yongan Andrew Yang, Huimeng Wu, Kathryn R Williams, and Y Charles Cao. Synthesis of cdse and cdte nanocrystals without precursor injection. Angewandte Chemie, 117(41) :6870–6873, 2005.

[221] Graeme Moad, Ezio Rizzardo, and San H Thang. Living radical polymerization by the raft process. Australian journal of chemistry, 58(6) :379–410, 2005.

[222] Carl D Walkey, Jonathan B Olsen, Hongbo Guo, Andrew Emili, and Warren CW Chan. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. Journal of the American Chemical Society, 134(4) :2139–2147, 2012.

[223] Fred Etoc, Elie Balloul, Chiara Vicario, Davide Normanno, Domenik Liße, Assa Sittner, Jacob Piehler, Maxime Dahan, and Mathieu Coppey. Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells. Nat. Mater, 17(8) :740, 2018.

[224] Nina Yu Kostina, Shahriar Sharifi, Andres de los Santos Pereira, Jiří Michálek, Dirk W Grijpma, and Cesar Rodriguez-Emmenegger. Novel antifouling self-healing poly (carboxybetaine methacrylamide-co-hema) nanocomposite hydrogels with superior mechanical properties. Journal of Materials Chemistry B, 1(41) :5644–5650, 2013.

[225] Chun-Jen Huang and Ying-Chih Chang. In situ surface tailoring with zwitterionic carboxybetaine moieties on self-assembled thin film for antifouling biointerfaces. Materials, 7(1) :130–142, 2014.

[226] Adrian V Fuchs, Sandra Ritz, Sabine Pütz, Volker Mailänder, Katharina Landfester, and Ulrich Ziener. Bioinspired phosphorylcholine containing polymer films with silver nanoparticles combining antifouling and antibacterial properties. Biomaterials Science, 1(5) :470–477, 2013.

[227] Bo Wang, Thomas Blin, Aleksandr Käkinen, Xinwei Ge, Emily H Pilkington, John F Quinn, Michael R Whittaker, Thomas P Davis, Pu Chun Ke, and Feng Ding. Brushed polyethylene glycol and phosphorylcholine for grafting nanoparticles against protein binding. Polymer chemistry, 7(45) :6875–6879, 2016.

[228] Haixia Wang, Youhui Lin, Karin Nienhaus, and G Ulrich Nienhaus. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology, 10(4) :e1500, 2018.

[229] Kim D Collins. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. Biophysical journal, 72(1) :65–76, 1997.

[230] Kim D Collins, George W Neilson, and John E Enderby. Ions in water : characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. Biophysical chemistry, 128(2-3) :95–104, 2007.

[231] Qing Shao and Shaoyi Jiang. Molecular understanding and design of zwitterionic materials. Advanced Materials, 27(1) :15–26, 2015.

[232] Ryo Nagumo, Ryoya Suzuki, Takaaki Miyake, Haruki Furukawa, Shuichi Iwata, and Hideki Mori. Molecular dynamics study of the correlation between the solvation structures and the antifouling properties of three types of betaine moieties. Journal of Chemical Engineering of Japan, 50(5) :333–338, 2017.

[233] Cesar Rodriguez-Emmenegger, Bernhard VKJ Schmidt, Zdenka Sedlakova, Vladimir Šubr, Aldo Bologna Alles, Eduard Brynda, and Christopher Barner-Kowollik. Low temperature aqueous living/controlled (raft) polymerization of carboxybetaine methacrylamide up to high molecular weights. Macromolecular rapid communications, 32(13) :958–965, 2011.

[234] Erich E Kathmann, Leslie A White, and Charles L McCormick. Water soluble polymers : 69. ph and electrolyte responsive copolymers of acrylamide and the zwitterionic monomer 4-(2-acrylamido-2-methylpropyldimethylammonio) butanoate : synthesis and solution behaviour. Polymer, 38(4) :871–878, 1997.

[235] Gaelle Boncompain, Severine Divoux, Nelly Gareil, Helene De Forges, Aurianne Lescure, Lynda Latreche, Valentina Mercanti, Florence Jollivet, Graça Raposo, and Franck Perez. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. Nature methods, 9(5) :493, 2012.

[236] Marie-Caline Z Abadjian, W Barry Edwards, and Carolyn J Anderson. Imaging the tumor microenvironment. In Tumor Immune Microenvironment in Cancer Progression and Cancer Therapy, pages 229–257. Springer, 2017.

[237] Suleyman Akocak, M Raqibul Alam, Ahmed M Shabana, Rajesh Kishore Kumar Sanku, Daniela Vullo, Harry Thompson, Erik R Swenson, Claudiu T Supuran, and Marc A Ilies. Pegylated bis-sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors can efficiently control the growth of several carbonic anhydrase ix-expressing carcinomas. Journal of medicinal chemistry, 59(10) :5077–5088, 2016.

[238] K Engin, DB Leeper, JR Cater, AJ Thistlethwaite, L Tupchong, and JD McFarlane. Extracellular ph distribution in human tumours. International Journal of Hyperthermia, 11(2) :211–216, 1995.

[239] Eun Seong Lee, Zhonggao Gao, and You Han Bae. Recent progress in tumor ph targeting nanotechnology. Journal of Controlled Release, 132(3) :164–170, 2008.

[240] Ian F Tannock and Daniela Rotin. Acid ph in tumors and its potential for therapeutic exploitation. Cancer research, 49(16) :4373–4384, 1989.

[241] Marion Stubbs, Paul MJ McSheehy, John R Griffiths, and C Lindsay Bashford. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. Molecular medicine today, 6(1) :15–19, 2000.

[242] Yukun Duan and Bin Liu. Recent advances of optical imaging in the second near-infrared window. Advanced Materials, 30(47) :1802394, 2018.

[243] Elsa Cassette, Marion Helle, Lina Bezdetnaya, Frédéric Marchal, Benoit Dubertret, and Thomas Pons. Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging. Advanced drug delivery reviews, 65(5) :719–731, 2013.

[244] X Michalet, FF Pinaud, LA Bentolila, JM Tsay, SJJL Doose, JJ Li, G Sundaresan, AM Wu, SS Gambhir, and S Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. science, 307(5709) :538–544, 2005.

[245] Assaf Aharoni, Taleb Mokari, Inna Popov, and Uri Banin. Synthesis of inas/cdse/znse core/shell1/shell2 structures with bright and stable near-infrared fluorescence. Journal of the American Chemical Society, 128(1) :257–264, 2006.

[246] Ludmila Bakueva, Ivan Gorelikov, Sergei Musikhin, Xu Sheng Zhao, Edward H Sargent, and Eugenia Kumacheva. Pbs quantum dots with stable efficient luminescence in the near-ir spectral range. Advanced Materials, 16(11) :926–929, 2004.

[247] Igor L Medintz, H Tetsuo Uyeda, Ellen R Goldman, and Hedi Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. Nature materials, 4(6) :435, 2005.

[248] Andrzej May, Srabani Bhaumik, Sanjiv Sam Gambhir, Chun Zhan, and Siavash Yazdanfar. Whole-body, real-time preclinical imaging of quantum dot fluorescence with time-gated detection. Journal of biomedical optics, 14(6) :060504, 2009.

[249] Yoshikazu Tsukasaki, Masatoshi Morimatsu, Goro Nishimura, Takao Sakata, Hidehiro Yasuda, Akihito Komatsuzaki, Tomonobu M Watanabe, and Takashi Jin. Synthesis and optical properties of emission-tunable pbs/cds core–shell quantum dots for in vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window. RSC Advances, 4(77) :41164–41171, 2014.

[250] Bohua Dong, Chunyan Li, Guangcun Chen, Yejun Zhang, Yan Zhang, Manjiao Deng, and Qiangbin Wang. Facile synthesis of highly photoluminescent ag2se quantum dots as a new fluorescent probe in the second near-infrared window for in vivo imaging. Chemistry of Materials, 25(12) :2503–2509, 2013.

[251] Guosong Hong, Jerry C Lee, Joshua T Robinson, Uwe Raaz, Liming Xie, Ngan F Huang, John P Cooke, and Hongjie Dai. Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared ii fluorescence. Nature medicine, 18(12) :1841, 2012.

[252] Guosong Hong, Shuo Diao, Junlei Chang, Alexander L Antaris, Changxin Chen, Bo Zhang, Su Zhao, Dmitriy N Atochin, Paul L Huang, Katrin I Andreasson, et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. Nature photonics, 8(9) :723, 2014.

[253] Sungjee Kim, Yong Taik Lim, Edward G Soltesz, Alec M De Grand, Jaihyoung Lee, Akira Nakayama, J Anthony Parker, Tomislav Mihaljevic, Rita G Laurence, Delphine M Dor, et al. Near-infrared fluorescent type ii quantum dots for sentinel lymph node mapping. Nature biotechnology, 22(1) :93, 2004.

[254] Weibo Cai, Dong-Woon Shin, Kai Chen, Olivier Gheysens, Qizhen Cao, Shan X Wang, Sanjiv S Gambhir, and Xiaoyuan Chen. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. Nano letters, 6(4) :669–676, 2006.

[255] Bryan Ronain Smith, Zhen Cheng, Abhijit De, Ai Leen Koh, Robert Sinclair, and Sanjiv Sam Gambhir. Real-time intravital imaging of rgd- quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature. Nano letters, 8(9) :2599–2606, 2008.

[256] Preston T Snee, Rebecca C Somers, Gautham Nair, John P Zimmer, Moungi G Bawendi, and Daniel G Nocera. A ratiometric cdse/zns nanocrystal ph sensor. Journal of the American Chemical Society, 128(41) :13320–13321, 2006.

[257] Allison M Dennis, Won Jong Rhee, David Sotto, Steven N Dublin, and Gang Bao. Quantum dot–fluorescent protein fret probes for sensing intracellular ph. ACS nano, 6(4) :2917–2924, 2012.

[258] Francesco Bruni, Jacopo Pedrini, Caterina Bossio, Beatriz Santiago-Gonzalez, Francesco Meinardi, Wan Ki Bae, Victor I Klimov, Guglielmo Lanzani, and Sergio Brovelli. Two-color emitting colloidal nanocrystals as single-particle ratiometric probes of intracellular ph. Advanced Functional Materials, 27(12) :1605533, 2017.

[259] Sung Woo Hong, Keon Hyeong Kim, June Huh, Cheol-Hee Ahn, and Won Ho Jo. Design and synthesis of a new ph sensitive polymeric sensor using fluorescence resonance energy transfer. Chemistry of materials, 17(25) :6213–6215, 2005.

[260] Brooks A Abel, Michael B Sims, and Charles L McCormick. Tunable ph-and co2-responsive sulfonamide-containing polymers by raft polymerization. Macromolecules, 48(16) :5487–5495, 2015.

[261] Stephan Link and Mostafa A El-Sayed. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry B, 103(21) :4212–4217, 1999.

[262] E Oh, K Susumu, JB Blanco-Canosa, IL Medintz, PE Dawson, and H Mattoussi. Preparation of stable maleimide-functionalized au nanoparticles and their use in counting surface ligands. Small, 6(12) :1273–1278, 2010.

[263] Xiao Han, Chao Wang, and Zhuang Liu. Red blood cells as smart delivery systems. Bioconjugate chemistry, 29(4) :852–860, 2018.

[264] Antonella Antonelli, Carla Sfara, Serafina Battistelli, Barbara Canonico, Marcella Arcangeletti, Elisabetta Manuali, Sonia Salamida, Stefano Papa, and Mauro Magnani. New strategies to prolong the in vivo life span of iron-based contrast agents for mri. PLoS One, 8(10) :e78542, 2013.

[265] B Deuticke, M Kim, and Chr Zöllner. The influence of amphotericin b on the permeability of mammalian erythrocytes to nonelectrolytes, anions and cations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 318(3) :345–359, 1973.

[266] William A Donald, Ryan D Leib, Jeremy T O'Brien, Matthew F Bush, and Evan R Williams. Absolute standard hydrogen electrode potential measured by reduction of aqueous nanodrops in the gas phase. Journal of the American Chemical Society, 130(11) :3371–3381, 2008.

[267] MS Neo, N Venkatram, GS Li, WS Chin, and W Ji. Synthesis of pbs/cds core- shell qds and their nonlinear optical properties. The Journal of Physical Chemistry C, 114(42) :18037–18044, 2010.

[268] Chris Oerlemans, Wouter Bult, Mariska Bos, Gert Storm, J Frank W Nijsen, and Wim E Hennink. Polymeric micelles in anticancer therapy : targeting, imaging and triggered release. Pharmaceutical research, 27(12) :2569–2589, 2010.

[269] Vladimir P Torchilin. Micellar nanocarriers : pharmaceutical perspectives. Pharmaceutical research, 24(1) :1, 2007.

[270] Marie-Christine Jones and Jean-Christophe Leroux. Polymeric micelles–a new generation of colloidal drug carriers. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 48(2) :101–111, 1999.

[271] Monica L Adams, Afsaneh Lavasanifar, and Glen S Kwon. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. Journal of pharmaceutical sciences, 92(7) :1343–1355, 2003.

[272] Damon Sutton, Norased Nasongkla, Elvin Blanco, and Jinming Gao. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. Pharmaceutical research, 24(6) :1029–1046, 2007.

[273] Daniel Bobo, Kye J Robinson, Jiaul Islam, Kristofer J Thurecht, and Simon R Corrie. Nanoparticle-based medicines : a review of fda-approved materials and clinical trials to date. Pharmaceutical research, 33(10) :2373–2387, 2016.

[274] CJF Rijcken, O Soga, WE Hennink, and CF Van Nostrum. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity : an attractive tool for drug delivery. Journal of controlled release, 120(3) :131–148, 2007.

[275] Howard G Schild. Poly (n-isopropylacrylamide) : experiment, theory and application. Progress in polymer science, 17(2) :163–249, 1992.

[276] MDC Topp, Pieter J Dijkstra, H Talsma, and Jan Feijen. Thermosensitive micelle-forming block copolymers of poly (ethylene glycol) and poly (n-isopropylacrylamide). Macromolecules, 30(26) :8518–8520, 1997.

[277] Neru Munshi, Natalya Rapoport, and William G Pitt. Ultrasonic activated drug delivery from pluronic p-105 micelles. Cancer Letters, 118(1) :13–19, 1997.

[278] Yue Zhao. Rational design of light-controllable polymer micelles. The Chemical Record, 7(5) :286–294, 2007.

[279] Robert Pelton. Temperature-sensitive aqueous microgels. Advances in colloid and interface science, 85(1) :1–33, 2000.

[280] Wei Chen, Fenghua Meng, Feng Li, Shun-Jun Ji, and Zhiyuan Zhong. ph-responsive biodegradable micelles based on acid-labile polycarbonate hydrophobe : synthesis and triggered drug release. Biomacromolecules, 10(7) :1727–1735, 2009.

[281] Eun Seong Lee, Kyung Taek Oh, Dongin Kim, Yu Seok Youn, and You Han Bae. Tumor ph-responsive flower-like micelles of poly (l-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (l-histidine). Journal of Controlled Release, 123(1) :19–26, 2007.

[282] Uwe Borchert, Ute Lipprandt, Matthias Bilang, Andrea Kimpfler, Anja Rank, Regine Peschka-Süss, Rolf Schubert, Peter Lindner, and Stephan Förster. ph-induced release from p2vp- peo block copolymer vesicles. Langmuir, 22(13) :5843–5847, 2006.

[283] A Karanikolas, P Tsolakis, G Bokias, and C Tsitsilianis. Stimuli-responsive poly (ethylene oxide)-b-poly (2-vinylpyridine)-b-poly (ethylene oxide) triblock copolymers and complexation with poly (acrylic acid) at low ph. The European Physical Journal E, 27(3) :335–343, 2008.

[284] Kejin Zhou, Yiguang Wang, Xiaonan Huang, Katherine Luby-Phelps, Baran D Sumer, and Jinming Gao. Tunable, ultrasensitive ph-responsive nanoparticles targeting specific endocytic organelles in living cells. Angewandte Chemie International Edition, 50(27) :6109–6114, 2011.

[285] Yiguang Wang, Kejin Zhou, Gang Huang, Christopher Hensley, Xiaonan Huang, Xinpeng Ma, Tian Zhao, Baran D Sumer, Ralph J DeBerardinis, and Jinming Gao. A nanoparticle-based strategy for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals. Nature materials, 13(2) :204, 2014.

[286] Xinpeng Ma, Yiguang Wang, Tian Zhao, Yang Li, Lee-Chun Su, Zhaohui Wang, Gang Huang, Baran D Sumer, and Jinming Gao. Ultra-ph-sensitive nanoprobe library with broad ph tunability and fluorescence emissions. Journal of the American Chemical Society, 136(31) :11085–11092, 2014.

[287] Goutam Palui, Tommaso Avellini, Naiqian Zhan, Feng Pan, David Gray, Igor Alabugin, and Hedi Mattoussi. Photoinduced phase transfer of luminescent quantum dots to polar and aqueous media. Journal of the American Chemical Society, 134(39) :16370–16378, 2012.

[288] Jie Zhou, Yun Liu, Jian Tang, and Weihua Tang. Surface ligands engineering of semiconductor quantum dots for chemosensory and biological applications. Materials Today, 20(7) :360–376, 2017.

[289] Weibin Li, Hoyong Chung, Chris Daeffler, Jeremiah A Johnson, and Robert H Grubbs. Application of 1h dosy for facile measurement of polymer molecular weights. Macromolecules, 45(24) :9595–9603, 2012.

[290] Justine Viéville, Matthieu Tanty, and Marc-André Delsuc. Polydispersity index of polymers revealed by dosy nmr. Journal of magnetic resonance, 212(1) :169–173, 2011.

[291] Kayoung Lee, Sang-Chul Shin, and Injoon Oh. Fluorescence spectroscopy studies on micellization of poloxamer 407 solution. Archives of pharmacal research, 26(8) :653–658, 2003.

[292] Nuri Oh and Ji-Ho Park. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. International journal of nanomedicine, 9(Suppl 1) :51, 2014.

[293] Élaine Hémond. Les cellules cancéreuses qui nous habitent.

[294] Anne-Cécile Lesart. Modélisation théorique du développement tumoral sous fenêtre dorsale : Vers un outil clinique d'individualisation et d'optimisation de la thérapie. PhD thesis, Université de Grenoble, 2013.

[295] Igor L Medintz, Aaron R Clapp, Florence M Brunel, Theresa Tiefenbrunn, H Tetsuo Uyeda, Eddie L Chang, Jeffrey R Deschamps, Philip E Dawson, and Hedi Mattoussi. Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot–peptide conjugates. Nature materials, 5(7) :581, 2006.

[296] Sebastián A Díaz, Anthony P Malonoski, Kimihiro Susumu, Romina V Hofele, Eunkeu Oh, and Igor L Medintz. Probing the kinetics of quantum dot-based proteolytic sensors. Analytical and bioanalytical chemistry, 407(24) :7307–7318, 2015.

[297] Elsa Cassette, Thomas Pons, Cécile Bouet, Marion Helle, Lina Bezdetnaya, Frédéric Marchal, and Benoît Dubertret. Synthesis and characterization of near-infrared cu- in- se/zns core/shell quantum dots for in vivo imaging. Chemistry of Materials, 22(22) :6117–6124, 2010.

[298] Sophie Bouccara. Time-gated detection of near-infrared emitting quantum dots for in vivo cell tracking.

[299] Thomas Pons, Emilie Pic, Nicolas Lequeux, Elsa Cassette, Lina Bezdetnaya, François Guillemin, Frédéric Marchal, and Benoit Dubertret. Cadmium-free cuins2/zns quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. ACS nano, 4(5) :2531–2538, 2010.

[300] Hiroyuki Nakamura, Wataru Kato, Masato Uehara, Katsuhiro Nose, Takahisa Omata, Shinya Otsuka-Yao-Matsuo, Masaya Miyazaki, and Hideaki Maeda. Tunable photoluminescence wavelength of chalcopyrite cuins2-based semiconductor nanocrystals synthesized in a colloidal system. Chemistry of Materials, 18(14) :3330–3335, 2006.

[301] Wenjie Li, Zhenxiao Pan, and Xinhua Zhong. Cuinse 2 and cuinse 2–zns based high efficiency "green" quantum dot sensitized solar cells. Journal of Materials Chemistry A, 3(4) :1649–1655, 2015.

[302] S Schorr, V Riede, D Spemann, and Th Doering. Electronic band gap of zn 2x (cuin) 1-x x 2 solid solution series (x= s, se, te). Journal of alloys and compounds, 414(1) :26–30, 2006.

[303] C Rincon and R Marquez. Defect physics of the cuinse2 chalcopyrite semiconductor. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 60(11) :1865–1873, 1999.

[304] Stephanie L Castro, Sheila G Bailey, Ryne P Raffaelle, Kulbinder K Banger, and Aloysius F Hepp. Nanocrystalline chalcopyrite materials (cuins2 and cuinse2) via low-temperature pyrolysis of molecular single-source precursors. Chemistry of Materials, 15(16) :3142–3147, 2003.

[305] Bishnu P Khanal, Anshu Pandey, Liang Li, Qianglu Lin, Wan Ki Bae, Hongmei Luo, Victor I Klimov, and Jeffrey M Pietryga. Generalized synthesis of hybrid metal–semiconductor nanostructures tunable from the visible to the infrared. ACS nano, 6(5) :3832–3840, 2012.

[306] JJM Binsma, LJ Giling, and J Bloem. Luminescence of cuins2 : I. the broad band emission and its dependence on the defect chemistry. Journal of Luminescence, 27(1) :35–53, 1982.

[307] M Dahan, T Laurence, F Pinaud, DS Chemla, AP Alivisatos, M Sauer, and S Weiss. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. Optics letters, 26(11) :825–827, 2001.

[308] Thomas Pons, Sophie Bouccara, Vincent Loriette, Nicolas Lequeux, Sophie Pezet, and Alexandra Fragola. In vivo imaging of single tumor cells in fast-flowing bloodstream using near infrared quantum dots and time-gated imaging. ACS nano, 2019.

[309] Daniel G Duff, Alfons Baiker, and Peter P Edwards. A new hydrosol of gold clusters. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (1) :96–98, 1993.

[310] Kenneth R Brown, Daniel G Walter, and Michael J Natan. Seeding of colloidal au nanoparticle solutions. 2. improved control of particle size and shape. Chemistry of Materials, 12(2) :306–313, 2000.

[311] Jordi Piella, Neus G Bastus, and Victor Puntes. Size-controlled synthesis of sub-10-nanometer citrate-stabilized gold nanoparticles and related optical properties. Chemistry of Materials, 28(4) :1066–1075, 2016.

[312] Joonhyuck Park, Jutaek Nam, Nayoun Won, Ho Jin, Sungho Jung, Sungwook Jung, So-Hye Cho, and Sungjee Kim. Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface : specific cell interactions and non-specific adsorptions by the surface charges. Advanced Functional Materials, 21(9) :1558–1566, 2011.

[313] Edward O Stejskal and John E Tanner. Spin diffusion measurements : spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. The journal of chemical physics, 42(1) :288–292, 1965.

[314] Julie Vaysse-Dufaure. Apport de la résonance magnétique nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires.

[315] Thierry Gostan, Dominique Tramesel, Emmanuel Brun, Yann Prigent, and Marc-André Delsuc. L'experience dosy, une puissante méthode rmn pour l'analyse de mélanges complexes et la détection de traces. Spectra analyse, 33 :26–32, 2004.

[316] Arnauld Sergé, Nicolas Bertaux, Hervé Rigneault, and Didier Marguet. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. Nature methods, 5(8) :687, 2008.

# RESUME

Titre : Chimie de surface de nanocristaux fluorescents pour l'imagerie biologique.

Les nanocristaux de semiconducteurs (ou Quantum Dots, QD) possèdent des propriétés optiques uniques qui en font des sondes intéressantes pour l'imagerie biologique. Leurs rendements quantiques de fluorescence élevés les rendent particulièrement prometteurs pour l'imagerie de fluorescence dans l'infrarouge court, un domaine spectral qui permet de conserver une bonne résolution spatiale en profondeur dans les tissus biologiques. Dans cette thèse, les objectifs sont d'optimiser la chimie de surface des QD afin de limiter l'adsorption non spécifique de biomolécules à leur surface, et de développer des sondes fonctionnelles d'imagerie du pH et d'activité enzymatique.

L'utilisation de nanoparticules (NP) *in vivo* nécessite de minimiser la formation d'une couronne de protéines adsorbées à leur surface. Il est possible d'utiliser pour cela des polymères dits « furtifs » pour limiter cette adsorption et éviter leur reconnaissance par le système immunitaire. Dans cette thèse, nous comparons les propriétés de furtivité de QD recouverts de ligands polymères à bloc comportant différents zwitterions. Nous montrons en particulier que les ligands poly(sulfobétaïne) permettent une élimination complète de l'adsorption des protéines du sérum, contrairement à ceux composés de carboxybétaïnes ou de phosphorylcholines. Ces résultats sont corrélés à la diffusion de ces QD dans le cytoplasme de cellules vivantes.

La chimie de surface des QD permet également de concevoir des sondes fonctionnelles, par exemple en modulant leur fluorescence par transfert d'énergie sous l'action d'un facteur biochimique. Ainsi, dans cette thèse, nous démontrons deux concepts de QD pour l'imagerie du pH dans le visible ou l'infrarouge court, en développant différentes chimies de surface sensibles au pH pour moduler leur interaction avec des NP d'or.

Mots clés : Quantum Dots, Chimie de surface, Couronne de protéines, Polymère, Imagerie, Transfert d'énergie, pH, Enzyme.

# SUMMARY

Title : Surface chemistry of fluorescent nanocrystals for biological imaging.

Semiconductor nanocrystals (or Quantum Dots, QDs) have unique optical properties that make them interesting probes for biological imaging. Thanks to their high fluorescence quantum yields, they are particularly promising for short-wave infrared fluorescence imaging, a spectral domain that preserves a good spatial resolution deep within biological tissues. In this thesis, our objectives are to optimize the QD surface chemistry to minimize nonspecific adsorption of biomolecules at their surface, and to develop functional probes to image pH or enzymatic activity *in vivo*.

The use of nanoparticles (NP) *in vivo* requires minimizing the formation of a corona of proteins adsorbed on their surface. It is possible to use so-called "stealth" polymers to reduce this adsorption, and limit their recognition by the immune system. In this thesis we compare the stealth properties of QDs coated with block polymer ligands with different zwitterions. We have shown, in particular, that poly(sulfobetaine) ligands enable a complete elimination of protein adsorption in serum, in contrast to carboxybetaine or phosphorylcholine ones. These results are correlated with the diffusion of these QDs in the cytoplasm of living cells.

Designing new QD surface chemistries makes it also possible to design functional probes, for example by modulating their fluorescence by energy transfer controlled by a biochemical factor. Thus, in this thesis, we demonstrate two concepts using shortwave infrared or visible QDs for pH imaging, using different pH-sensitive surface chemistries in order to modulate their interaction with gold NPs.



Key words: Quantum Dots, Surface Chemistry, Protein corona, Polymer, Imaging, Energy Transfer, pH, Enzyme.